

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6389093号  
(P6389093)

(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(51) Int.Cl.	F I					
<b>C07K 16/32 (2006.01)</b>	C O 7 K	16/32	Z N A			
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/395	E			
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/395	T			
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	45/00				
	A 6 1 P	35/00				

請求項の数 8 (全 153 頁)

(21) 出願番号	特願2014-203774 (P2014-203774)	(73) 特許権者	504438727
(22) 出願日	平成26年10月2日(2014.10.2)		マクロジェニクス、インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2010-292632 (P2010-292632) の分割		アメリカ合衆国 20850 メリーランド州、ロックヴィル、メディカル センター ドライブ 9704
原出願日	平成16年1月9日(2004.1.9)	(74) 代理人	230115864
(65) 公開番号	特開2015-44817 (P2015-44817A)		弁護士 永島 孝明
(43) 公開日	平成27年3月12日(2015.3.12)	(74) 代理人	100149168
審査請求日	平成26年10月31日(2014.10.31)		弁理士 若山 俊輔
審査番号	不服2017-2297 (P2017-2297/J1)	(72) 発明者	ステイブンヘイゲン、ジェフリー
審査請求日	平成29年2月17日(2017.2.17)		アメリカ合衆国 20833, メリーランド州、ブルックビル、トリードウェイ ロード 19417
(31) 優先権主張番号	60/439,498		
(32) 優先日	平成15年1月9日(2003.1.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/456,041		
(32) 優先日	平成15年3月19日(2003.3.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型 F c 領域を含む抗体の同定および作製ならびにその利用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原結合領域および変異型 F c 領域を含んでなる抗体であって、前記変異型 F c 領域は (A) 抗体の野生型 F c 領域に対して、K a b a t の E U インデックスに従い番号付けられた 396 位でのアミノ酸のロイシンによる置換を含むことにより前記野生型 F c 領域とは異なり、

(B) 前記野生型 F c 領域と比較して増大した親和性で F c R I I I A と結合し、前記抗体は癌抗原と結合することを特徴とする、抗体。

【請求項 2】

前記癌抗原が、H E R - 2 / n e u、M A G E - 1、M A G E - 3、B A G E、G A G E - 1、G A G E - 2、M U M - 1、C D K 4、M U C - 1、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p 1 5、 - カテニン、ヒトパピローマウイルス - E 6、またはヒトパピローマウイルス - E 7 である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記癌抗原が、H E R - 2 / n e u である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記癌抗原が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸部癌、および膵臓癌からなる群から選択される癌に関連する抗原である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

治療上有効な量の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 7】

前記組成物が、化学療法剤、放射線療法剤、ホルモン療法剤、および免疫療法剤からなる群より選択されるさらなる抗癌剤をさらに含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

野生型 Fc 領域がヒト IgG の Fc 領域である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、変異型Fc領域を含む分子、特にポリペプチド、さらに特定すると免疫グロブリン（例えば、抗体）に関し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、野生型Fc領域を含む対応する分子よりも高い親和性でFc RIII Aおよび/またはFc RIIAと結合する。本発明の分子は、疾患、障害または感染と関連した1以上の症状を予防し、治療し、または改善するのに特に有用である。本発明の分子は、Fc Rにより媒介されるエフェクター細胞機能（例えば、ADCC）の増大した効力が望まれる疾患または障害（例えば、癌、感染症）を治療または予防するのに、また、治療用抗体（その効果がADCCによって媒介される）の治療効力を高めるのに、特に有用である。

20

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

2.1 Fc受容体と免疫系におけるその役割

抗体-抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、広範囲の応答をもたらし、その範囲はエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害作用、肥満細胞脱顆粒、および食作用）から免疫調節シグナル（例えば、リンパ球増殖および抗体分泌の調節）にまで及ぶ。これらの相互作用はすべて、抗体または免疫複合体のFcドメインが造血細胞上の特殊な細胞表面受容体と結合することにより開始される。抗体と免疫複合体により開始される細胞応答の多様性は、Fc受容体の構造上の不均一性からもたらされる。Fc受容体は、細胞内シグナル伝達を媒介すると思われる構造的に関連したりガンド結合ドメインを共有する。

30

【0003】

タンパク質の免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーであるFc受容体は、免疫グロブリン分子のFc部分と結合することができる表面糖タンパク質である。このファミリーの各メンバーは、Fc受容体の鎖上の認識ドメインを介して1以上のアイソタイプの免疫グロブリンを認識する。Fc受容体は免疫グロブリンサブタイプに対するその特異性によって定義される。IgGに対するFc受容体はFc Rと、IgEに対するFc受容体はFc Rと、そしてIgAに対するFc受容体はFc Rと呼ばれる。さまざまなアクセサリー細胞が異なるアイソタイプの抗体に対するFc受容体を持ち、抗体のアイソタイプが所与の応答にどのアクセサリー細胞が関わるかを決定する（Ravetch J.V.ら 1991, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S.ら 2001 Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D.ら 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109):161-1681; Ravetch J.V.ら 2000, Science, 290:84-89; Ravetch J.V.ら, 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4):553-60に論評されている）。種々のFc受容体、それを発現する細胞、およびそのアイソタイプ特異性を表1にまとめてある（「免疫生物学：健康と病気における免疫系（Immunobiology: The Immune System in Health and Disease）」, 第4版. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New Yorkから引用）。

40

50

## 【0004】

Fc 受容体

このファミリーの各メンバーは、免疫グロブリン関連ドメインのC2セットに係する細胞外ドメイン、1回膜貫通ドメインおよび可変長の細胞質内ドメインを持つ内在性膜糖タンパク質である。3種の公知のFc Rがあり、それぞれFc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、およびFc RIII (CD16)と呼ばれる。3種の受容体は異なる遺伝子によりコードされる；しかし3種のファミリーメンバー間の広範な相同性は、これらが共通の祖先から、恐らくは遺伝子複製により生じたことを示唆する。

## 【0005】

Fc RII (CD32)

Fc RIIタンパク質は40Kdaの内在性膜糖タンパク質であり、モノマーIgに対して低親和性 ( $10^6\text{M}^{-1}$ ) であるため複合体化したIgGとだけ結合する。この受容体は、単球、マクロファージ、B細胞、NK細胞、好中球、肥満細胞、および血小板を含めて、全ての造血細胞上に存在する最も広く発現されているFc Rである。Fc RIIは、その免疫グロブリン結合鎖中に免疫グロブリン様領域を2つだけ有し、従って、IgGに対してFc RIより遥かに低い親和性を有する。3種のヒトFc RII遺伝子 (Fc RII-A、Fc RII-BおよびFc RII-C) が存在し、それらは全て凝集体または免疫複合体のIgGと結合する。

10

## 【0006】

Fc RII-AとFc RII-Bの細胞質内ドメイン内には明確な相違があるので、受容体ライゲーションに対して2つの機能的に異種の応答を創出する。基本的な相違は、Aアイソフォームが細胞活性化 (例えば、食作用および呼吸バースト) に至る細胞内シグナル伝達を開始するのに対して、Bアイソフォームは抑制的シグナルを開始し、例えばB細胞活性化を抑制する、ことにある。

20

## 【0007】

Fc Rを介するシグナル伝達

活性化と抑制の両方のシグナルは、ライゲーション後にFc Rを介して伝達される。これらの正反対の機能は、異なる受容体アイソフォーム間の構造上の相違からもたらされる。受容体の細胞質内シグナル伝達ドメイン内の2つの異なるドメイン、すなわち、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (ITAM) または免疫受容体チロシン系抑制モチーフ (ITIM) が、この異なる応答の原因となる。これらの構造体への異なる細胞質酵素の動員が、Fc R媒介細胞応答の結果を規定する。ITAM含有Fc R複合体にはFc RI、Fc RIIA、Fc RIIIAが含まれるが、ITIM含有複合体にはFc RIIIBだけが含まれる。

30

## 【0008】

ヒト好中球はFc RIIA遺伝子を発現する。免疫複合体または特異的抗体架橋を介するFc RIIAクラスター形成は、ITAMを、ITAMリン酸化を容易にする受容体関連キナーゼとともに凝集させるように作用する。ITAMリン酸化はSykキナーゼに対するドッキング部位として役立ち、Sykキナーゼの活性化は下流の基質 (例えば、 $\text{PI}_3\text{K}$ ) の活性化をもたらす。細胞活性化により前炎症性メディエーターが放出される。

## 【0009】

Fc RIIIB遺伝子はBリンパ球上に発現され、その細胞外ドメインはFc RIIAと96%同一であって、識別できない様式でIgG複合体と結合する。Fc RIIIBの細胞質ドメイン中のITIMの存在が、Fc Rの抑制サブクラスを規定する。最近、この抑制の分子的基礎が確立された。活性化Fc Rとともに結合されると、Fc RIIIB中のITIMはリン酸化されて、イノシトールポリリン酸5'-ホスファターゼ (SHIP) のSH2ドメインを引き付け、これがホスホイノシトールメッセンジャー (ITAM含有Fc R介在チロシンキナーゼ活性化の結果として放出される) を加水分解し、その結果、細胞内 $\text{Ca}^{++}$ の流入を抑制する。従って、Fc RIIIBの架橋は、Fc Rライゲーションに対する活性化応答を消失させ、細胞応答性を抑制する。このようにしてB細胞活性化、B細胞増殖および抗体分泌が停止する。

40

【表1】

## 免疫グロブリンアイソタイプのFc領域に対する受容体

受容体	Fc $\gamma$ RI (CD64)	Fc $\gamma$ RII-A (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B2 (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B1 (CD32)	Fc $\gamma$ RIII (CD16)	Fc $\epsilon$ RI	Fc $\alpha$ RI (CD89)
結合	IgG1 $10^8$ M <sup>-1</sup>	IgG1 $2 \times 10^6$ M <sup>-1</sup>	IgG1 $2 \times 10^6$ M <sup>-1</sup>	IgG1 $2 \times 10^6$ M <sup>-1</sup>	IgG1 $5 \times 10^5$ M <sup>-1</sup>	IgG1 $10^{10}$ M <sup>-1</sup>	IgG1、IgA2 $10^7$ M <sup>-1</sup>
細胞型	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞 血小板 ランゲルハンス細胞	マクロファージ 好中球 好酸球	B細胞 肥満細胞	NK細胞 好酸球 マクロファージ 好中球 肥満細胞	肥満細胞 好酸球 好塩基球	マクロファージ 好中球 好酸球
ライゲーションの効果	取込み 刺激 呼吸バースト活性化 死滅の誘導	取込み 顆粒放出	取込み 刺激の抑制	取込みなし 刺激の抑制	死滅の誘導	顆粒の分泌	取込み 死滅の誘導

10

20

## 【0010】

## 2.2 関連疾患

## 2.2.1 癌

新生物または腫瘍は、異常な無制御の細胞増殖から生じる新生物塊であり、良性または悪性でありうる。良性腫瘍は一般的に局在化したままである。悪性腫瘍は集合的に癌と呼ばれる。用語「悪性」は一般的に、腫瘍が近隣の体構造に侵入してそれを破壊し、そして離れた部位まで広がって死を引き起こしうることを意味する (RobbinsおよびAngell, 1976, 「基礎病理学 (Basic Pathology)」, 第2版, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122を参照)。癌は身体の多くの部位に生じうるのであって、その起源に依存して異なる挙動を示す。癌細胞は、その起源となる身体部位を破壊し、次いで他の身体部分に広がって、そこで新しい増殖を開始してさらに破壊を引き起す。

30

## 【0011】

毎年120万人以上の米国人が癌を発症している。癌は米国における死因の第2位であり、もし現在の傾向が続くと、癌は2010年には第1の死因になると予想される。肺および前立腺癌が米国における男性の癌死因のトップである。肺および乳癌が米国における女性の癌死因のトップである。米国の男性2人のうちの1人は、人生のある時期に癌と診断されうる。米国の女性3人のうちの1人は、人生のある時期に癌と診断されうる。

40

## 【0012】

癌の治療法はまだ見出されていない。現在の治療選択肢、例えば手術、化学療法および放射線療法は、しばしば効果がないかまたは重大な副作用を示す。

## 【0013】

## 癌治療

現在、癌治療には、患者の新生物細胞を根絶する外科手術、化学療法、ホルモン療法および/または放射線療法が含まれる (例えば、Stockdale, 1998, 「癌患者管理の原理 (Principles of Cancer Patient Management)」, in Scientific American: Medicine, vol. 3, RubensteinおよびFederman編, 第12章, 第IV節を参照)。最近では、癌治療に生物学的療法または免疫療法も含まれると考えられる。これらの手法は全て、患者にとって大

50

きい欠点を有する。例えば、外科手術は、患者の健康によっては禁忌であるかまたは患者に受け入れられない。さらに、外科手術は完全に新生物組織を除去できるわけではない。放射線療法は、新生物組織が放射線に対して正常組織より高い感受性を有するときのみ有効であり、かつ放射線療法はしばしば重大な副作用を引き起こすことがある。ホルモン療法は単独の薬物として投与することは稀であり、たとえ有効であるとしても、他の治療法により癌細胞の大部分を除去した後に、癌の再発を予防または遅延するために用いることが多い。生物学的療法/免疫療法は数が限られており、発疹もしくは腫脹、発熱、悪寒および疲労を含むインフルエンザ様症状、消化器問題、またはアレルギー反応などの副作用を生じうる。

【0014】

化学療法に関しては、癌治療に利用しうる様々な化学療法剤が存在する。癌化学療法剤の大部分は、DNA合成を直接、またはデオキシリボヌクレオチド三リン酸前駆体の生合成を抑制することにより間接的に、抑制して、DNA複製および随伴する細胞分裂を妨げることにより作用する（例えば、Gilmanら、「グッドマンとギルマンの治療薬の薬理学的基礎（Goodman and Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics）」、第8版（Pergamon Press, New York, 1990）を参照）。これらの薬剤には、アルキル化剤（例えばニトロソ尿素）、代謝拮抗薬（例えばメトトレキサートおよびヒドロキシ尿素）、ならびに他の薬剤（例えばエトポシド、カンプトテシン、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン）などが含まれ、必ずしも細胞周期特異的ではないが、DNA複製に対するこれらの効果ゆえにS期に細胞を死滅させる。他の薬剤、具体的にはコルヒチンおよびピンカアルカロイド（例えばピンラスチンおよびピンクリスチン）は、微小管アセンブリーを妨害して有糸分裂停止をもたらす。化学療法プロトコルは一般的に、治療効力を高めるために化学療法剤の組み合わせを投与することを含む。

【0015】

様々な化学療法剤を利用しうるが、化学療法には多数の欠点がある（例えば、Stockdale, 1998, 「癌患者管理の原理（Principles Of Cancer Patient Management）」 in Scientific American Medicine, vol.3, RubensteinおよびFederman編、第12章、第10節を参照）。ほとんど全ての化学療法剤は毒性があり、化学療法は、厳しい吐気、骨髄抑制、免疫抑制などの顕著なかつしばしば危険な副作用を起こす。さらに、化学療法剤を組み合わせ投与しても多くの腫瘍細胞は化学療法剤に耐性があるかまたは耐性を発現する。実際、治療プロトコルで使用される特定の化学療法剤に耐性のある細胞が、特定の処置に使用される薬物の作用機構と異なる機構により作用する他の薬物に対してさえも耐性のあることがしばしば立証されている。この現象は多面的薬剤または多剤耐性と呼ばれる。このように、薬剤耐性があるため、多くの癌は標準的な化学療法プロトコルに抵抗性のあることが判っている。

【0016】

別の癌治療法、特に標準的な癌治療、例えば外科手術、放射線療法、化学療法、およびホルモン療法に抵抗性があることが証明されている癌の治療法の必要性は非常に大きい。希望がもてる代替法は免疫療法であり、この方法では癌抗原特異的抗体が癌細胞を特異的に標的とする。免疫応答の特異性を利用することに向けて鋭意努力がなされていて、例えばハイブリドーマ技術が腫瘍選択的モノクローナル抗体の開発を可能にしており（Green M.C.ら、2000 Cancer Treat Rev., 26:269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51を参照）、この数年間、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）は最初の癌治療用のモノクローナル抗体：非ホジキンリンパ腫用のリツキシン（Rituxin）（抗CD20）および転移性乳癌用のハーセプチン（Herceptin）[抗(c-erb-2/HER-2)]を認可している（Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90）。しかし、例えば抗体依存性細胞傷害作用（「ADCC」）を媒介する、抗体エフェクター機能の能力は、このような治療に対する妨げとなる。従って、このような免疫治療の有効性を改善する方法が必要である。

【0017】

10

20

30

40

50

### 2.2.2 炎症性疾患と自己免疫疾患

炎症は、身体の白血球と化学物質が例えば細菌やウイルスなどの外来物質による感染から我々の身体を防御するプロセスである。通常、痛み、腫脹、罹患域の熱と赤みを特徴とする。サイトカインおよびプロスタグランジンとして知られる化学物質がこのプロセスを制御し、秩序正しいかつ自己限定的なカスケードで血液または罹患組織中に放出される。この化学物質の放出は損傷域または感染域への血流を増加し、そして赤みと熱を生じさせる。化学物質のいくらかは組織中への流体の漏れを引き起こして、腫脹をもたらす。この防御プロセスは神経を刺激して痛みを起こさせる。これらの変化は、関連領域で限られた期間だけ起こるときは、身体の利益に働く。

#### 【0018】

自己免疫および/または炎症性障害においては、免疫系は、戦うべき外来物質が存在しないときに炎症性応答を誘発し、身体の通常は防御免疫系が間違っ自身を攻撃することによりそれ自身の組織に障害を引き起こす。さまざまな方法で身体を冒す多種多様な自己免疫疾患が存在している。例えば、多発性硬化症の個体では脳が冒され、クローン病の個体では腸が冒され、慢性関節リウマチの個体では関節の滑膜、骨および軟骨が冒される。自己免疫疾患は1以上のタイプの身体組織の破壊を進めるので、器官の異常な増殖、または器官機能の変化が生じうる。自己免疫疾患は、1つの器官もしくは組織だけを冒したり、または複数の器官と組織を冒したりする。自己免疫疾患により通常冒される器官および組織としては、赤血球、血管、結合組織、内分泌腺（例えば、甲状腺または膵臓）、筋肉、関節、および皮膚が挙げられる。自己免疫疾患の例としては、限定するものではないが、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、全身エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、多発性硬化症、自己免疫内耳疾患、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブズ病、自己免疫肝炎、家族性腺腫様ポリープ症および潰瘍性大腸炎が挙げられる。

#### 【0019】

慢性関節リウマチ（RA）および若年性慢性関節リウマチは炎症性関節炎のタイプである。関節炎とは、関節における炎症を説明する一般用語である。全てではないにしても、一部のタイプの関節炎はねらいを誤った炎症の結果起こる。慢性関節リウマチに加えて、炎症を伴った他のタイプの関節炎としては、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、関節炎、および痛風性関節炎が挙げられる。慢性関節リウマチは、身体の両側の関節（例えば、両方の手、手首または膝）で起こる慢性関節炎のタイプである。この対称性が慢性関節リウマチをその他の関節炎から区別するのに役立つ。関節を冒すだけでなく、慢性関節リウマチは時に、皮膚、眼、肺、心臓、血液または神経をも冒しうる。

#### 【0020】

慢性関節リウマチは、世界の人口の約1%が罹患しており、不具にする可能性がある。米国における慢性関節リウマチの発生率はほぼ290万である。女性は男性より2～3倍多く罹患している。慢性関節リウマチが発症する典型的な年齢は25～50才である。若年性慢性関節リウマチには、71,000人の若い米国人（18歳以下）が罹患しており、少女のほうが少年より6倍多い。

#### 【0021】

慢性関節リウマチは、身体の免疫系が関節の滑液を分泌する滑膜を異物として誤って同定する場合に起こる自己免疫疾患である。炎症が生じ、関節内および周囲の軟骨と組織が損傷または破壊される。重症の事例では、この炎症が他の関節組織および周囲の軟骨に広がり、骨と軟骨を侵食または破壊して関節変形をもたらしうる。身体は損傷した組織を癒痕組織と置き換え、その結果、関節内の正常な空間が狭小になって、骨が互いに融合する。慢性関節リウマチは硬直、腫脹、疲労、貧血、体重減少、発熱、およびしばしば、身体障害の痛みを生じさせる。慢性関節リウマチのいくつかの共通した症状としては、覚醒時の1時間以上継続する関節硬直；特定の指または手首の腫脹；関節周囲の軟部組織の腫脹；および関節の両側の腫脹が挙げられる。腫脹は痛みを伴うかまたは伴わずに起こることもあり、かつ進行して悪化するかまたは進行前に数年間同じ状態で留まることもある。

10

20

30

40

50

## 【0022】

慢性関節リウマチの診断は、複数の要因の組み合わせに基づいて行われ、その要因としては、痛みのある関節の特定の位置と対称性、朝の関節硬直の存在、皮膚下の瘤および小節（リウマチ小節）の存在、慢性関節リウマチを示すX線試験結果、および/またはリウマチ因子と呼ばれる血液試験の陽性結果が挙げられる。全てではないにしても、慢性関節リウマチを患う多くの人は、リウマチ様因子抗体を血液中に有する。リウマチ様因子は慢性関節リウマチを患っていない人にも存在しうる。他の疾患もリウマチ様因子を血液中に産生させることがある。このような訳で、慢性関節リウマチの診断は複数の要因の組み合わせに基づいて行われ、血液中のリウマチ様因子の存在だけによることはない。

## 【0023】

典型的な経過をたどる前記疾患は、持続性であるが変動性の関節症状の1つであって、ほぼ10年後に患者の90%は骨と軟骨に構造上の障害を示しうる。小割合は完全に消滅する短期の病気を有し、そして他の小割合は多数の関節変形および時にはこの疾患の他の徴候を伴う重症の疾患を有する。炎症過程は関節内の骨と軟骨の侵食または破壊を引き起こす。慢性関節リウマチでは、持続的な抗原提示、T細胞の刺激、サイトカインの分泌、滑膜細胞の活性化、および関節破壊からなる自己免疫周期が存在する。この疾患は個体および社会の両方に対して大きな影響を与え、著しい痛み、損なわれた機能および身体障害だけでなく、数百万ドルに価する保健費用と賃金損失をも引き起こす（例えば、NIHウェブサイトおよびNIAIDウェブサイトを参照）。

## 【0024】

現在、関節炎に利用しうる治療法は、抗炎症薬または免疫抑制薬を用いて関節の炎症を軽減することに重点が置かれている。関節炎に最初に使われる治療薬は、通常、抗炎症薬、例えばアスピリン、イブプロフェンおよびCox-2阻害剤、例えばセレコキシブおよびロフェコキシブである。「第二選択薬物」(second line drug)には、金、メトトレキセートおよびステロイドが含まれる。これらは十分確立された関節炎の治療薬であるが、これらの治療薬だけではごく僅かの患者しか治らない。最近、慢性関節リウマチの病因の理解が進んで、メトトレキセートが、サイトカインに対する抗体または組換え可溶性受容体と組み合わせて使用されるに至っている。例えば、腫瘍壊死因子(TNF)に対する組換え可溶性受容体が、関節炎の治療でメトトレキセートと併用されている。しかし、メトトレキセートと抗TNF薬(例えば、TNF-に対する組換え可溶性受容体)の組み合わせで治療した患者のほぼ50%しか臨床上有意な改善を示さない。多数の患者は、治療にも関わらず不応のままである。慢性関節リウマチ患者にとって困難な治療上の問題は依然として残っている。多くの現行の治療法は高度の副作用発症があるかまたは疾患進行を完全に食い止めることができない。今までのところ、治療は理想に程遠く、しかも治癒はあり得ない。もっと効果的に慢性関節リウマチおよび他の自己免疫疾患を治療する新規の治療薬が必要とされている。

## 【0025】

## 2.2.3 感染性疾患

疾病を引き起こす病原体は5つのグループに分けられる。すなわち、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、および蠕虫(虫)である。これら病原体の注目すべき変種は適応免疫の2つのきわめて重大な特徴の自然選択をもたらした。まず第一に、広範囲のさまざまな病原体を認識できることの利点が、BおよびT細胞上の同等またはそれ以上の多様性の受容体を発生させた。第二に、病原体の異なる生息地および生活環が、ある範囲の異なるエフェクター機構によって反撃されねばならない。それぞれの病原体の顕著な特徴は、その伝播様式、その複製機構、その病因またはそれが疾病を引き起こす手段、およびそれが誘発する応答にある。

## 【0026】

天然痘、コレラ、チフス、赤痢、マラリアなどにより引き起こされるヒトの苦痛および死の記録は、感染性疾患を名高いものにしてきた。改善された公衆衛生、免疫化、および抗菌剤治療によりもたらされた防御の著しい成功にもかかわらず、感染性疾患は依然とし

10

20

30

40

50

て現代医学の共通した重大問題となっている。人間の最もありふれた疾患である風邪は感染性疾患であり、恐れられている現代病のAIDSもそうである。以前には神経変性疾患であると考えられていた、いくつかの慢性神経学的疾患も感染性であることが判明した。今後、感染性疾患が主な医学的問題として取り上げられ続けることに疑問の余地はない。

【0027】

大多数のヒトおよび動物の疾患は、上記の病原体のいずれかからの有害な感染または日和見感染より生じる (Belshe (編) 1984 Textbook of Human Virology, PSG Publishing, Littleton, MAを参照のこと)。

【0028】

感染性疾患の1つのカテゴリーは例えばウイルス感染である。呼吸器、CNS、皮膚、尿生殖器、眼、耳、免疫系、胃腸管、および筋骨格系を含めて、さまざまな組織のウイルス感染が、年齢を問わず、莫大な数のヒトを冒している (WyngaardenおよびSmith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18<sup>th</sup>版, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1750-1753 中の表328-2を参照のこと)。効果的な抗ウイルス治療のデザインに相当な努力が積み込まれてきたが、ウイルス感染は依然、世界中の何百万という人々の命を脅かし続けている。総じて、抗ウイルス薬を開発する試みはウイルス生活環のいくつかのステージに焦点が当てられてきた (例えば、HIVについて論じている、Mitsuyaら, 1991, FASEB J. 5: 2369-2381を参照のこと)。しかし、多くの最近の抗ウイルス薬を使用することに伴う一般的な欠点は、その有害な副作用、例えば宿主に対する毒性または特定のウイルス株による耐性である。

【発明の開示】

【0029】

### 3. 発明の概要

本発明は、一部には、酵母ディスプレイ系を用いて、Fc R受容体 (例えば、活性化性Fc R、抑制性Fc R) に対して変更された親和性を有する突然変異型ヒトIgG1重鎖Fc領域を同定したことに基づく。したがって、本発明は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変 (例えば置換、しかし挿入や欠失も含む) を有する変異型Fc領域を含んでなる分子、好ましくはポリペプチド、さらに好ましくは免疫グロブリン (例えば、抗体) に関する。ただし、前記アミノ酸の改変は、Fc Rに対する変異型Fc領域の親和性を変更する (例えば、増加または減少させる) ものである。好ましくは、前記1個以上のアミノ酸の改変は、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する変異型Fc領域の親和性を増加させるものである。好ましい実施形態において、本発明の分子はさらに、野生型Fc領域を含む対応する分子 (すなわち、Fc領域に1個以上のアミノ酸の改変を有することを除いて、本発明の分子と同じアミノ酸配列を有する) がFc R IIBと結合するより低い親和性で、Fc R IIBと特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する変異型Fc領域の親和性を増加させ、かつFc R IIBに対する変異型Fc領域の親和性を高めるものである。他の実施形態では、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する変異型Fc領域の親和性を増加させるが、Fc R IIBに対する変異型Fc領域の親和性を変更しないものである。

【0030】

本発明は、Fc領域のホモダイマーまたはヘテロダイマーである分子を包含する。Fc領域を含むヘテロダイマーは、2つのFc鎖が同じまたは異なる配列を有する分子を指す。ある実施形態において、変異型Fc領域を含むヘテロダイマー分子では、各鎖が他方の鎖とは異なる1以上の改変を有する。他の実施形態において、変異型Fc領域を含むヘテロダイマー分子では、一方の鎖が野生型Fc領域を含み、そして他方の鎖が1以上の改変を有する。ヘテロダイマーのFc含有分子を作製する方法は当技術分野で公知であり、本発明の範囲に包含される。

## 【0031】

いくつかの実施形態において、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、当業者に知られた標準的なアッセイ（例えば、*in vitro*アッセイ）で測定したとき、いずれのFc Rとも結合しないか、または、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、低下した親和性で結合する。特定の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIIAである。別の特定の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIAである。さらに別の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIBである。

10

## 【0032】

本発明の分子のFc Rに対する親和性および結合特性は、初めに、Fc-Fc R相互作用（すなわち、Fc領域とFc Rとの特異的結合）を測定するための当技術分野で公知の*in vitro*アッセイ（生化学または免疫学に基づいたアッセイ）、例えば、限定するものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイなどを用いて測定される（セクション5.2.1参照）。好ましくは、本発明の分子の結合特性はまた、1以上のFc Rメディエーターエフェクター細胞機能を測定するための*in vitro*機能アッセイによっても測定される（セクション5.2.6参照）。最も好ましい実施形態では、本発明の分子は、*in vitro*系アッセイにおける結合特性と同様の結合特性を*in vivo*モデル（例えば、本明細書に記載および開示されるもの）においても示すものである。しかしながら、本発明は、*in vitro*系アッセイで所望の表現型を示さないが*in vivo*では所望の表現型を示す本発明の分子を除外するものではない。

20

## 【0033】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIIAと結合するよりも高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、単独で329、331もしくは332位のいずれか1つの位置での置換を有することはなく、また、256、290、298、312、333、334、359、360、326もしくは430位のいずれにもアラニンを、330位にリシンを、339位にトレオニンを、320位にメチオニンを、326位にセリンを、326位にアスパラギンを、326位にアスパラギン酸を、326位にグルタミン酸を、334位にグルタミンを、334位にグルタミン酸を、334位にメチオニンを、334位にヒスチジンを、334位にバリンを、334位にロイシンを、または335位にリシンを含まないか、あるいは単独で前記のいずれか1つによる置換ではない、上記分子を包含する。

30

## 【0034】

別の特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIAと結合するよりも高い親和性でFc RIIAと特異的に結合するようになるが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変は、256、290、326、255、258、267、272、276、280、283、285、286、331、337、268、272もしくは430位のいずれにもアラニンを、268位にアスパラギンを、272位にグルタミンを、286位にグルタミン、セリンもしくはアスパラギン酸を、290位にセリンを、320位にメチオニン、グルタミン、グルタミン酸もしくはアルギニンを、322位にグルタミン酸を、326位にセリン、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸を、330位にリシンを、335位にグルタミンを、または301位にメチオニンを含まないか、あるいは単独で前記のいずれか1つによる置換ではない、上記分子を包含する。

40

## 【0035】

50

好ましい特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該分子はFc Rに対して改変された親和性をもつようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、Sondermannら(2000 Nature, 406: 267-273; その全体を参照により本明細書に組み入れる)により開示されるような、Fc-Fc R相互作用の結晶学的構造解析に基づいて、Fc Rと直接接触する位置での置換を有しない、上記分子を包含する。Fc Rと直接接触するFc領域内の位置の例は、アミノ酸234-239(ヒンジ部)、アミノ酸265-269(B/Cループ)、アミノ酸297-299(C'/Eループ)、およびアミノ酸327-332(F/Gループ)である。ある実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、結晶構造解析に基づいてFc Rと直接接触しない(例えば、Fc-Fc R結合部位内に存在しない)少なくとも1個の残基の改変を含んでなる。

10

## 【0036】

別の好ましい実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該分子は、野生型Fc領域を含む分子に対して変更された親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変は、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438、439位のいずれにも置換を含まないか、または単独で前記位置での置換ではない、上記分子を包含する。特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該分子は、野生型Fc領域を含む分子に対して変更された親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、255、258、267、269、270、276、278、280、283、285、289、292、293、294、295、296、300、303、305、307、309、322、329、332、331、337、338、340、373、376、416、419、434、435、437、438、439位のいずれにも置換を含まないか、または単独で前記位置での置換ではなく、また、256、290、298、312、333、334、359、360、326もしくは430位のいずれにもアラニンを、330位にリシンを、339位にトレオニンを、320位にメチオニンを、326位にセリンを、326位にアスパラギンを、326位にアスパラギン酸を、326位にグルタミン酸を、334位にグルタミンを、334位にグルタミン酸を、334位にメチオニンを、334位にヒスチジンを、334位にバリンを、334位にロイシンを、335位にリシンを、268位にアスパラギンを、272位にグルタミンを、286位にグルタミン、セリンもしくはアスパラギン酸を、290位にセリンを、320位にメチオニン、グルタミン、グルタミン酸もしくはアルギニンを、322位にグルタミン酸を、326位にセリン、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸を、330位にリシンを、335位にグルタミンを、または301位にメチオニンを有しない、上記分子を包含する。

20

30

## 【0037】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域が、268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438もしくは439位のいずれにも置換を含まないか、または単独で前記位置での置換ではなく、また、280位にヒスチジン、グルタミンもしくはチロシンを、290位にセリン、グリシン、トレオニンもしくはチロシンを、300位にロイシンもしくはイソロイシンを、294位にアスパラギンを、296位にプロリンを、298位にプロリン、アスパラギン、アスパラギン酸もしくはバリンを、295位にリシンを有しない、上記分子を包含する。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該分子は、野生型Fc領域を含む分子と比べて低下した親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338

40

50

、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438もしくは439位のいずれにも置換を含まないか、または単独で前記位置での置換ではない、上記分子を包含する。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該分子は、野生型Fc領域を含む分子と比べて増大した親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398もしくは430位のいずれにも置換を含まないか、または単独で前記位置での置換ではない、上記分子を包含する。

**【0038】**

具体的な実施形態において、本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含んでなり、該改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を少なくとも2倍増加させるものである。特定の実施形態では、本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含んでなり、該改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を2倍より高く、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも8倍、または少なくとも10倍増加させるものである。本発明の他の実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、野生型Fc領域を含む分子と比べて、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%高い親和性でFc RIIIAおよび/またはFc RIIAと特異的に結合する。そのような測定は好ましくはin vitroアッセイである。

**【0039】**

本発明は、活性化性および/または抑制性Fc 受容体に対して変更された親和性を有する分子を包含する。特に、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増大させるが、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を低下させるものである、上記分子を包含する。他の実施形態では、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を低下させる、かつ変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性をも低下させるものである、上記分子を包含する。さらに別の実施形態では、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性をも低下させるが、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を変更しないものである、上記分子を包含する。

**【0040】**

特定の実施形態において、本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含んでなり、該改変は、Fc RIIIAおよびFc RIIBと野生型の親和性で結合する野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を増加させるがFc RIIBに対する親和性を減少させるものである。ある実施形態において、1個以上のアミノ酸の改変は、256、298、333または334位のいずれの位置でもアラニンによる置換ではない。

**【0041】**

別の特定の実施形態において、本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含んでなり、該改変は、Fc RIIIAおよびFc RIIBと野生型の親和性で結合する野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIAに対する親和性を増加させるがFc RIIBに対する親和性を減少させるものである。ある実施形態において、1個以上のアミノ酸の改変は、320位でのアルギニンによる置換ではない。

## 【0042】

最も好ましい実施形態において、活性化性および/または抑制性受容体に対して変更された親和性を有する変異型Fc領域を含む本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変を有し、該改変は、288位でのアスパラギンによる置換、330位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc10) (表5参照); または334位でのグルタミン酸による置換、359位でのアスパラギンによる置換、366位でのセリンによる置換 (MgFc13); または316位でのアスパラギン酸による置換、378位でのバリンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換 (MgFc27); または392位でのトレオニンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc38); または221位でのグルタミン酸による置換、270位でのグルタミン酸による置換、308位でのアラニンによる置換、311位でのヒスチジンによる置換、396位でのロイシンによる置換、および402位でのアスパラギン酸による置換 (MgFc42); または240位でのアラニンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc52); または410位でのヒスチジンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc53); または243位でのロイシンによる置換、305位でのイソロイシンによる置換、378位でのアスパラギン酸による置換、404位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc54); または255位でのイソロイシンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc55); または370位でのグルタミン酸による置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc59)である。

10

## 【0043】

Fc R親和性が変更された(例えば、Fc RIIIA親和性が高められた)変異型Fc領域を含んでなる分子をスクリーニングして同定するための好適な方法は、酵母表面ディスプレイ法である(BoderおよびWittrup, 2000, Methods in Enzymology, 328: 430-444を参照されたい; その全体を参照により本明細書に組み入れる)。具体的には、酵母表面ディスプレイ法は、Fc変異体を含むポリペプチドがFc Rと相互作用するために接近しやすい形で酵母細胞壁上に発現される遺伝子的方法である。本発明の変異型Fc含有ポリペプチドの酵母表面ディスプレイは、当業者に公知の技法のいずれかまたは本明細書に記載される特定の方法に従って行なうことができる。

20

## 【0044】

本発明の一態様は、望ましい結合特性(例えば、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIIAと結合するよりも高い親和性でFc RIIIAと結合する変異型Fc融合タンパク質の能力)を有する変異型Fc融合タンパク質を選択するための方法を提供する。変異型Fc融合タンパク質をディスプレイする酵母細胞は、結合相互作用を評価するための当業者に公知の生化学的または免疫学的アッセイによりスクリーニングして、特徴づけることができる。具体的な実施形態では、1以上の生化学的アッセイ、例えばELISAアッセイを用いて、変異型Fc融合タンパク質のスクリーニングを行なう。

30

## 【0045】

好ましい実施形態において、Fc R親和性が変更された(例えば、Fc RIIIA親和性が高められた)変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定は、1以上の生化学的アッセイと共に本明細書に記載の酵母ディスプレイ法を用いて、好ましくはハイスループット方式で実施する。1以上の生化学的アッセイは、Fc-Fc R相互作用(すなわち、Fc領域とFc Rとの特異的結合)を確認するための当技術分野で公知のどのようなアッセイでもよく、例えば、限定するものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイ、アフィニティークロマトグラフィー、および平衡透析などがある。いくつかの実施形態では、Fc R親和性が変更された(例えば、Fc RIIIA親和性が高められた)変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定は、1以上の機能的アッセイと共に本明細書に記載の酵母ディスプレイ法を用いて、好ましくはハイスループット方式で実施する。機能的アッセイは、1以上のFc R媒介エフェクター細胞機能の特徴づけるための当技術分野で公知のどのようなアッセイでもよく、例えば本明細書のセクション5.2.6に記載されるものがある。本発明の方法に従って用いることのできるエフェクター細胞機能の例としては、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、抗体依存性食作用、食作用、オプ

40

50

ソニン化、オプソノファゴサイトーシス (opsonophagocytosis)、細胞結合、ロゼット形成、C1q結合、および補体依存性細胞傷害作用があるが、これらに限らない。いくつかの実施形態では、Fc R親和性が変更された (例えば、Fc RIIIA親和性が高められた) 変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定は、1以上の機能的アッセイと共にまたはそれと並行して、1以上の生化学的アッセイと共に本明細書に記載の酵母ディスプレイ法を用いて、好ましくはハイスループット方式で実施する。

【0046】

本発明に従ってFc R-Fc相互作用を測定するための好適な方法は、本発明者らが開発したアッセイであり、それは、受容体のそのリガンドに対する親和性がもともと弱く、例えばFc RIIBおよびFc RIIIAに対する親和性がマイクロモル範囲であるにもかかわらず、相互作用の検出ならびに定量を可能にするものである。この方法は、複合体化していないFc Rと比べて、Fc領域に対して改善された結合力を有するFc R複合体 (例えば、Fc RIIA、Fc RIIB) の形成を含む。特定の実施形態において、本発明は、モノマーFc RのFc領域に対する親和性と比べて、Fc領域に対する親和性が高められたテトラマーFc R複合体を作製する方法を包含する。前記方法は、(i)15アミノ酸AVITAG配列がFc Rの可溶性領域に機能的に連結されるような、融合タンパク質を製造すること、(ii)得られたタンパク質を、大腸菌BirA酵素を用いてビオチン化すること、(iii)得られたビオチン化タンパク質をストレプトアビジン-フィコエリトリンと適切なモル比で混合して、テトラマーFc R複合体を形成させること、を含んでなる。

【0047】

本発明の好ましい実施形態では、Fc領域を含むポリペプチドは、複合体化されていないモノマーFc Rと結合するよりも少なくとも8倍高い親和性で、本発明の方法により形成されたテトラマーFc R複合体と結合する。Fc領域を含むポリペプチドとテトラマーFc R複合体との結合は、当業者に公知の標準方法、例えば蛍光活性化セルソーティング(FACS)、ラジオイムノアッセイ、ELISAアッセイなどを用いて測定することができる。

【0048】

本発明は、Fc領域を含む分子の官能性を細胞系または無細胞系アッセイで測定するための上記方法により形成された免疫複合体の使用を包含する。

【0049】

特定の実施形態において、本発明は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性が増大した変異型Fc領域を含む改変された免疫グロブリンを提供する。こうした免疫グロブリンには、もともとFc R結合領域 (例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域) を含むIgG分子、またはFc R結合領域 (例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域) を含むように遺伝子操作された免疫グロブリン誘導體が含まれる。本発明の改変された免疫グロブリンは、抗原と結合し、好ましくは免疫特異的に結合し、すなわち特異的な抗原-抗体結合をアッセイするための当技術分野で周知のイムノアッセイで測定したとき非特異的結合に対しては競合せず、かつFc R結合領域 (例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域) を含む、あらゆる免疫グロブリン分子を包含する。かかる抗体としては、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異的、多重特異的、ヒト、ヒト化、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、ジスルフィド架橋Fv、およびVLもしくはVHドメインのいずれかまたは抗原と特異的に結合する相補性決定領域(CDR)さえも含む、特定の場合にはFc R結合領域を含むように遺伝子操作されたまたはFc R結合領域に融合された、フラグメントが含まれる。

【0050】

ある実施形態において、本発明は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性が増大した変異型Fc領域を含む免疫グロブリンであって、結果的に、増大したエフェクター機能 (例えば、抗体依存性細胞傷害作用) を有するようになる、上記免疫グロブリンを包含する。本発明の分子のエフェクター機能は、本明細書に記載のまたは当業者に公知のアッセイを用いて調べることができる。いくつかの実施形態では、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性が増大した変異型Fc領域を含む免疫グロブリンは、野生型に対し

10

20

30

40

50

て少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、または少なくとも100倍増大したADCC活性を有する。

【0051】

本発明は、ヒトまたはヒト化治療用抗体（例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体）をFc領域において1個以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含する。ただし、前記改変は、Fc R活性化受容体および/またはFc R抑制受容体に対する該治療用抗体の親和性をモジュレートするものである。一実施形態では、本発明は、ヒトまたはヒト化治療用抗体（例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体）をFc領域において1個以上のアミノ酸残基の改変により操作することに関し、その際、前記改変は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対するFc領域の親和性を増大させるものである。別の実施形態では、本発明は、ヒトまたはヒト化治療用抗体（例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体）をFc領域において1個以上のアミノ酸残基の改変により操作することに関し、その際、前記改変は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対するFc領域の親和性を増大させ、さらにFc RIIBに対するFc領域の親和性を減少させるものである。操作された治療用抗体はさらに、当業者に公知の標準的なアッセイで測定して、増大したエフェクター機能、例えば増大したADCC活性、食作用活性などを有する。

10

【0052】

特定の実施形態において、本発明は、Her2/neu原がん遺伝子に特異的なヒト化モノクローナル抗体（例えば、Carterら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9に開示されるようなAb4D5ヒト化抗体）を1個以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含する。ただし、前記改変は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対するFc領域の親和性を増大させるものである。別の特定の実施形態では、ヒト化Her2/neuモノクローナル抗体の改変はさらに、Fc RIIBに対するFc領域の親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、Her2/neuに特異的な操作されたヒト化モノクローナル抗体はさらに、本明細書に開示しかつ例示する当技術分野で公知の標準アッセイにより測定して、増大したエフェクター機能を有する。

20

【0053】

別の特定の実施形態において、本発明は、マウス・ヒトキメラ抗CD20モノクローナル抗体2H7を1個以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含する。ただし、前記改変は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対するFc領域の親和性を増大させるものである。別の特定の実施形態では、抗CD20モノクローナル抗体2H7の改変はさらに、Fc RIIBに対するFc領域の親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、操作された抗CD20モノクローナル抗体2H7はさらに、本明細書に開示しかつ例示する当技術分野で公知の標準アッセイにより測定して、増大したエフェクター機能を有する。

30

【0054】

別の特定の実施形態において、本発明は、抗Fc RIIB抗体（2002年8月12日付けの米国仮特許出願第60/403,266号および2003年8月14日付けの米国特許出願第10/643,857号（代理人整理番号011183-010-999）に開示される抗体を含むが、それらに限定されない）を1個以上のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含する。ただし、前記改変は、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対するFc領域の親和性を増大させるものである。本発明の方法により操作しうる抗Fc RIIB抗体の例としては、ATCC受託番号PTA-4591を有する2B6モノクローナル抗体、およびATCC受託番号PTA-4592を有する3H7である（ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011に寄託された）。別の特定の実施形態では、抗Fc RIIB抗体の改変はさらに、Fc RIIBに対するFc領域の親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、操作された抗Fc RIIB抗体はさらに、本明細書に開示しかつ例示する当技術分野で公知の標準アッセイにより測定して、増大したエフェクター機能を有する。特定の実施形態では、2B6モノクローナル抗体は、334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンによる改変（MgFc13）；または316位でのアスパラギン酸、378位でのバリン、および399

40

50

位でのグルタミン酸による置換 (MgFc27); または243位でのイソロイシン、378位でのロイシン、および420位でのバリンによる置換 (MgFc29); または392位でのトレオニン、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc38); または221位でのグルタミン酸、270位でのグルタミン酸、308位でのアラニン、311位でのヒスチジン、396位でのロイシン、および402位でのアスパラギン酸による置換 (MgFc42); または410位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc53); または243位でのロイシン、305位でのイソロイシン、378位でのアスパラギン酸、404位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc54); または255位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc55); または370位でのグルタミン酸、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc59)を含む。

10

#### 【0055】

本発明はまた、本発明の方法により同定された、ポリペプチドおよび抗体を含めて、本発明の分子をコードするポリヌクレオチドを包含する。本発明の分子をコードするポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の方法により、決定された該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列から得ることができる。本発明は、本発明の分子をコードする単離された核酸に関する。本発明はまた、前記核酸を含有するベクターを提供する。本発明はさらに、本発明のベクターまたはポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を提供する。

#### 【0056】

本発明はさらに、本発明の分子の製造方法を提供する。本発明の分子は、ポリペプチドおよび抗体を含めて、当業者に公知の方法、特に組換え発現により製造することができる。特定の実施形態では、本発明は、本発明の分子を組換えにより製造する方法を提供し、この方法は、(i)該分子をコードする核酸を含有する宿主細胞を培地中で、該分子の発現に適する条件下で培養すること、(ii)該培地から該分子を回収すること、を含んでなる。

20

#### 【0057】

本発明の方法により同定された分子は、疾患、障害または感染に関連した1以上の症状を予防、治療または軽減するのに有用である。本発明の分子は、Fc Rにより媒介されるエフェクター細胞機能(例えば、ADCC)の増大した効力が望まれる疾患または障害(例えば、癌、感染性疾患)の治療または予防に特に有用であり、また、治療用抗体(その効果がADCCにより媒介される)の治療効力を高めるのに特に有用である。

#### 【0058】

一実施形態において、本発明は、癌抗原により特徴づけられる癌を有する患者においてその癌を治療する方法を包含し、この方法は、治療に有効な量の、該癌抗原と結合する治療用抗体(本発明の方法に従って操作されたもの)を投与することを含んでなる。特定の実施形態では、本発明は、癌抗原により特徴づけられる癌を有する患者においてその癌を治療する方法を包含し、この方法は、治療に有効な量の、該癌抗原と特異的に結合する治療用抗体を投与することを含んでなり、該治療用抗体は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含み、結果的に、該治療用抗体は、野生型Fc領域を含む治療用抗体がFc IIIAと結合するよりも高い親和性でFc IIIAと特異的に結合するようになる。ただし、前記変異型Fc領域は、329、331または332位に置換を有しないものであり、また、256、290、298、312、333、334、359、360または430位のいずれにもアラニンを、330位にリシンを、339位にトレオニンを、320位にメチオニンを、326位にセリンを、326位にアスパラギンを、326位にアスパラギン酸を、326位にグルタミン酸を、334位にグルタミンを、334位にグルタミン酸を、334位にメチオニンを、334位にヒスチジンを、334位にバリンを、または334位にロイシンを有しないものである。別の特定の実施形態では、本発明は、癌抗原により特徴づけられる癌を有する患者においてその癌を治療する方法を包含し、この方法は、治療に有効な量の、該癌抗原と特異的に結合する治療用抗体を投与することを含んでなり、該治療用抗体は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含み、結果的に、該治療用抗体は、野生型Fc領域を含む治療用抗体がFc IIIAと結合するよりも高い親和性でFc IIIAと特異的に結合するようになり、さらに該治療用抗体は、野生型Fc領域を含む治療用抗体がFc IIB

30

40

50

と結合するよりも低い親和性でFc IIBと特異的に結合するようになる。ただし、前記変異型Fc領域は、256、298、333または334位のいずれにもアラニンを含んでいないものである。本発明は、癌抗原により特徴づけられる患者の癌を治療する方法を包含し、この方法は、治療に有効な量の、該癌抗原と特異的に結合する治療用抗体を投与することを含んでなり、該治療用抗体は変異型Fc領域を含み、その結果として、該抗体は増大したADCC活性をもつようになる。

【0059】

本発明は、患者において自己免疫疾患および/または炎症性疾患を治療する方法を包含し、この方法は、患者に、治療に有効な量の変異型Fc領域を含む分子を投与することを含んでなり、ここで、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、該分子は、野生型Fc領域を含む対応する分子よりも高い親和性でFc IIBと特異的に結合し、さらに、野生型Fc領域を含む対応する分子よりも低い親和性でFc IIIAと特異的に結合するようになり、そして該分子は免疫複合体（例えば、抗原/抗体複合体）と結合する。本発明は、前記疾患の治療および/または予防に用いられる1種以上の追加の予防剤または治療剤（例えば、免疫調節剤、抗炎症剤）を投与することをさらに含む、自己免疫疾患および/または炎症性疾患の治療方法を包含する。

【0060】

本発明はまた、被験者における感染性疾患の治療または予防方法を包含し、この方法は、病原体またはその細胞性受容体と結合する1種以上の本発明の分子を治療または予防に有効な量で投与することを含んでなる。本発明の分子により治療または予防する感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物を含むがこれらに限らない病原体により引き起こされる。

【0061】

本発明の一態様によると、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、病原体（例えば、病原性タンパク質）に対して増大した抗体エフェクター機能を有する。特定の実施形態において、本発明の分子は、感染性疾患を引き起こす病原体の食作用および/またはオプソニン化を高めることによって、感染性疾患に対する治療効果を増強する。別の特定の実施形態では、本発明の分子は、感染性疾患を引き起こす感染細胞のADCCを高めることによって、感染性疾患に対する治療効果を増強する。

【0062】

いくつかの実施形態においては、本発明の分子を、治療または予防に有効な量の、感染性疾患を治療および/または予防するための当業者に知られた1種以上の追加の治療剤と組み合わせ投与することができる。本発明は、本発明の分子を、感染性疾患を治療および/または予防するための当業者に知られた抗生物質と併用することを包含する。

【0063】

本発明は、本発明の分子（例えば、変異型Fc領域を含むポリペプチド、変異型Fc領域を含む免疫グロブリン、本発明に従って操作された治療用抗体）および製薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、抗癌剤、抗炎症剤、免疫調節剤を含むがこれらに限らない1種以上の追加の治療剤をさらに含有する医薬組成物を提供する。

さらに具体的には、本発明は、以下の特徴を有する。

〔1〕抗原結合領域および変異型Fc領域を含んでなる抗体であって、該変異型Fc領域は  
(A)抗体の野生型Fc領域に対して396位でのアミノ酸の改変を含むことにより該野生型Fc領域とは異なり、該位置はKabatのEUインデックスに従い番号付けられており、かつ  
(B)該野生型Fc領域に対して増大した親和性でFc Rと結合する、  
上記抗体。

〔2〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210位、215位、217位、246位、250位、255位、268位、288位、290位または419位でのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔1〕に記載の抗体。

〔3〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210M、217S、227S、240A、242F、244H、

10

20

30

40

50

246T、247S、248M、250A、250S、255I、255L、258D、268D、268N、303I、305L、323I、326I、334N、358P、370E、375C、379M、384K、392T、400F、410H、419H、419L、または427Aでのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔1〕に記載の抗体。

〔4〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

- (1) 221E、270E、308A、311Hおよび402D；
- (2) 319Fおよび352L；
- (3) 288R、307Aおよび344E；
- (4) 210Mおよび261N；ならびに
- (5) 243L、305I、378Dおよび404S

10

からなる群より選択されるさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔1〕に記載の抗体。

〔5〕前記Fc RがFc RIIIAである、上記〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の抗体。

〔6〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域と比較して、Fc RIIIBに対して低下した親和性を有する、上記〔5〕に記載の抗体。

〔7〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

- (1) 221E、270E、308A、311H、396Lおよび402D；
- (2) 243L、305I、376D、404Sおよび396L；
- (3) 255Iおよび396L；
- (4) 370Eおよび396L；
- (5) 392Tおよび396L；ならびに
- (6) 410Hおよび396L

20

からなる群より選択されるアミノ酸改変を含む、上記〔6〕に記載の抗体。

〔8〕前記変異型Fc領域が、野生型Fc領域よりも少なくとも2倍大きな親和性でFc RIIIAに特異的に結合する、上記〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の抗体。

〔9〕前記抗原結合領域が癌抗原または感染性疾患に関連する抗原と結合する、上記〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の抗体。

〔10〕前記抗体が癌抗原に結合し、抗体依存性細胞傷害を、野生型Fc領域を含む抗体よりも2倍効率的に媒介する、上記〔9〕に記載の抗体。

〔11〕前記抗体が癌抗原に結合し、該癌抗原が、HER-2/neu、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、MUM-1、CDK4、MUC-1、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p15、 $\beta$ -カテニン、ヒトパピローマウイルス-E6、またはヒトパピローマウイルス-E7である、上記〔9〕に記載の抗体。

30

〔12〕治療に有効な量の上記〔9〕に記載の抗体および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

〔13〕前記抗体が癌抗原に結合し、前記組成物が、化学療法剤、放射線療法剤、ホルモン療法剤、および免疫療法剤からなる群より選択されるさらなる抗癌剤をさらに含む、上記〔12〕に記載の医薬組成物。

〔14〕癌抗原を特徴とする癌を有する患者の癌治療での使用のための、上記〔1〕～〔11〕のいずれか1つに記載の抗体または上記〔12〕もしくは〔13〕に記載の医薬組成物。

40

〔15〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210位、215位、217位、246位、250位、255位、268位、288位、290位または419位でのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔16〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210M、217S、227S、240A、242F、244H、246T、247S、248M、250A、250S、255I、255L、258D、268D、268N、303I、305L、323I、326I、334N、358P、370E、375C、379M、384K、392T、400F、410H、419H、419L、または427Aでのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔17〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

50

- (1) 221E、270E、308A、311Hおよび402D；
- (2) 319Fおよび352L；
- (3) 288R、307Aおよび344E；
- (4) 210Mおよび261N；ならびに
- (5) 243L、305I、378Dおよび404S

からなる群より選択されるさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔18〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

- (1) 221E、270E、308A、311H、396Lおよび402D；
- (2) 243L、305I、376D、404Sおよび396L；
- (3) 255Iおよび396L；
- (4) 370Eおよび396L；
- (5) 392Tおよび396L；ならびに
- (6) 410Hおよび396L

からなる群より選択されるアミノ酸改変を含む、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔19〕前記変異型Fc領域が、野生型Fc領域よりも少なくとも2倍大きな親和性でFcRIIAに特異的に結合する、上記〔14〕～〔18〕のいずれか1つに記載の抗体または医薬組成物。

〔20〕前記抗体が、抗体依存性細胞傷害を、野生型Fc領域を含む抗体よりも2倍効率的に媒介する、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔21〕前記癌抗原が、HER-2/neu、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、MUM-1、CDK4、MUC-1、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p15、-カテニン、ヒトパピローマウイルス-E6、またはヒトパピローマウイルス-E7である、上記〔14〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔22〕前記抗体が、感染性疾患に関連する抗原に結合する、該疾患関連抗原を特徴とする感染性疾患を有する患者での感染性疾患の治療での使用のための、上記〔9〕に記載の抗体または上記〔12〕に記載の医薬組成物。

〔23〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210位、215位、217位、246位、250位、255位、268位、288位、290位または419位でのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔22〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔24〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の210M、217S、227S、240A、242F、244H、246T、247S、248M、250A、250S、255I、255L、258D、268D、268N、303I、305L、323I、326I、334N、358P、370E、375C、379M、384K、392T、400F、410H、419H、419L、または427Aでのさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔22〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔25〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

- (1) 221E、270E、308A、311Hおよび402D；
- (2) 319Fおよび352L；
- (3) 288R、307Aおよび344E；
- (4) 210Mおよび261N；ならびに
- (5) 243L、305I、378Dおよび404S

からなる群より選択されるさらなるアミノ酸改変を含むことにより該野生型Fc領域と異なっている、上記〔22〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔26〕前記変異型Fc領域が、前記野生型Fc領域の、

- (1) 221E、270E、308A、311H、396Lおよび402D；
- (2) 243L、305I、376D、404Sおよび396L；
- (3) 255Iおよび396L；
- (4) 370Eおよび396L；
- (5) 392Tおよび396L；ならびに

10

20

30

40

50

## (6) 410Hおよび396L

からなる群より選択されるアミノ酸改変を含む、上記〔22〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔27〕野生型Fc領域がヒトIgGのFc領域である、上記〔1〕～〔26〕のいずれか1つに記載の抗体または医薬組成物。

〔28〕前記ヒトIgG Fc領域が、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域である、上記〔27〕に記載の抗体または医薬組成物。

〔29〕396位での前記アミノ酸改変が該位置でのロイシンによる置換である、上記〔1〕～〔11〕および〔15〕～〔28〕のいずれか1つに記載の抗体。

【0064】

10

## 3.1 定義

本明細書中で用いる「Fc領域」なる語は、IgG重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。境界はわずかに変化しうるが、ヒトIgG重鎖のFc領域は、Cys226からカルボキシ末端にまで及ぶと定義される。IgGのFc領域は、2つの定常ドメイン、CH2およびCH3、を含む。ヒトIgG Fc領域のCH2ドメインは、通常、アミノ酸231からアミノ酸341まで延びている。ヒトIgG Fc領域のCH3ドメインは、通常、アミノ酸342からアミノ酸447まで延びている。IgGのFc領域は、2つの定常ドメイン、CH2およびCH3、を含む。ヒトIgG Fc領域のCH2ドメイン（「C<sub>2</sub>」ドメインとも呼ばれる）は、通常、アミノ酸231-340まで延びている。CH2ドメインは、それがもう一つのドメインと密接に対合していないという点でユニークである。それどころか、インタクトな天然IgGの2つのCH2ドメイン間には、2つのN-結合分岐糖鎖が介在している。

20

【0065】

本明細書全体を通して、IgG重鎖中の残基の番号付けは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)（参照により本明細書に組み入れる）におけるようなEUインデックスのそれである。「KabatにおけるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の番号付けを指す。

【0066】

「ヒンジ部」は、一般的に、ヒトIgG1のGlu216からPro230までの広がりとして定義される。他のIgGアイソタイプのヒンジ部は、重鎖間S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を同じ位置に配置することにより、IgG1配列とアライメントさせることができる。

30

【0067】

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、モノクローナル、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、camelized 抗体、一本鎖Fv (scFv)、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合二重特異的Fv (sdFv)、細胞内発現抗体 (intrabody)、および抗イデオタイプ (抗Id) 抗体 (例えば、本発明の抗体に対する抗Idおよび抗-抗Id抗体を含む)、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを意味する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫活性フラグメント、すなわち抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子はいずれのタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス (例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IGA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>) またはサブクラスであってもよい。

40

【0068】

本明細書中で用いる、ポリペプチドまたはタンパク質に関する「誘導体」なる語は、アミノ酸残基の置換、欠失または付加の導入により改変されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはタンパク質を指す。本明細書中で用いる「誘導体」はまた、改変されている、すなわち、ポリペプチドまたはタンパク質への任意のタイプの分子の共有結合により改変されているポリペプチドまたはタンパク質を意味する。例えば、限定するものではないが、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合などにより改変することができる。誘導体ポリペプチドまたはタンパク質は、限定するものでないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシ

50

ンの代謝的合成などを含めて、当業者に公知の技術を用いる化学的修飾により製造することができる。さらに、誘導体ポリペプチドまたはタンパク質誘導体は、それが誘導される元のポリペプチドまたはタンパク質と同様のまたは同一の機能を保持する。

【0069】

本明細書中で用いる、非タンパク質誘導体に関しての「誘導体」なる語は、第1の有機または無機分子の構造に基づいて形成された第2の有機または無機分子を意味する。有機分子の誘導体は、限定するものではないが、例えば、ヒドロキシル、メチル、エチル、カルボキシルまたはアミン基の付加または欠失により、改変された分子を含む。有機分子はまた、エステル化、アルキル化および/またはリン酸化されてもよい。

【0070】

本明細書中で用いる「障害」および「疾患」は、互換的に使用され、被験者の症状を意味する。特に、用語「自己免疫疾患」は「自己免疫障害」と互換的に使用され、被験者自身の細胞、組織および/または器官に対する被験者の免疫反応によって生じた細胞、組織および/または器官の損傷により特徴づけられる被験者の症状を意味する。用語「炎症性疾患」は用語「炎症性障害」と互換的に使用され、炎症、好ましくは慢性炎症により特徴づけられる被験者の症状を意味する。自己免疫障害は炎症を伴っても伴わなくてもよい。さらに、炎症は自己免疫障害に起因してもしなくてもよい。従って、ある特定の障害は自己免疫と炎症性障害の両方により特徴づけられてもよい。

【0071】

本明細書中で用いる「癌」なる語は、異常な無制御の細胞増殖から生じる新生物または腫瘍を意味する。本明細書中で用いる癌は、明確に白血病およびリンパ腫を含む。いくつかの実施形態において、癌は局在化したままで存在する良性腫瘍を意味する。他の実施形態において、癌は、近隣の身体構造に侵入して破壊し、離れた部位に広がる悪性腫瘍を意味する。いくつかの実施形態では、癌は特定の癌抗原を随伴する。

【0072】

本明細書中で用いる「免疫調節剤」およびその変形は、宿主の免疫系をモジュレートする薬剤を意味する。ある特定の実施形態においては、免疫調節剤は免疫抑制剤である。ある特定の実施形態においては、免疫調節剤は免疫賦活剤である。免疫調節剤としては、限定するものではないが、小分子、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、無機分子、ミメチック、および有機分子を含む。

【0073】

本明細書中で用いる「エピトープ」なる語は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおいて抗原性または免疫原性を有するポリペプチドまたはタンパク質の断片を意味する。免疫原性を有するエピトープは、動物における抗体応答を誘発するポリペプチドまたはタンパク質の断片である。抗原性を有するエピトープは、当業者に周知の方法、例えばイムノアッセイにより確認される、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドまたはタンパク質の断片である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

【0074】

本明細書中で用いる「断片」とは、他のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、少なくとも150個連続したアミノ酸残基、少なくとも175個連続したアミノ酸残基、少なくとも200個連続したアミノ酸残基、または少なくとも250個連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。特定の実施形態においては、ポリペプチドの断片は、そのポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

【0075】

本明細書中で用いる「核酸」および「ヌクレオチド配列」なる語は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNAおよびRNA分子の組合せまたはハイブリッドDNA/RNA分子、およびDNAまたはRNA分子の類似体を含む。このような類似体は、例えば、限定するものではないが、イノシンまたはトリチル化塩基を含むヌクレオチド類似体を用いて作製することができる。このような類似体はまた、分子に有益な属性を与える（例えば、ヌクレアーゼ耐性を付与したり、細胞膜を通過する能力を高める）改変された骨格を有するDNAまたはRNA分子を含んでもよい。核酸またはヌクレオチド配列は一本鎖、または二本鎖であってもよいし、一本鎖部分と二本鎖部分の両方を含んでもよく、また、三本鎖部分を含んでもよい。しかし、好ましくは二本鎖DNAである。

【0076】

10

本明細書中で用いる「治療上有効な量」とは、疾患または障害を治療または管理するのに十分な治療剤の量を意味する。治療上有効な量は、疾患の発症を遅延させるかまたは最小限にする（例えば、癌の拡大を遅延させるかまたは最小限にする）のに十分な治療剤の量を指すこともある。治療上有効な量は、疾患の治療または管理において治療上の利益を与える治療剤の量を意味してもよい。さらに、本発明の治療剤についての治療上有効な量は、疾患の治療または管理において治療上の利益を与える、単独でのまたは他の治療法と組み合わせた治療剤の量を意味する。

【0077】

本明細書中で用いる「予防剤」なる語は、障害の予防に、または障害の再発または拡大の予防に使用される薬剤を意味する。予防上有効な量は、過増殖性疾患（特に癌）の再発または拡大、または患者（限定するものではないが、過増殖性疾患の素因がある患者、例えば、遺伝的に癌の素因があるかまたは以前に発癌物質に曝された患者を含む）におけるそれらの発生を予防するのに十分な予防剤の量を意味する。予防上有効な量はまた、疾患の予防において予防上の利益を与える予防剤の量を意味してもよい。さらに、本発明の予防剤についての予防上有効な量は、疾患の予防において予防上の利益を与える、単独でのまたは他の薬剤と組み合わせた予防剤の量を意味する。

20

【0078】

本明細書中で用いる「予防」とは、予防剤または治療剤の投与から得られる、被験者における障害の1以上の症状の再発または発症の予防を意味する。

【0079】

30

本明細書中で用いる「組み合わせて」は、2種以上の予防剤および/または治療剤の使用を意味する。用語「組み合わせて」は、予防剤および/または治療剤を、障害のある被験者に投与する順序を制限するものではない。第1の予防剤または治療剤は、障害のある被験者に第2の予防剤または治療剤を投与する前（例えば5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週、または12週前）に、または第2の予防剤または治療剤を投与すると同時に、または第2の予防剤または治療剤を投与した後（例えば5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週、または12週後）に、投与することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0080】

【図1】組換え可溶性Fc RのSDS-PAGE解析を示す。組換え可溶性Fc Rタンパク質の純度を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。ゲルをクーマシーブルーで染色した。レーン1: 精製した組換え可溶性Fc RIIIA; レーン2: 分子量マーカー; レーン3: 分子量マーカー; レーン4: 精製した組換え可溶性Fc RIIIB。ダッシュ記号(-)はマーカーの分子量を指し、上から下へ、それぞれ98、50、36、および22 kDaの分子量に相当する。

【図2】組換え可溶性Fc RのELISAアッセイを示す。凝集IgGおよびモノマーIgGへの精製組換え可溶性Fc RIIIAの直接結合をELISAアッセイで測定した。凝集ビオチン化IgG（黒塗り四角）およびビオチン化モノマーIgG（ ）の結合を比較する。3G8抗体は凝集ビオチン化IgGのFc RIIIAへの結合をブロックする（X）。

50

【図3】ELISAアッセイを用いたFc RIIIAテトラマー複合体の特徴づけを示す。A. 可溶性テトラマーFc RIIIA複合体は、可溶性モノマーヒトIgGと特異的に結合する。可溶性テトラマーFc RIIIAのヒトIgGへの結合は、マウス抗Fc RIIIAモノクローナル抗体3G8 ( )によりブロックされる；D265A突然変異を有する4-4-20モノクローナル抗体は、可溶性テトラマーFc RIIIAの凝集ヒトIgGへの結合をブロックすることができなかった ( )。B. 可溶性テトラマーFc RIIIA複合体の可溶性モノマーヒトIgGへの結合 (黒塗り四角)が、モノマー可溶性Fc RIIIAの可溶性モノマーヒトIgGへの結合 ( )と比較される。

【図4】磁性ビーズアッセイを用いたFc RIIIAテトラマー複合体の特徴づけを示す。A. Fc RIIIA複合体：2つのFc RIIIA (黒塗りの形状)がモノクローナル抗体DJ130c (第1抗体)により結合される；抗マウスF(ab)2がPE (円)にコンジュゲートされる。B. Fc被覆ビーズに結合されたFc RIIIAのFACS解析：(a)ビーズのみ；(b)Fc RIIIAを含まない複合体；(c)Fc RIIIAを含む複合体；(d)Fc RIIIAとLNK16を含む複合体。

【図5】Fc含有構築物の模式図を示す。pYD1にクローニングされたIgG1 Fcドメインの模式図を示す。白塗りのボックスはヒンジ-CH2-CH3ドメインを表し、平行な垂直線はCH1ドメインを表す。GIF206および227構築物の場合には、N末端アミノ酸が示される。下線の残基はヒンジ部に相当し、\*はXpressエピトプタグを表し、斜線ボックスはGly4-Serリンカーを表し、点描ボックスはAga2p遺伝子を表す。

【図6】酵母細胞壁上のFc融合タンパク質のFACS解析を示す。細胞を、PEコンジュゲートポリクローナルヤギ抗ヒトFc抗体 (図6A~D)またはマウス抗ヒトIgG1 Fc(CH3)特異的モノクローナル抗体のHP6017 (Sigma) (図6E~H)のいずれかとインキュベートした。AおよびEはベクターのみを表し、パネルBおよびFはCH1-CH3構築物を表し、パネルCおよびGはGIF227を表し、パネルDおよびHはGIF 206構築物を表す。

【図7】表面にディスプレイされたFc融合タンパク質への可溶性テトラマーFc RIIIAの結合を示す。pYDI-CH1 (A)；pYD-CHI-D265A (B)；およびpYDベクター(C)を含有する細胞を、細胞表面上にAga2p融合タンパク質を発現させる条件下で増殖させた。細胞をそれぞれ0.15 mM、7.5 mMおよび7.5 mMのFc RIIIAとともにインキュベートして、FACSにより解析した。

【図8】表面にディスプレイされたFc融合タンパク質への可溶性テトラマーFc RIIIA結合の特徴づけを示す。酵母細胞表面上のFc融合タンパク質へのFc RIIIAテトラマー複合体の結合を解析した。PEコンジュゲートFc RIIIAテトラマー複合体を異なる濃度の3G8 ( )、LNK (黒塗り三角)または無関係のアイソタイプ対照 (黒塗り四角)とともにインキュベートし、続いて酵母細胞とインキュベートした。PE蛍光についてFACSにより細胞を解析した。Fc RIIIAテトラマー複合体と結合した細胞パーセントをy軸上にプロットした。

【図9】Fc RIIIAへの結合が増大したFc突然変異体を選択するための選別ゲート (Sort Gate)の例を示す。細胞をPEコンジュゲートFc RIIIAテトラマー複合体 (y軸)および抗Fc-FITCコンジュゲート抗体 (x軸)により染色した。ボックスで囲った領域が細胞集団の約1.0%を選択するように設定された選別ゲートを表す。

【図10】Fc RIIIAテトラマー複合体に対して増大した親和性を有する、いくつかの同定されたFc突然変異体のFACS解析を示す。独立したFc突然変異を含むpYD-CH1プラスミドを保有する個々のクローンを、グルコース含有選択培地中で増殖させ、ガラクトース含有選択培地中でFc発現について誘導し、その後FACSにより解析した。図10AおよびBは野生型Fcを保有する細胞を表し、図10CおよびDは突然変異体#5を表し、図10EおよびFは突然変異体#20を表し、図10GおよびHは突然変異体#21を表し、図10IおよびJは突然変異体#24を表し、図10KおよびLは突然変異体#25を表し、図10MおよびNは突然変異体#27を表す。細胞をFc RIIIAテトラマー複合体 (図10A、C、E、G、I、KおよびM)またはFc RIIBテトラマー複合体 (図10B、D、F、H、J、LおよびN)により染色した。

【図11】4-4-20モノクローナル抗体中のFc突然変異体のELISAによる特徴づけを示す。pYD-CH1プラスミドからのFcドメインを、キメラ4-4-20モノクローナル抗体の重鎖にクローニングした。293細胞において4-4-20モノクローナル抗体を発現させ、上清を集めた。ELI

10

20

30

40

50

SAプレートにフルオレセインコンジュゲートBSAをコーティングして、キメラ4-4-20突然変異型抗体を捕捉した。その後、Fcドメインに対する変異型受容体の相対親和性を調べるために、4-4-20モノクローナル抗体を吸着させておいたELISAプレートにFc RIIIA受容体をコーティングした。突然変異体#15および#29は、対照として加えた非結合性の分離株である。

【図12】4-4-20モノクローナル抗体中のFc突然変異体のELISAによる特徴づけを示す。pYD-CH1プラスミドからのFcドメインを、キメラ4-4-20モノクローナル抗体の重鎖にクローニングした。293細胞において4-4-20モノクローナル抗体を発現させ、上清を集めた。ELISAプレートにフルオレセインコンジュゲートBSAをコーティングして、キメラ4-4-20突然変異型抗体を捕捉した。その後、Fcドメインに対する変異型受容体の相対親和性を調べるために、4-4-20モノクローナル抗体を吸着させておいたELISAプレートにFc RIIIB受容体をコーティングした。

10

【図13】HER2/neuヒト化モノクローナル抗体中の突然変異体のADCC活性を示す。A. 突然変異型Fc領域を含むヒト化HER2/neuモノクローナル抗体をそれらのADCC活性について評価し、野性型Her2/neu抗体のADCC活性と比較した。解析した突然変異体は次のとおりである：MGFc-5 (V379M)、MGFc-9 (F243I, V379L)、MGFc-10 (K288N, A330S, P396L)、MGFc-13 (K334E, T359N, T366S)、MGFc-27 (G316D, A378V, D399E)。B. ヒト化Her2/neuモノクローナル抗体中の追加の突然変異体のADCC活性：MGFc-37 (K248M)、MGFc-39 (E293V, Q295E, A327T)、MGFc-38 (K392T, P396L)、MGFc-41 (H268N, P396L)、MGFc-23 (K334E, R292L)、MGFc-44、MGFc-45。

20

【図14】BSA-FITC表面上でのキメラ4-4-20抗体の捕捉を示す。約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の抗体6  $\mu\text{L}$ を、BSA-フルオレセインイソチオシアネート(FITC)表面に5  $\mu\text{L}/\text{分}$ で注入した。BSA-FITC固定化センサーチップの表面上への突然変異型Fc領域を含むキメラ4-4-20抗体の結合のBIAcoreセンソグラム (sensogram) を示す。マーカーを野生型捕捉抗体応答に設定した。

【図15】変異型Fc領域を含むキメラ4-4-20抗体へのFc RIIIAのリアルタイム結合のセンソグラムを示す。変異型Fc領域を含むキメラ4-4-20抗体へのFc RIIIAの結合は200nMの濃度で解析した。野性型に対して得られたキメラ4-4-20抗体のレベルで応答を標準化した。

【図16】変異型Fc領域を含む抗体へのFc RIIIA結合の速度論的パラメーターの解析を示す。変異型Fc領域を含む抗体へのFc RIIIA結合の速度論的パラメーターは、200nMおよび800nMについての別個のベストフィット曲線を作成することにより得られた。実線は、32~34秒間隔で解離曲線について計算したkoff値に基づいて得られた結合フィットを示す。Kdおよびkoff値は2つの濃度からの平均を表す。

30

【図17】変異型Fc領域を含む抗体へのFc RIIIB-Fc融合タンパク質のリアルタイム結合のセンソグラムを示す。変異型Fc領域を含むキメラ4-4-20抗体へのFc RIIIB-Fc融合タンパク質の結合は200nMの濃度で解析した。野性型に対して得られたキメラ4-4-20抗体のレベルで応答を標準化した。

【図18】変異型Fc領域を含む抗体へのFc RIIIB-Fc融合タンパク質の速度論的パラメーターの解析を示す。変異型Fc領域を含む抗体へのFc RIIIB-Fc結合の速度論的パラメーターは、200nMおよび800nMについての別個のベストフィット曲線を作成することにより得られた。実線は、32~34秒間隔で解離曲線について計算したkoff値に基づいて得られた結合フィットを示す。KdおよびKoff値は2つの濃度からの平均を表す。

40

【図19】ADCCデータに対してプロットしたFc RIIIAおよびFc RIIIB-FcについてのKoff (wt)/Koff (mut)比を示す。1より多い数は、野生型に対して、減少したFc RIIIA結合の解離速度および増大したFc RIIIB-Fc結合の解離速度を示す。ボックス内の突然変異体は、Fc RIIIA結合に対してより低いoff速度およびFc RIIIB-Fc結合に対してより高いoff速度を有する。

【図20】非標識Fc RIIIAとの競合を示す。Fc RIIIA結合に対して改善されたKoff速度を有するFc領域突然変異体を同定するために速度論的スクリーニングを実施した。P396L

50

突然変異を含むFc領域変異体のライブラリーを、0.1 μMのビオチン化Fc R111A-リンカー-Avitagとともに1時間インキュベートし、その後洗浄した。続いて、0.8 μMの非標識Fc R111Aを標識酵母とともにさまざまな時点でインキュベートした。酵母を遠心分離し、非標識Fc R111Aを除いた。受容体に結合した酵母をFACS解析のためにSA（ストレプトアビジン）：PE（フィコエリトリン）で染色した。

【図21】速度論的スクリーニングに基づいたFACS解析を示す。図20に示したデータから算出したKoffに基づいて、1分タイムポイント選択を選んだ。10倍過剰のライブラリーを0.1 μMのビオチン化Fc R111A-リンカー-Avitagモノマーとともにインキュベートした。細胞を洗浄し、非標識リガンドと1分間インキュベートした。その後洗浄してからSA:PEで標識した。次に細胞をFACSで選別し、上端0.3%の結合体を選択した。非選択P396Lライブラリーを、FACSで結合の向上について選択された酵母細胞と比較した。ヒストグラムはFc R111A/PEとヤギ抗ヒトFc/FITCの両方により共染色される細胞のパーセントを示す（上右）。

【図22】Fc R11B Fc結合体の固相枯渇に基づいた選択を示す。P396Lライブラリーを、磁性ビーズを用いるFc R11B枯渇およびFc R111A選択に基づいてスクリーニングした。磁性ビーズによるFc R11B枯渇を5回繰り返した。得られた酵母集団を分析すると、ヤギ抗ヒトFcで染色される細胞が50%を超え、Fc R111Aで染色される細胞はごくわずかであることが分かった。続いて、0.1 μMのビオチン化Fc R111A-リンカー-Avitagを用いてFACSにより細胞を2回選択した。各選別後にFc R111A結合とFc R11B結合の両方について酵母細胞を解析し、野生型結合と比較した。

【図23】ビオチン化Fc R111A158F-リンカー-avitagモノマーをリガンドとして使用して、Fc R11B減損酵母集団からFc突然変異体を選択した。上位0.25パーセントFc R111A158F結合体を選択するように、選別ゲートを設定した。得られた富化集団をFACSによって分析した(図23A)。次に個々のクローンを単離し、別種のFc Rに対するその結合性をFACSによって分析した(図23B)。

【図24】Fc突然変異体を含むキメラ4D5により媒介されるSKBR3標的細胞溶解の相対速度を示す。試験した各Fc突然変異体について溶解の相対速度を計算した。Fc突然変異体を含む4D5抗体の溶解速度を、野生型4D5抗体により媒介される溶解の速度で割った。少なくとも2つの独立したアッセイからのデータの平均をとり、ヒストグラムとしてプロットした。各Fc突然変異体について、2つの異なる抗体濃度からのデータを示す。抗体濃度は、溶解が約50%となる曲線の位置を挟むように選択された。

【図25】Fc突然変異体を含むキメラ2H7により媒介されるDAUDI標的細胞溶解の相対速度を示す。試験した各Fc突然変異体について溶解の相対速度を計算した。Fc突然変異体を含む2H7抗体の溶解速度を、野生型2H7抗体により媒介される溶解の速度で割った。少なくとも1または2つの独立したアッセイからのデータの平均をとり、ヒストグラムとしてプロットした。各Fc突然変異体について、2つの異なる抗体濃度からのデータを示す。抗体濃度は、溶解が約50%となる曲線の位置に基づいて選択された。

【発明を実施するための形態】

【0108】

##### 5. 好ましい実施形態の説明

本発明は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば置換、しかし挿入や欠失も含まれる）を有する変異型Fc領域を含んでなる分子、好ましくはポリペプチド、さらに好ましくは免疫グロブリン（例えば、抗体）に関する。ただし、前記アミノ酸の改変は、Fc Rに対する変異型Fc領域の親和性を変更する（例えば、増加または減少させる）ものである。いくつかの実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、Fc-Fc R相互作用を測定するための当業者に公知の方法または本明細書に記載の方法（例えば、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ）で測定したとき、野生型Fc領域を含む対応する分子（すなわち、変異型Fc領域を含む前記分子と同じであるが、1個以上のアミノ酸の改変を有しない）と比べて、より高い親和性でFc R111Aと結合する。さらに他の

実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて低下した親和性でFc RIIIAと結合する。好ましい実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIBと結合するよりも低い親和性で、(Fc領域を介して)Fc RIIIBと特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、より高い親和性でFc RIIIAおよびFc RIIIBと結合する。他の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、より高い親和性でFc RIIIBと結合する。他の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、低下した親和性でFc RIIIBと結合する。

10

#### 【0109】

いくつかの実施形態において、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を提供し、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、検出可能ないずれのFc Rへの結合も示さない(例えば、ELISAアッセイなどで測定して、Fc RIIA、Fc RIIIBまたはFc RIIIAと結合しない)。

20

#### 【0110】

特定の実施形態において、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIIAである。別の特定の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIAである。さらに別の実施形態では、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、1つのFc Rとのみ結合し、ここで前記Fc RはFc RIIIBである。本発明は特に、治療用抗体の例えばエフェクター機能を高める(例えば、ADCCを高める)ことにより治療用抗体の効力を増強するための、ヒトまたはヒト化治療用抗体(例えば、腫瘍特異的抗血管新生または抗炎症性モノクローナル抗体)の改変に関する。

30

#### 【0111】

本発明の分子のFc Rに対する親和性および結合特性は、初めに、Fc-Fc R相互作用(すなわち、Fc領域とFc Rとの特異的結合)を測定するための当技術分野で公知のin vitroアッセイ(生化学または免疫学に基づいたアッセイ)、例えば、限定するものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイなどを用いて測定される(セクション5.2.1参照)。好ましくは、本発明の分子の結合特性はまた、1以上のFc Rメディエーターエフェクター細胞機能を測定するためのin vitro機能アッセイによっても測定される(セクション5.2.6参照)。最も好ましい実施形態では、本発明の分子は、in vitro系アッセイにおける結合特性と同様の結合特性をin vivoモデル(例えば、本明細書に記載および開示されるもの)においても示すものである。しかしながら、本発明は、in vitro系アッセイで所望の表現型を示さないがin vivoでは所望の表現型を示す本発明の分子を除外するものではない。

40

#### 【0112】

いくつかの実施形態において、本発明の分子は、Fc領域のCH3ドメイン(アミノ酸342-47にわたると定義される)に少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む。他の実施形態では、本発明の分子は、Fc領域のCH2ドメイン(アミノ酸231-341にわたると定義される)に少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、本発明の分子は少なくとも2個のアミノ酸の改変を含み、1つの改変

50

はCH3領域にあり、もう1つの改変はCH2領域にある。本発明はさらにヒンジ部にもアミノ酸の改変を含む。CH2および/またはCH3ドメインに1個以上のアミノ酸の改変を有する本発明の分子は、本明細書に記載の方法または当業者に公知の方法を用いて測定したとき、Fc Rに対して変更された親和性を有する。

【0113】

好ましい特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記分子はFc Rに対して変更された親和性をもつようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、Sondermannら、2000 (Nature, 406: 267-273; その全体を参照により本明細書に組み入れる) により開示されるようなFc-Fc R相互作用の結晶学的構造解析に基づいて、Fc Rと直接接触する位置での置換を有しないものである。Fc Rと直接接触するFc領域内の位置の例としては、アミノ酸234-239 (ヒンジ部)、アミノ酸265-269 (B/Cループ)、アミノ酸297-299 (C'/Eループ)、およびアミノ酸327-332 (F/Gループ) がある。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、結晶学的構造解析に基づくと、Fc Rと直接接触している、少なくとも1個の残基の改変を含む。

【0114】

別の好ましい実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記分子は、野生型Fc領域を含む分子に比して変更された親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438、439位のいずれにも置換を有しないか、または単独で前記置換ではない。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記分子は、野生型Fc領域を含む分子に比して変更された親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、255、258、267、269、270、276、278、280、283、285、289、292、293、294、295、296、300、303、305、307、309、322、329、332、331、337、338、340、373、376、416、419、434、435、437、438、439位のいずれにも置換を有しないか、または単独で前記置換ではなく、また、256、290、298、312、333、334、359、360、326、もしくは430位のいずれにもアラニンを、330位にリシンを、339位にトレオニンを、320位にメチオニンを、326位にセリンを、326位にアスパラギンを、326位にアスパラギン酸を、326位にグルタミン酸を、334位にグルタミンを、334位にグルタミン酸を、334位にメチオニンを、334位にヒスチジンを、334位にバリンを、334位にロイシンを、335位にリシンを、268位にアスパラギンを、272位にグルタミンを、286位にグルタミン、セリン、もしくはアスパラギン酸を、290位にセリンを、320位にメチオニン、グルタミン、グルタミン酸、もしくはアルギニンを、322位にグルタミン酸を、326位にセリン、グルタミン酸、もしくはアスパラギン酸を、330位にリシンを、335位にグルタミンを、または301位にメチオニンを有しないものである。

【0115】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は、268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438もしくは439位のいずれにも置換を有しないか、または単独で前記置換ではなく、また、280位にヒスチジン、グルタミン、もしくはチロシンを、290位にセリン、グリシン、トレオニンもしくはチロシンを、300位にロイシンもしくはイソロイシンを、294位にアスパラギンを、296位にプロリンを、298位にプロリン、アスパラギン、アスパラギン酸、もしくはバリンを、295位にリシンを有しないものである。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は野

野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記分子は、野生型Fc領域を含む分子に比して低下した親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、もしくは439位のいずれにも置換を有しないか、または単独で前記置換ではない。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、前記変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記分子は、野生型Fc領域を含む分子に比して増大した親和性でFc Rと結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398、もしくは430位のいずれにも置換を有しないか、または単独で前記置換ではない。

10

## 【0116】

最も好ましい実施形態において、活性化性および/または抑制性受容体に対する親和性が変更されている、変異型Fc領域を有する本発明の分子は、1個以上のアミノ酸の改変を有し、前記1個以上のアミノ酸の改変は、288位でのアスパラギンによる置換、330位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc10) (表5参照); または334位でのグルタミン酸による置換、359位でのアスパラギンによる置換、および366位でのセリンによる置換 (MgFc13); または316位でのアスパラギン酸による置換、378位でのバリンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換 (MgFc27); または392位でのトレオニンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc38); または221位でのグルタミン酸による置換、270位でのグルタミン酸による置換、308位でのアラニンによる置換、311位でのヒスチジンによる置換、396位でのロイシンによる置換、および402位でのアスパラギン酸による置換 (MgFc42); または240位でのアラニンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc52); または410位でのヒスチジンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc53); または243位でのロイシンによる置換、305位でのイソロイシンによる置換、378位でのアスパラギン酸による置換、404位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc54); または255位でのイソロイシンによる置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc55); または370位でのグルタミン酸による置換、および396位でのロイシンによる置換 (MgFc59)である。

20

30

## 【0117】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下の1つ以上の位置にアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を包含する: 185、142、192、141、132、149、133、125、162、147、119、166、251、292、290、291、252、288、268、256、262、218、214、205、215、247、275、202、289、258、219、279、222、246、233、246、268、244、217、253、246、224、298、280、255、218、281、284、216、223、235、221、252、241、258、227、231、215、274、287、244、229、287、291、240、281、232、269、225、246、246、293、295、248、276、268、210、288、227、221、217、261、210、242、255、240、250、247、258、246、282、219、225、270、263、272、292、233、247、254、243、347、339、392、399、301、315、383、396、385、348、333、334、310、337、371、359、366、359、379、330、318、395、319、380、305、309、335、370、378、394、386、377、358、384、397、372、326、320、375、327、381、354、385、335、387、353、375、383、397、345、375、389、335、394、316、399、315、394、382、390、369、377、304、323、313、388、339、317、365、367、340、311、312、398、343、352、362、303、308、327、307、344、328、393、355、360、306、361、355、415、408、409、407、424、401、402、435、421、431、441、440、435、431、442、400、422、406、411、422、433、406、423、420、412、447、443、414、433、428、446、402、419、410、404、427、417、433、436、438、416。好ましくは、このような突然変異はFc Rに対して変更された親和性を有する分子をもたらす、かつ/または、本明細書に開示し例示する当業者に公知の方法を用いて測定したとき、改変されたエフェクター細胞媒介機能を有する。

40

50

## 【 0 1 1 8 】

本発明は、以下の表2に示した突然変異のいずれかからなるかまたはいずれかを含んでなる変異型Fc領域を含む分子を包含する。

## 【表 2】

代表的な突然変異

単一部位突然変異体	二重部位突然変異体
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S166N

A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S
T366S	R255L, E318K
V379L	F243L, E318K
K288N	V279L, P395S
A330S	K246T, Y319F
F243L	F243I, V379L
E318K	K288M, K334E
V379M	K334E, E308D
S219Y	E233D, K334E
V282M	K246T, P396H
D401V	H268D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
I377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R
K326E	R255Q, K326E
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q
S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-DELETED
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
	P247L, L406F
	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K326I, P396L
	H268D, P396L
	K210M, P396L
	L358P, P396L
	K334N, P396L
	V379M, P396L

10

20

30

40

P227S, P396L
P217S, P396L
Q419H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
R255L, P396L
V240A, P396L
T250A, P396L
P247S, P396L
L410H, P396L
Q419L, P396L
V427A, P396L
E258D, P396L
N384K, P396L
V323I, P396L
P244H, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L
A330V, Q419H
V263Q, E272D
K326E, A330T

10

20

## 【 0 1 1 9 】

さらに他の実施形態において、本発明は、2個より多いアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む分子を包含する。そのような変異体の例を以下の表に示すが、これらに限定されるものではない(表3)。本発明は、本明細書に開示するような1個以上のアミノ酸の改変をさらに含む、表3に示した突然変異体を包含する。

## 【表3】

## 変異型の代表的な組み合わせ

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H268L, A141V
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205F, F149Y, K133M
S408I, V215I, V125L
G385E, P247I
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T
H310Y, T289A, Y407V, E258D
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M
F243L, R255L, E318K
K334E, T359N, T366S
T256S, V305I, K334E, N390S
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
K334E, T359N, T366S, Q386R
K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
P217S, A378V, S408R
P247L, I253N, K334N

30

40

D312E, K327N, I378S	
D280E, S354F, A431D, L441I	
K218R, G281D, G385R	
P247L, A330T, S440G	
T355N, P387S, H435Q	
P247L, A431V, S442F	
P343S, P353L, S375I, S383N	
E216D, E345K, S375I	
K288N, A330S, P396L	
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M	10
G316D, A378V, D399E	
N315I, V379M, T394M	
K326Q, K334E, T359N, T366S	
A378V, N390I, V422I	
V282E, V369I, L406F	
V397M, T411A, S415N	
T223I, T256S, L406F	
L235P, V382M, S304G, V305I, V323I	
P247L, W313R, E388G	
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L	20
F243I, V379L, G420V	
A231V, Q386H, V412M	
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L	
P244A, K326I, C367R, S375I, K447T	
R301H, K340E, D399E	
C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V	
E269K, K290N, Q311R, H433Y	
E216D, K334R, S375I	
T335N, P387S, H435Q	
K246I, Q362H, K370E	
K334E, E380D, G446V	
V303I, V369F, M428L	30
K246E, V284M, V308A	
E293V, Q295E, A327T	
Y319F, P352L, P396L	
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	
K290T, N390I, P396L	
K288R, T307A, K344E, P396L	
V273I, K326E, L328I, P396L	
K326I, S408N, P396L	
K261N, K210M, P396L	
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	40
K290E, V369A, T393A, P396L	
K210N, K222I, K320M, P396L	
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	
K246N, Q419R, P396L	
P217A, T359A, P396L	
V215I, K290V, P396L	
F275L, Q362H, N384K, P396L	
A330V, H433Q, V427M	

V263Q, E272D, Q419H
N276Y, T393N, W417R
V282L, A330V, H433Y, T436R
V284M, S298N, K334E, R355W
A330V, G427M, K438R
S219T, T225K, D270E, K360R
K222E, V263Q, S298N
E233G, P247S, L306P
S219T, T225K, D270E
S254T, A330V, N361D, P243L
V284M, S298N, K334E, R355W R416T

10

## 【 0 1 2 0 】

いくつかの実施形態において、本発明の分子（好ましくは抗体）は、1以上のグリコシル化部位をさらに含み、したがって1以上の糖鎖成分が該分子に共有結合されている。好ましくは、Fc領域に1以上の改変および/または1以上のグリコシル化部位を有する本発明の抗体は、増強された抗体媒介エフェクター機能、例えば、増強されたADCC活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明はさらに、抗体の糖鎖成分と直接的にまたは間接的に相互作用することがわかっているアミノ酸の1個以上の改変を有する抗体を含み、これらのアミノ酸は、限定するものではないが、241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299、および301位のアミノ酸を含む。抗体の糖鎖成分と直接的にまたは間接的に相互作用するアミノ酸は当技術分野で公知であり、例えば、Jeffersら、1995 Immunology Letters, 44:111-7（その全体を参照により本明細書に組み入れる）を参照されたい。

20

## 【 0 1 2 1 】

本発明は、好ましくは抗体の機能性（例えば、Fc Rとの結合活性）を変化させることなく、1以上のグリコシル化部位を抗体の1以上の部位に導入することにより改変されている抗体を包含する。グリコシル化部位は、本発明の抗体の可変領域および/または定常領域に導入することができる。本明細書中で用いる「グリコシル化部位」は、オリゴ糖（すなわち、互いに連結された2以上の単糖を含有する糖鎖）が特異的にかつ共有結合で結合すると考えられる、抗体中の特定のアミノ酸配列を含む。オリゴ糖の側鎖は典型的には抗体の主鎖にNまたはO結合のいずれかを介して連結される。N結合グリコシル化はアスパラギン残基の側鎖へのオリゴ糖成分の結合を指す。O結合グリコシル化はヒドロキシアミノ酸（例えば、セリン、トレオニン）へのオリゴ糖成分の結合を指す。本発明の抗体は、N結合およびO結合グリコシル化部位を含めて、1以上のグリコシル化部位を含むことができる。当技術分野で公知のN結合またはO結合グリコシル化のためのグリコシル化部位はどれも本発明に従って利用しうる。本発明の方法に従って有用であるN結合グリコシル化部位の例は、アミノ酸配列：Asn-X-Thr/Ser（式中、Xは任意のアミノ酸であり、Thr/Serはトレオニンまたはセリンを示す）である。このような部位は、本発明が関わる技術分野で周知の方法を用いて、本発明の抗体に導入することができる。例えば、"In Vitro Mutagenesis" Recombinant DNA: A Short Course, J.D. Watson, ら, W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp.106-116を参照されたい（その全体を参照により本明細書に組み入れる）。本発明の抗体中にグリコシル化部位を導入する方法の例は、所望のAsn-X-Thr/Ser配列が得られるように、抗体のアミノ酸配列を改変するかまたは突然変異させる方法である。

30

40

## 【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態において、本発明は、グリコシル化部位を加えるかまたは欠失することにより本発明の抗体の糖鎖含量を改変する方法を包含する。抗体の糖鎖含量を改変する方法は当技術分野で周知であり、本発明に包含される。例えば、米国特許第6,218,149号；EP 0 359 096 B1；米国特許公開US 2002/0028486；WO 03/035835；米国特許公開US 2

50

003/0115614；米国特許第6,218,149号；米国特許第6,472,511号を参照されたい（これらの全てを参照により本明細書に組み入れる）。他の実施形態において、本発明は、抗体の1以上の内在性糖鎖成分を欠失することにより本発明の抗体の糖鎖含量を改変する方法を包含する。特定の実施形態では、本発明は、297位に隣接する位置を改変することにより、抗体のFc領域のグリコシル化部位をシフトすることを包含する。特定の実施形態では、本発明は、297位ではなく296位がグリコシル化されるように296位を改変することを包含する。

### 【0123】

#### 5.1 変異型Fc領域を含むポリペプチドおよび抗体

本発明は、一部には、酵母ディスプレイ系を用いて、様々なFc R受容体に対して変更された親和性を有する突然変異型ヒトIgG1重鎖Fc領域を同定したことに基づいている。したがって、本発明は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば置換、しかし挿入または欠失も含まれる）を有する変異型Fc領域を含む分子、好ましくはポリペプチド、さらに好ましくは免疫グロブリン（例えば、抗体）に関する。ただし、前記改変は変異型Fc領域のFc Rに対する親和性を変更するものである。本発明の分子のFc Rに対する親和性および結合特性は、初めに、Fc-Fc R相互作用（すなわち、Fc領域とFc Rとの特異的結合）を測定するための当技術分野で公知のin vitroアッセイ（生化学または免疫学に基づいたアッセイ）、例えば、限定するものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイなどを用いて測定される（セクション5.2.1参照）。好ましくは、本発明の分子の結合特性はまた、1以上のFc Rメディエーターエフェクター細胞機能を測定するためのin vitro機能アッセイによっても測定される（セクション5.2.6参照）。最も好ましい実施形態では、本発明の分子は、in vitro系アッセイにおける結合特性と同様の結合特性をin vivoモデル（例えば、本明細書に記載および開示されるもの）においても示すものである。しかしながら、本発明は、in vitro系アッセイで所望の表現型を示さないがin vivoでは所望の表現型を示す本発明の分子を除外するものではない。

### 【0124】

#### A. Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性が増大するように改変された突然変異体

本発明は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含む分子であって、前記改変により、変異型Fc領域の活性化性Fc Rに対する親和性が変更されている、上記分子を包含する。いくつかの実施形態において、本発明の分子は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含み、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を少なくとも2倍高めるものである。別の特定の実施形態では、本発明の分子は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含み、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を2倍以上増大させるものである。本発明の他の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、または10倍高めるものである。本発明のさらに他の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、または10倍低下させるものである。そのような倍率の増加はELISAまたは表面プラズモン共鳴アッセイで都合よく測定できる。特定の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、329、331、または322位のいずれか1つの位置での任意のアミノ酸による置換を含まないが、または単独でそのような置換ではない。特定の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、256、290、298、312、333、334、359、360、もしくは430位のいずれか1つの位置でのアラニンによる置換、330位でのリシンによる、339位でのトレオニンによる、320位でのメチオニンによる、326位でのセリン、アスパラギン、アスパラギン酸、もしくはグルタミン酸による、334位でのグルタミン、グルタミン酸、メチオ

10

20

30

40

50

ニン、ヒスチジン、バリン、もしくはロイシンによる置換を含まないか、または単独でそのような置換ではない。別の特定の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、280、290、300、294、もしくは295位のいずれかでの置換を含まないか、または単独でそのような置換ではない。別のさらに特定した実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、300位でのロイシンもしくはイソロイシンによる、295位でのリシンによる、294位でのアスパラギンによる、298位でのバリン、アスパラギン酸、プロリン、アスパラギン、もしくはバリンによる、280位でのヒスチジン、グルタミン、もしくはチロシンによる、290位でのセリン、グリシン、トレオニン、もしくはチロシンによる置換を含まないか、または単独でそのような置換ではない。

**【0125】**

別の特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、該変異型Fc領域は野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を含み、その結果、該ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIAと結合するよりも高い親和性でFc RIIAと特異的に結合するようになるが、ただし、前記変異型Fc領域は、256、290、326、255、258、267、272、276、280、283、285、286、331、337、268、272、もしくは430位のいずれにもアラニンを、268位にアスパラギンを、272位にグルタミンを、286位にグルタミン、セリン、もしくはアスパラギン酸を、290位にセリンを、320位にメチオニン、グルタミン、グルタミン酸、もしくはアルギニンを、322位にグルタミン酸を、326位にセリン、グルタミン酸、もしくはアスパラギン酸を、330位にリシンを、335位にグルタミンを、または301位にメチオニンを有しない。特定の実施形態では、本発明の分子は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含み、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIAに対する親和性を少なくとも2倍増大させるものである。別の特定の実施形態では、本発明の分子は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（例えば、置換）を有する変異型Fc領域を含み、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIAに対する親和性を2倍以上増大させるものである。本発明の他の実施形態では、1個以上のアミノ酸の改変が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIAに対する親和性を少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、または10倍高めるものである。

**【0126】**

特定の実施形態において、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変（例えば置換、しかし挿入または欠失も含まれる）を有する変異型Fc領域を含む分子、好ましくはポリペプチド、さらに好ましくは免疫グロブリン（例えば、抗体）を包含する。ただし、前記改変は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも150%、または少なくとも200%増大させるものである。

**【0127】**

特定の実施形態において、変異型Fc領域の親和性を増大させる1個以上のアミノ酸の改変は以下の置換を含むものである：347位でのヒスチジン、および339位でのバリンによる置換；または425位でのイソロイシン、および215位でのフェニルアラニンによる置換；または408位でのイソロイシン、215位でのイソロイシン、および125位でのロイシンによる置換；または385位でのグルタミン酸、および247位でのヒスチジンによる置換；または348位でのメチオニン、334位でのアスパラギン、275位でのイソロイシン、202位でのメチオニン、および147位でのトレオニンによる置換；または275位でのイソロイシン、334位でのアスパラギン、および348位でのメチオニンによる置換；または279位でのロイシン、および395位でのセリンによる置換；または246位でのトレオニン、および319位でのフェニルアラニンによる置換；または243位でのイソロイシン、および379位でのロイシンによる置換；または243位でのロイシン、255位でのロイシン、および318位でのリシンによる置換；または334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンに

よる置換；または288位でのメチオニン、および334位でのグルタミン酸による置換；または334位でのグルタミン酸、および380位でのアスパラギン酸による置換；または256位でのセリン、305位でのイソロイシン、334位でのグルタミン酸、および390位でのセリンによる置換；または335位でのアスパラギン、370位でのグルタミン酸、378位でのバリン、394位でのメチオニン、および424位でのロイシンによる置換；または233位でのアスパラギン酸、および334位でのグルタミン酸による置換；または334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、366位でのセリン、および386位でのアルギニンによる置換；または246位でのトレオニン、および396位でのヒスチジンによる置換；または268位でのアスパラギン酸、および318位でのアスパラギン酸による置換；または288位でのアスパラギン、330位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または244位でのヒスチジン、358位でのメチオニン、379位でのメチオニン、384位でのリシン、および397位でのメチオニンによる置換；または217位でのセリン、378位でのバリン、および408位でのアルギニンによる置換；または247位でのロイシン、253位でのアスパラギン、および334位でのアスパラギンによる置換；または246位でのイソロイシン、および334位でのアスパラギンによる置換；または320位でのグルタミン酸、および326位でのグルタミン酸による置換；または375位でのシステイン、および396位でのロイシンによる置換。Fc RIIIAに対して増大した親和性をもたらす他のアミノ酸置換の例を、以下に記載し、表4にまとめて示す。

【0128】

本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が243位でのイソロイシンによる置換および379位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ1.5倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が288位でのアスパラギンによる置換、330位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ5倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が243位でのロイシンによる置換および255位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ1倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が334位でのグルタミン酸による置換、359位でのアスパラギンによる置換、および366位でのセリンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ1.5倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が316位でのアスパラギン酸による置換、378位でのバリンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ1.5倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が315位でのイソロイシンによる置換、379位でのメチオニンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ1倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が243位でのイソロイシンによる置換、379位でのロイシンによる置換、および420位でのバリンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc RIIIAと結合するよりおよそ2.5倍高い親和性で、Fc RIIIAと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子

10

20

30

40

50

であって、前記変異型Fc領域が247位でのロイシンによる置換および421位でのリシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するよりおよそ3倍高い親和性で、Fc R111Aと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が392位でのトレオニンによる置換および396位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するよりおよそ4.5倍高い親和性で、Fc R111Aと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が293位でのバリンによる置換、295位でのグルタミン酸による置換、および327位でのトレオニンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するよりおよそ1.5倍高い親和性で、Fc R111Aと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が268位でのアスパラギンによる置換および396位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するよりおよそ2倍高い親和性で、Fc R111Aと結合するようになる、前記分子を包含する。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が319位でのフェニルアラニンによる置換、352位でのロイシンによる置換、および396位でのロイシンによる置換を有し、その結果、前記分子は、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するよりおよそ2倍高い親和性で、Fc R111Aと結合するようになる、前記分子を包含する。

#### 【0129】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも高い親和性で、Fc R111Aと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が396位でのヒスチジンによる置換を含むものである。特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも高い親和性で、Fc R111Aと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が248位でのメチオニンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドと同様の親和性で、Fc R111Aと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が392位でのアルギニンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドと同様の親和性で、Fc R111Aと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が315位でのイソロイシンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドと同様の親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が162位でのバリンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が396位でのロイシンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が379位でのメチオニンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が219位でのチロシンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が282位でのメチオニンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が401位でのバリンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が222位でのアスパラギンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が334位でのグルタミン酸による置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が377位でのフェニルアラニンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペ

10

20

30

40

50



くとも1個のアミノ酸の改変が366位でのアスパラギンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより低い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が414位でのアスパラギンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより低い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が225位でのセリンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドより低い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が377位でのアスパラギンによる置換を含むものである。

【0131】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約2倍高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が379位でのメチオニンによる置換を含むものである。別の特定の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約1.5倍高い親和性で、Fc RIIIAと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が248位でのメチオニンによる置換を含むものである。

【0132】

いくつかの実施形態において、本発明の分子は、Fc-Fc R相互作用（すなわち、Fc領域とFc Rとの特異的結合）を測定するための当技術分野で公知のin vitroアッセイ（生化学または免疫学に基づいたアッセイ）、例えば、限定するものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイなどを用いて測定したとき、Fc RIIAおよび/またはFc RIIAに対して変更された親和性を有する（セクション5.2.1参照）。好ましくは、活性化性Fc R受容体に対する親和性が変更されているこれら分子の結合特性はまた、1以上のFc Rメディエーターエフェクター細胞機能を測定するためのin vitro機能アッセイによって測定されるそれらの活性とも関連し（セクション5.2.6参照）、例えば、Fc RIIIAに対して増大した親和性を有する変異型Fc領域を含む分子は、高められたADCC活性を有する。最も好ましい実施形態では、in vitroアッセイで活性化性Fc R受容体（例えば、Fc RIIIA）に対して変更された結合特性を有する本発明の分子は、in vivoモデル（例えば、本明細書に記載および開示されるもの）においても変更された結合特性を示すものである。しかしながら、本発明は、in vitro系アッセイでFc R結合の変更を示さないがin vivoでは所望の表現型を示す本発明の分子を除外するものではない。

【0133】

B. Fc RIIIAに対する親和性が増大しているが、Fc RIIBに対する親和性は低下しているかまたは存在しない突然変異体

特定の実施形態において、本発明の分子は、1以上の領域に1個以上のアミノ酸の改変（すなわち、置換）を有する変異型Fc領域を含み、前記改変は、野生型親和性でFc RIIIAおよびFc RIIBと結合する野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、変異型Fc領域のFc

10

20

30

40

50

R111Aに対する親和性を高め、かつ変異型Fc領域のFc R11Bに対する親和性を減ずるものである。ある実施形態では、前記1個以上のアミノ酸の改変は、256、298、333、334、280、290、294、298、もしくは296位のいずれにもアラニンによる置換を含まないか、または単独で前記置換ではなく、また、298位でのアスパラギン、バリン、アスパラギン酸、もしくはプロリンによる置換、または290位でのセリンによる置換を含まないか、または単独で前記置換ではない。特定の実施形態では、前記1個以上のアミノ酸の改変は、変異型Fc領域のFc R111Aに対する親和性を少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%増大させるが、変異型Fc領域のFc R11Bに対する親和性を少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%低下させる。

#### 【0134】

特定の実施形態において、変異型Fc領域を担うch-4-4-20抗体を用いてELISAアッセイおよび/またはADCCに基づくアッセイで測定したとき、Fc R111Aに対する親和性が増大しておりかつFc R11Bに対する親和性が低下しているかまたはまったく認められない変異型Fc領域を含む本発明の分子は、以下の置換を含むものである：275位でのイソロイシン、334位でのアスパラギン、および348位でのメチオニンによる置換；または279位でのロイシン、および395位でのセリンによる置換；または246位でのトレオニン、および319位でのフェニルアラニンによる置換；または243位でのロイシン、255位でのロイシン、および318位でのリシンによる置換；または334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンによる置換；または334位でのグルタミン酸、および380位でのアスパラギン酸による置換；または256位でのセリン、305位でのイソロイシン、334位でのグルタミン酸、および390位でのセリンによる置換；または335位でのアスパラギン、370位でのグルタミン酸、378位でのバリン、394位でのメチオニン、および424位でのロイシンによる置換；または233位でのアスパラギン酸、および334位でのグルタミン酸による置換；または334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、366位でのセリン、および386位でのアルギニンによる置換；または312位でのグルタミン酸、327位でのアスパラギン、および378位でのセリンによる置換；または288位でのアスパラギン、および326位でのアスパラギンによる置換；または247位でのロイシン、および421位でのリシンによる置換；または298位でのアスパラギン、および381位でのアルギニンによる置換；または280位でのグルタミン酸、354位でのフェニルアラニン、431位でのアスパラギン酸、および441位でのイソロイシンによる置換；または255位でのグルタミン、および326位でのグルタミン酸による置換；または218位でのアルギニン、281位でのアスパラギン酸、および385位でのアルギニンによる置換；または247位でのロイシン、330位でのトレオニン、および440位でのグリシンによる置換；または284位でのアラニン、および372位でのロイシンによる置換；または335位でのアスパラギン、387位でのセリン、および435位でのグルタミンによる置換；または247位でのロイシン、431位でのバリン、および442位でのフェニルアラニンによる置換。

#### 【0135】

特定の実施形態において、変異型Fc領域を担うch-4-4-20抗体を用いてELISAアッセイおよび/またはADCCに基づくアッセイで測定したとき、Fc R111Aに対する親和性が増大しておりかつFc R11Bに対する親和性が低下しているかまたはまったく認められない変異型Fc領域を含む本発明の分子は、以下の置換を含むものである：379位でのメチオニンによる置換；219位でのチロシンによる置換；282位でのメチオニンによる置換；401位でのバリンによる置換；222位でのアスパラギンによる置換；334位でのイソロイシンによる置換；334位でのグルタミン酸による置換；275位でのチロシンによる置換；398位でのバリンによる置換。

#### 【0136】

本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc

10

20

30

40

50

領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約3倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が288位でのアスパラギンによる置換、330位でのセリンによる置換、および396位でのロイシンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約10~15倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が316位でのアスパラギン酸による置換、378位でのバリンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約10倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が315位でのイソロイシンによる置換、379位でのメチオニンによる置換、および399位でのグルタミン酸による置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約7倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が243位でのイソロイシンによる置換、379位でのロイシンによる置換、および420位でのバリンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約3倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が392位でのトレオニンによる置換および396位でのロイシンによる置換を含むものである。本発明は、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約5倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が268位でのアスパラギンによる置換および396位でのロイシンによる置換を含むものである。本発明はまた、変異型Fc領域を含んでなる単離されたポリペプチドであって、前記変異型Fc領域が野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有し、その結果、前記ポリペプチドは、ELISAアッセイで測定して、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドよりも約2倍低い親和性で、Fc RIIBと特異的に結合するようになる、前記ポリペプチドを包含するが、ただし、前記少なくとも1個のアミノ酸の改変が319位でのフェニルアラニンによる置換、352位でのロイシンによる置換、および396位でのロイシンによる置換を含むものである。

【 0 1 3 7 】

#### C. Fc RIIIAおよびFc RIIBに対する親和性が増大している突然変異体

本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子を包含し、前記改変は、変異型Fc領域のFc RIIIAおよびFc RIIBに対する親和性を少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%増大させるものである。特定の実施形態では、(本明細書に記載するような、変異型Fc領域を担うch-4-4-20抗体を用いてELISAアッセイおよび/またはADCCに基づくアッセイにより測定したとき)Fc RIIIAおよびFc RIIBに対する親和性が増大している変異

10

20

30

40

50

型Fc領域を含む本発明の分子は、以下の改変を含んでなる：415位でのイソロイシン、および251位でのフェニルアラニンによる置換；または399位でのグルタミン酸、292位でのロイシン、および185位でのメチオニンによる置換；または408位でのイソロイシン、215位でのイソロイシン、および125位でのロイシンによる置換；または385位でのグルタミン酸および247位でのヒスチジンによる置換；または348位でのメチオニン、334位でのアスパラギン、275位でのイソロイシン、202位でのメチオニン、および147位でのトレオニンによる置換；または246位でのトレオニン、および396位でのヒスチジンによる置換；または268位でのアスパラギン酸および318位でのアスパラギン酸による置換；または288位でのアスパラギン、330位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または244位でのヒスチジン、358位でのメチオニン、379位でのメチオニン、384位でのリシン、および397位でのメチオニンによる置換；または217位でのセリン、378位でのバリン、および408位でのアルギニンによる置換；または247位でのロイシン、253位でのアスパラギン、および334位でのアスパラギンによる置換；または246位でのイソロイシン、および334位でのアスパラギンによる置換；または320位でのグルタミン酸、および326位でのグルタミン酸による置換；または375位でのシステイン、および396位でのロイシンによる置換；または343位でのセリン、353位でのロイシン、375位でのイソロイシン、383位でのアスパラギンによる置換；または394位でのメチオニン、および397位でのメチオニンによる置換；または216位でのアスパラギン酸、345位でのリシン、および375位でのイソロイシンによる置換；または288位でのアスパラギン、330位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または247位でのロイシン、および389位でのグリシンによる置換；または222位でのアスパラギン、335位でのアスパラギン、370位でのグルタミン酸、378位でのバリン、および394位でのメチオニンによる置換；または316位でのアスパラギン酸、378位でのバリン、および399位でのグルタミン酸による置換；または315位でのイソロイシン、379位でのメチオニン、および394位でのメチオニンによる置換；または290位でのトレオニン、および371位でのアスパラギン酸による置換；または247位でのロイシン、および398位でのグルタミンによる置換；または326位でのグルタミン、334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンによる置換；または247位でのロイシン、および377位でのフェニルアラニンによる置換；または378位でのバリン、390位でのイソロイシン、および422位でのイソロイシンによる置換；または326位でのグルタミン酸、および385位でのグルタミン酸による置換；または282位でのグルタミン酸、369位でのイソロイシン、および406位でのフェニルアラニンによる置換；または397位でのメチオニン、411位でのアラニン、および415位でのアスパラギンによる置換；または223位でのイソロイシン、256位でのセリン、および406位でのフェニルアラニンによる置換；または298位でのアスパラギン、および407位でのアルギニンによる置換；または246位でのアルギニン、298位でのアスパラギン、および377位でのフェニルアラニンによる置換；または235位でのプロリン、382位でのメチオニン、304位でのグリシン、305位でのイソロイシン、および323位でのイソロイシンによる置換；または247位でのロイシン、313位でのアルギニン、および388位でのグリシンによる置換；または221位でのチロシン、252位でのイソロイシン、330位でのグリシン、339位でのトレオニン、359位でのアスパラギン、422位でのイソロイシン、および433位でのロイシンによる置換；または258位でのアスパラギン酸、および384位でのリシンによる置換；または241位でのロイシン、および258位でのグリシンによる置換；または370位でのアスパラギン、および440位でのアスパラギンによる置換；または317位でのアスパラギンによる置換および423位での欠失；または243位でのイソロイシン、379位でのロイシン、および420位でのバリンによる置換；または227位でのセリン、および290位でのグルタミン酸による置換；または231位でのバリン、386位でのヒスチジン、および412位でのメチオニンによる置換；または215位でのプロリン、274位でのアスパラギン、287位でのグリシン、334位でのアスパラギン、365位でのバリン、および396位でのロイシンによる置換；または293位でのバリン、295位でのグルタミン酸、および327位でのトレオニンによる置換；または319位でのフェニルアラニン、352位でのロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または392位でのトレオニン、および396位で

10

20

30

40

50

のロイシンによる置換；または268位でのアスパラギン、および396位でのロイシンによる置換；または290位でのトレオニン、390位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または326位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または268位でのアスパラギン酸、および396位でのロイシンによる置換；または210位でのメチオニン、および396位でのロイシンによる置換；または358位でのプロリン、および396位でのロイシンによる置換；または288位でのアルギニン、307位でのアラニン、344位でのグルタミン酸、および396位でのロイシンによる置換；または273位でのイソロイシン、326位でのグルタミン酸、328位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または326位でのイソロイシン、408位でのアスパラギン、および396位でのロイシンによる置換；または334位でのアスパラギン、および396位でのロイシンによる置換；または379位でのメチオニン、および396位でのロイシンによる置換；または227位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または217位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または261位でのアスパラギン、210位でのメチオニン、および396位でのロイシンによる置換；または419位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換；または370位でのグルタミン酸、および396位でのロイシンによる置換；または242位でのフェニルアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または255位でのロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または240位でのアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または250位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または247位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または410位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換；または419位でのロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または427位でのアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または258位でのアスパラギン酸、および396位でのロイシンによる置換；または384位でのリシン、および396位でのロイシンによる置換；または323位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または244位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換；または305位でのロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または400位でのフェニルアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または303位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換；または243位でのロイシン、305位でのイソロイシン、378位でのアスパラギン酸、404位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または290位でのグルタミン酸、369位でのアラニン、393位でのアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または210位でのアスパラギン、222位でのイソロイシン、320位でのメチオニン、および396位でのロイシンによる置換；または217位でのセリン、305位でのイソロイシン、309位でのロイシン、390位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換；または246位でのアスパラギン、419位でのアルギニン、および396位でのロイシンによる置換；または217位でのアラニン、359位でのアラニン、および396位でのロイシンによる置換；または215位でのイソロイシン、290位でのバリン、および396位でのロイシンによる置換；または275位でのロイシン、362位でのヒスチジン、384位でのリシン、および396位でのロイシンによる置換；または334位でのアスパラギンによる置換；または400位でのプロリンによる置換；または407位でのイソロイシンによる置換；または372位でのチロシンによる置換；または366位でのアスパラギンによる置換；または414位でのアスパラギンによる置換；または352位でのロイシンによる置換；または225位でのセリンによる置換；または377位でのアスパラギンによる置換；または248位でのメチオニンによる置換。

【 0 1 3 8 】

#### D. いずれのFc Rとも結合しない突然変異体

いくつかの実施形態において、本発明は、野生型Fc領域に対して少なくとも1個のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含んでなる分子であって、前記変異型Fc領域が、本明細書に記載する当技術分野で公知の標準アッセイで測定したとき、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、いずれのFc Rとも結合しない、上記分子を包含する。特定の実施形態では、あらゆるFc Rへの結合を完全に破壊する1個以上のアミノ酸の改変は、以下の改変を含んでなる： 232位でのセリン、および304位でのグリシンによる置換；または269

10

20

30

40

50

位でのリシン、290位でのアスパラギン、311位でのアルギニン、および433位でのチロシンによる置換；または252位でのロイシンによる置換；または216位でのアスパラギン酸、334位でのアルギニン、および375位でのイソロイシンによる置換；または247位でのロイシン、406位でのフェニルアラニンによる置換、または335位でのアスパラギン、387位でのセリン、および435位でのグルタミンによる置換；または334位でのグルタミン酸、380位でのアスパラギン酸、および446位でのバリンによる置換；または303位でのイソロイシン、369位でのフェニルアラニン、および428位でのロイシンによる置換；または251位でのフェニルアラニン、および372位でのロイシンによる置換；または246位でのグルタミン酸、284位でのメチオニン、および308位でのアラニンによる置換；または399位でのグルタミン酸、および402位でのアスパラギン酸による置換；または399位でのグルタミン酸、および428位でのロイシンによる置換。

10

【0139】

#### D. 変更されたFc R IIIA R媒介エフェクター機能を有する突然変異体

特定の実施形態において、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が增大している本発明の免疫グロブリンは、本明細書に記載するADCC活性アッセイを用いて測定したとき、増大したFc R媒介エフェクター機能を有する。本発明の分子により媒介されうるエフェクター機能の例としては、限定するものではないが、C1q結合、補体依存性細胞傷害作用、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC)、食作用などが挙げられる。本発明の分子のエフェクター機能は、当技術分野で公知の標準方法を用いてアッセイすることができ、かかる方法の例をセクション5.2.6に記載する。特定の実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が增大している変異型Fc領域を含む本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンと比べて、2倍効果的に抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC)を媒介する。他の実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している変異型Fc領域を含む本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンと比べて、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも $10^4$ 倍、少なくとも $10^5$ 倍効果的に抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC)を媒介する。別の特定の実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、変更されたC1q結合活性を有する。いくつかの実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンよりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも $10^4$ 倍、少なくとも $10^5$ 倍高いC1q結合活性を有する。さらに別の特定の実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、変更された補体依存性細胞傷害作用を有する。さらに別の特定の実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンと比べて、増大した補体依存性細胞傷害作用を有する。いくつかの実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンよりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも $10^4$ 倍、少なくとも $10^5$ 倍高い補体依存性細胞傷害作用を有する。

20

30

40

【0140】

他の実施形態において、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、当業者に公知のまたは本明細書に記載の標準アッセイで測定したとき、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンと比べて、増大した食作用活性を有する。いくつかの実施形態では、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性が増大している本発明の免疫グロブリンは、野生型Fc領域を含む免疫グロブリンよりも、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍高い食作用活性を有する。

【0141】

特定の実施形態において、本発明は、Fc R IIIAおよび/またはFc R IIAに対する親和性

50

が増大している、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含み、その結果、増大したエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害作用または食作用を有する免疫グロブリンを包含する。特定の実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大し、かつ免疫グロブリンのADCC活性を増大する1個以上のアミノ酸の改変は、以下の改変を含んでなる： 379位でのメチオニンによる置換；または243位でのイソロイシン、および379位でのロイシンによる置換；または288位でのアスパラギン、330位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換；または243位でのロイシン、および255位でのロイシンによる置換；または334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンによる置換；または288位でのメチオニン、および334位でのグルタミン酸による置換；または334位でのグルタミン酸、および292位でのロイシンによる置換；または316位でのアスパラギン酸、378位でのバリン、および399位でのグルタミン酸による置換；または315位でのイソロイシン、379位でのメチオニン、および399位でのグルタミン酸による置換；または243位でのイソロイシン、379位でのロイシン、および420位でのバリンによる置換；または247位でのロイシン、および421位でのリシンによる置換；または248位でのメチオニンによる置換；または392位でのトレオニン、および396位でのロイシンによる置換；または293位でのバリン、295位でのグルタミン酸、および327位でのトレオニンによる置換；または268位でのアスパラギン、および396位でのロイシンによる置換；または319位でのフェニルアラニン、352位でのロイシン、および396位でのロイシンによる置換。

10

【 0 1 4 2 】

20

別の特定の実施形態において、免疫グロブリンのADCC活性を増大する1個以上のアミノ酸の改変は、以下の表4に示す突然変異のいずれかである。

【表 4】

E333A, K334A
R292L, K334E
V379M
S219Y
V282M
K222N
F243I, V379L
F243L, R255L, E318K
K334I
K334E, T359N, T366S
K288M, K334E
K288N, A330S, P396L
K326E
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
F243I, V379L, G420V

30

40

E293V, Q295E, A327T	
Y319F, P352L, P396L	
K392T, P396L	
K248M	
H268N, P396L	
K290T, N390I, P396L	
K326I, P396L	
H268D, P396L	
K210M, P396L	
L358P, P396L	10
K288R, T307A, K344E, P396L	
V273I, K326E, L328I, P396L	
K326I, S408N, P396L	
K334N, P396L	
V379M, P396L	
P227S, P396L	
P217S, P396L	
K261N, K210M, P396L	
Q419H, P396L	
K370E, P396L	20
L242F, P396L	
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	
R255L, P396L	
V240A, P396L	
T250S, P396L	
P247S, P396L	
K290E, V369A, T393A, P396L	
K210N, K222I, K320M, P396L	
L410H, P396L	
Q419L, P396L	30
V427A, P396L	
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	
E258D, P396L	
N384K, P396L	
V323I, P396L	
K246N, Q419R, P396L	
P217A, T359A, P396L	
P244H, P396L	
V215I, K290V, P396L	
F275L, Q362H, N384K, P396L	40
V305L, P396L	
S400F, P396L	
V303I, P396L	

## 【 0 1 4 3 】

本発明は、2nd-4th-ラウンドのソーティング後に突然変異体の酵母ライブラリーから本発明の方法を用いて同定されたFc領域の特定の変異体を包含する。表5に、本発明の方法を用いて同定された種々の突然変異体をまとめてある。これらの突然変異体は、Fc RIII AおよびFc RIIBへの結合を測定するためのELISAアッセイを用いて測定した。突然変異体はまた、本明細書に記載し例示する方法を用いてFc変異体をch 4-4-20抗体にクローニン

グすることにより、ADCCアッセイにおいても試験した。太字の項目は実験を指しており、その際、ADCCアッセイ前にch 4-4-20抗体を精製した。用いた抗体濃度は0.5~1.0 µg/mLの範囲であった。

【表5】

突然変異	ドメイン	FeγRIIIAへの結合 (ELISA)	FeγRIIBへの結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
3A ラトラーマを用いた pYD-CH1 ライブラリー-FACS スクリーニング				
Q347H; A339V	CH3	↑0.5x	NT	
S415I; L251F	CH2, CH3	↑0.5x	↑.75x	<b>0.82</b>
K392R	CH3	N/C	NT	
D399E; R292L; V185M	CH1, CH2, CH3	N/C	↑0.5x	<b>0.65</b> <b>0.9</b>
K290E; L142P	CH1, CH2	N/C	NT	
R301G; M252L; S192T	CH1, CH2	↓.5x	NT	
P291S; K288E; H268L; A141V	CH1, CH2	↓.5x	NT	
N315I	CH2	N/C	↑.75x	
S132I	CH1	N/C	NT	
S383N; N384K; T256N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M	All	↑0.5x	NT	
S408I; V215I; V125L	CH1, CH2, CH3	↑0.5x	↑.75x	<b>0.62</b>
P396L	CH3	↑1x	↑1x	<b>0.55</b>
G385E; P247H;	CH2, CH3	↑1x	↑.75x	<b>0.44</b>
P396H	CH3	↑1x	↑1x	<b>0.58</b>
A162V	CH1	N/C	NT	
V348M; K334N; F275I; Y202M; K147T	CH1, CH2, CH3	↑0.5x	↑.75x	<b>0.33</b>
H310Y; T289A; G337E	CH2	↑.5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D	CH1, CH2, CH3	N/C	N/C	<b>0.29</b>
K409R; S166N	CH1, CH3	N/C	NT	
in vitro 部位特異的突然変異体				
R292L	CH2	NT	NT	<b>0.82</b>
T359N	CH3	NT	NT	<b>1.06</b>

Fe 領域中の同定された突然変異

10

20

30

40

突然変異	ドメイン	FcγRIIIA への結合 (ELISA)	FcγRIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
T366S	CH3	NT	NT	0.93
E333A, K334A	CH2	NT	NT	1.41
R292L, K334E	CH2	NT	NT	1.41; 1.64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3	NT	NT	0.89; 1.15
V379L	CH3	NT	NT	0.83
K288N	CH2	NT	NT	0.78
A330S	CH2	NT	NT	0.52
F243L	CH2	NT	NT	0.38
E318K	CH2	NT	NT	0.86
K288N, A330S	CH2	NT	NT	0.08
R255L, E318K	CH2	NT	NT	0.82
F243L, E318K	CH2	NT	NT	0.07
4-4-20 ミニライブラリー中の突然変異体 増大した FcγRIIIA 結合性、減少したか変化なしの FcγRIIB 結合性				
V379M	CH3	↑2x	N/C	1.47
S219Y	Hinge	↑1x	↓or N/B	1.28
V282M	CH2	↑1x	↓or N/B	1.25; 1
F275I, K334N, V348M	CH2	↑0.5x	N/C	
D401V	CH3	↑0.5x	N/C	
V279L, P395S	CH2	↑1x	N/C	
K222N	Hinge	↑1x	↓or N/B	1.33; 0.63
K246T, Y319F	CH2	↑1x	N/C	
F243I, V379L	CH2, CH3	↑1.5x	↓or N/B	1.86; 1.35
F243L, R255L, E318K	CH2	↑1x	↓or N/B	1.81; 1.45
K334I	CH2	↑1x	N/C	2.1; 1.97
K334E, T359N, T366S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	1.49; 1.45

突然変異	ドメイン	FcγRIIIA への結合 (ELISA)	FcγRIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
K288M, K334E	CH2	↑3x	↓ or N/B	1.61; 1.69
K334E, E380D	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
T256S, V305I, K334E, N390S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
K334E	CH2	↑2.5x	N/C	1.75; 2.18
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L	CH2, CH3	↑0.5x	N/C	
E233D, K334E	CH2	↑1.5x	N/C	0.94; 1.02
K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	↑1x	N/C	
増大した FcγRIIIA および FcγRIIB に対する結合性				
K246T, P396H	CH2, CH3	↑1x	↑2.5x	
H268D, E318D	CH2	↑1.5x	↑5x	
K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	↑5x	↑3x	2.34; 1.66; 2.54
I377E	CH3	↑1.5x	↑0.5x	
P244H, I358M, V379M, N384K, V397M	CH2, CH3	↑1.75x	↑1.5x	
P217S, A378V, S408R	Hinge, CH3	↑2x	↑4.5x	
P247L, I253N, K334N	CH2	↑3x	↑2.5x	
P247L	CH2	↑0.5x	↑4x	0.91; 0.84
F372Y	CH3	↑0.75x	↑5.5x	0.88; 0.59
K326E	CH2	↑2x	↑3.5x	1.63; 2
K246I, K334N	CH2	↑0.5x	↑4x	0.66; 0.6
K320E, K326E	CH2	↑1x	↑1x	
H224L	Hinge	↑0.5x	↑5x	0.55; 0.53
S375C, P396L	CH3	↑1.5x	↑4.5x	
増大した FcγRIIIA 結合性、減少した FcγRIIB 結合性				

突然変異	ドメイン	Fe $\gamma$ RIIIA への結合 (ELISA)	Fe $\gamma$ RIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
D312E,K327N,I378S	CH2,CH3	↑0.5x	N/C	
K288N,K326N	CH2	↑1x	N/C	
F275Y	CH2	↑3x	N/C	0.64
P247L,N421K	CH2,CH3	↑3x	N/C	2.0
S298N,W381R	CH2,CH3	↑2x	N/C	
D280E,S354F,A431D,L441I	CH2,CH3	↑3x	N/C	0.62
R255Q,K326E	CH2	↑2x	N/C	0.79
K218R,G281D,G385R	H,CH2,CH3	↑3.5x	N/C	0.67
L398V	CH3	↑1.5x	N/C	
P247L,A330T,S440G	CH2,CH3	↑0.75x	↓0.25x	
V284A,F372L	CH2,CH3	1x	N/C	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	1.25x	N/C	
P247L,A431V,S442F	CH2,CH3	1x	N/C	
増大した Fe $\gamma$ RIIIA および Fe $\gamma$ RIIB に対する結合性 P343S,P353L,S375I,S383N	CH3	↑0.5x	↑6x	
T394M,V397M	CH3	↑0.5x	↑3x	
E216D,E345K,S375I	H,CH2,CH3	↑0.5x	↑4x	
K334N,	CH2	↑0.5x	↑2x	
K288N,A330S,P396L	CH2,CH3	↑0.5x	↑9x	
P247L,E389G	CH2,CH3	↑1.5x	↑9x	
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M	H,CH2,CH3	↑1x	↑7x	
G316D,A378V,D399E	CH2,CH3	↑1.5x	↑14x	2.24
N315I,V379M,T394M	CH2,CH3	↑1x	↑9x	1.37
K290T,G371D,	CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
P247L,L398Q	CH2,CH3	↑1.25x	↑10x	

突然変異	ドメイン	FcγRIIIA への結合 (ELISA)	FcγRIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
K326Q,K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑1.5x	↑5x	
S400P	CH3	↑1x	↑6x	
P247L,I377F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
A378Y,N390I,V422I	CH3	↑0.5x	↑5x	
K326E,G385E	CH2,CH3	↑0.5x	↑15x	
V282E,V369I,L406F	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
V397M,I411A,S415N	CH3	↑0.25x	↑5x	
T223I,T256S,L406F	H, CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
S298N,S407R	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
K246R,S298N,I377F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
S407I	CH3	↑0.5x	↑4x	
F372Y	CH3	↑0.5x	↑4x	
L235P,V382M,S304G,V305I,V323I	CH2,CH3	↑2x	↑2x	
P247L,W313R,E388G	CH2,CH3	↑1.5x	↑1x	
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L	H, CH2,CH3	↑2.5x	↑6x	
E258D,N384K	CH2,CH3	↑1.25x	↑4x	
F241L,E258G	CH2	↑2x	↑2.5x	-0.08
K370N,S440N	CH3	↑1x	↑3.5x	
K317N,F423-deleted	CH2,CH3	↑2.5x	↑7x	0.18
F243I,V379L,G420V	CH2,CH3	↑2.5x	↑3.5x	1.35
P227S,K290E	H, CH2	↑1x	↑0.5x	
A231V,Q386H,V412M	CH2,CH3	↑1.5x	↑6x	
T215P,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑4x	
増大したFcγRIIBに対する結合性、FcγRIIIAについては変化なし				

突然変異	ドメイン			
K334E,E380D	CH2,CH3		FcγRIIIA への結合 (ELISA)	FcγRIIB への結合 (ELISA)
T366N	CH3		N/C	↑4.5x
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T	CH2,CH3		N/C	↑5x
			N/C	↑3x
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V	H, CH2,CH3		↓0.25x	↑10x
減少した FcγRIIIA および FcγRIIB に対する結合性				
R301H, K340E,D399E	CH2,CH3		↓0.50x	↓0.25x
K414N	CH3		↓0.25x	N/B
P291S,P353Q	CH2,CH3		↓0.50x	↓0.25x
V240I, V281M	CH2		↓0.25x	↓0.25x
P232S, S304G	CH2		N/B	N/B
E269K,K290N,Q311R,H433Y	CH2,CH3		N/B	N/B
M352L	CH3		N/B	N/B
E216D,K334R,S375I	H, CH2,CH3		N/B	N/B
P247L,L406F	CH2,CH3		N/B	N/B
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3		N/B	N/B
T225S	CH2		↓0.25x	↓0.50x
D399E,M428L	CH3		↓0.50x	↓0.50x
K246I,Q362H,K370E	CH2,CH3		N/B	↓0.50x
K334E,E380D,G446V	CH2,CH3		N/B	N/B
I377N	CH3		↓0.50x	N/B
V303I,V369F,M428L	CH2,CH3		N/B	N/B
L251F,F372L	CH2,CH3		N/B	N/B
K246E,V284M,V308A	CH2,CH3		N/B	N/B
D399E,G402D	CH3		N/B	N/B

突然変異						
D399E, M428L	ドメイン	CH3	N/B	N/B	4-4-20 ADCC	
Fe $\gamma$ RIIB 減損/Fe $\gamma$ RIIIA 選択: 天然 Fe ライプラー						
E293V, Q295E, A327T	CH2	CH2	↑0.4x	↓ or N/B	4.29	
Y319F, P352L, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑3.4x	↑2x	1.09	
K392T, P396L	CH3	CH3	↑4.5x	↑2.5x	3.07	
K248M	CH2	CH2	↑0.4x	↓ or N/B	4.03	
H268N, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑2.2x	↑4.5x	2.24	
溶液融合 40X Fe $\gamma$ RIIB-G12: P396 ライプラー						
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D			↑3.6x	↑0.1x	3.17	
平衡スクリーニング: 0.8 $\mu$ M Fe $\gamma$ RIIIA モノマー: P396L ライプラー						
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑2.8x	↑6.1x	1.93	
K326L, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑2.9x	↑5.9x	1.16	
H268D, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑3.8x	↑13.7x	2.15	
K210M, P396L	CH1, CH3	CH1, CH3	↑1.9x	↑4.6x	2.02	
L358P, P396L	CH3	CH3	↑1.9x	↑4.2x	1.58	
K288R, T307A, K344E, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑4.1x	↑2.3x	3.3	
V273I, K326E, L328I, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑1.3x	↑10.8x	0.78	
K326L, S408N, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑4x	↑9.3x	1.65	
K334N, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑3.1x	↑3x	2.43	
V379M, P396L	CH3	CH3	↑1.9x	↑5.6x	2.01	
P227S, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑1.5x	↑4x	2.01	
P217S, P396L	H, CH3	H, CH3	↑1.6x	↑4.5x	2.04	
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	CH2, CH3	↑2x	↑4.2x	2.06	
速度論的スクリーニング: 0.8 $\mu$ M の 1' と 8 $\mu$ M の非標識 Fe $\gamma$ RIIIA: P396L ライプラー						

突然変異	ドメイン	Fc $\gamma$ RIIIA への結合 (ELISA)	Fc $\gamma$ RIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
term is M, P396L	CH3	↑1.9x	↑7.2x	3.09
Q419H, P396L	CH3	↑2x	↑6.9x	2.24
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑6.6x	2.47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4.1x	2.4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	↑1.6x	↑5.4x	3.59
R255L, P396L	CH2, CH3	↑1.8x	↑6x	2.79
V240A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑4.2x	2.35
T250S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑6.8x	1.60
P247S, P396L	CH2, CH3	↑1.2x	↑4.2x	2.10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑6.7x	1.55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2, CH3	↑2.7x	↑8.7x	1.88
L410H, P396L	CH3	↑1.7x	↑4.5x	2.00
Q419L, P396L	CH3	↑2.2x	↑6.1x	1.70
V427A, P396L	CH3	↑1.9x	↑4.7x	1.67
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2, CH3	↑2x	↑7x	1.54
E258D, P396L	CH2, CH3	↑1.9x	↑4.9x	1.54
N384K, P396L	CH3	↑2.2x	↑5.2x	1.49
V323I, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑8.2x	1.29
K246N, Q419R, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑4.8x	1.10
P217A, T359A, P396L	H, CH2, CH3	↑1.5x	↑4.8x	1.17
P244H, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4x	1.40
V215I, K290V, P396L	H, CH2, CH3	↑2.2x	↑4.6x	1.74
F275L, Q362H, N384K, P396L	CH2, CH3	↑2.2x	↑3.7x	1.51
V305L, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑5.5x	1.50
S400F, P396L	CH3	↑1.5x	↑4.7x	1.19
V303I, P396L	CH3	↑1.1x	↑4x	1.01
Fc $\gamma$ RIIB 減損 Fc $\gamma$ RIIIA 158V 固相選択 ; 天然ライブラリー				

10

20

30

40

突然変異	ドメイン	FcγRIIIA への結合 (ELISA)	FcγRIIB への結合 (ELISA)	4-4-20 ADCC
A330V, H433Q, V427M	CH2, CH3	NT	NT	NT
V263Q, E272D, Q419H	CH2, CH3	NT	NT	NT
N276Y, T393N, W417R	CH2, CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H	CH2, CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R	CH2, CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R	CH2, CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N	CH2	NT	NT	NT
V263Q, E272D	CH2	NT	NT	NT
R292G	CH2	NT	NT	NT
S298N	CH2	NT	NT	NT
E233G, P247S, L306P	CH2	NT	NT	NT
D270E	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T	CH2	NT	NT	NT
E233G	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L	CH2, CH3	NT	NT	NT
FcγRIIB 減損 FcγRIIIA 158F 固相選択 : 天然ライブラリー				
FACS 上位 0.2% による 158F				
V284M, S298N, K334E, R355W R416T	CH2, CH3	NT	NT	NT

## 【 0 1 4 4 】

好ましい実施形態において、本発明は、1個以上のアミノ酸の改変を有する変異型Fc領域を含む改変された免疫グロブリン分子（例えば、抗体）であって、前記1個以上のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸の改変が、該分子のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大するものである、上記分子を提供する。そのような免疫グロブリンには、天然でFc R結合領域（例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域）を含むIgG分子、またはFc R結合領域（例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域）を含むように遺伝子操作された免疫グロブリン誘導体が含まれる。本発明の改変された免疫グロブリンは、抗原と結合し、好ましくは免疫特異的に結合し、すなわち、特異的な抗原-抗体結合をアッセイするための当技術分野で周知のイムノアッセイで測定したとき非特異的結合に対しては競合せず、かつFc R結合領域（例えば、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIB結合領域）を含む、どのような免疫グロブリン分子も包含する。かかる抗体としては、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異的、多重特異的、ヒト、ヒト化、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、ジスルフィド架橋Fv、およびVLもしくはVHドメインのいずれかまたは抗原と特異的に結合する相補性決定領域(CDR)さえも含む、特定の場合にはFc R結合領域を含むように遺伝子操作されたまたはFc R結合領域に融合された、フラグメントが含まれる。

#### 【0145】

いくつかの実施形態において、本発明の分子は、Fc領域の部分を含んでなる。本明細書中で用いる「Fc領域の部分」とは、Fc領域の断片、好ましくはエフェクター活性および/またはFc R結合活性を有する部分（またはそのような活性を欠く突然変異体の対応領域）を意味する。Fc領域の断片は、5アミノ酸から、全Fc領域より1アミノ酸を除いたものまでのサイズ範囲でありうる。Fc領域の部分は、N末端またはC末端から最大10、最大20、最大30アミノ酸を欠失していてもよい。

#### 【0146】

本発明のIgG分子はIgG1サブクラスであることが好ましいが、所与の動物のどのような他のIgGサブクラスであってもよい。例えば、ヒトでは、IgGクラスにIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4が含まれ、マウスでは、IgGクラスにIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2cおよびIgG3が含まれる。

#### 【0147】

免疫グロブリン（および本明細書において用いる他のポリペプチド）は、鳥類や哺乳類を含めて、どのような動物に由来するものであってもよい。好ましくは、抗体はヒト、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリのものである。本明細書中で用いる「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体、または、以下に記載されまた例えばKucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号に記載されるような、1以上のヒト免疫グロブリンに対してトランスジェニックでありかつ内在性の免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体が含まれる。

本発明の抗体は、単一特異的、二重特異的、三重特異的、またはそれ以上の多重特異的でありうる。多重特異的抗体は、1つのポリペプチドの異なるエピトープに特異的であっても、固相支持材料や異種ポリペプチドのような異種エピトープに特異的であってもよい。例えば、PCT公開 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tuttら, J. Immunol., 147: 60-69, 1991; 米国特許第4,474,893号; 第4,714,681号; 第4,925,648号; 第5,573,920号; 第5,601,819号; Kostelnyら, J. Immunol., 148: 1547-1553, 1992を参照されたい。

#### 【0148】

本発明の抗体には、他の方法で修飾されている誘導体、すなわち、抗体への任意のタイプの分子の共有結合により修飾された誘導体が含まれる。ただし、その共有結合は、抗体が抗原と結合したりおよび/または抗イディオタイプ応答を生成したりするのを妨げないものである。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体には、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾されている抗体が含まれる。多数の化学的修飾のうちのどれを公知の技法で行なってもよく、例

10

20

30

40

50

えば、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに限らない。さらに、抗体誘導体は古典的アミノ酸以外のアミノ酸を1個以上含んでいてもよい。

#### 【0149】

抗体のヒトでの *in vivo* 使用および *in vitro* 検出アッセイを含めて、いくつかの用途においては、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を用いることが好ましい。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えば、マウスモノクローナル抗体由来の変領域とヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有する抗体などである。キメラ抗体の作製方法は当技術分野で公知である。例えば、Morrison, *Science*, 229: 1202, 1985; Oiら, *BioTechniques*, 4: 214 1986; Gilliesら, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202, 1989; 米国特許第5,807,715号; 第4,816,567号; および第4,816,397号を参照されたい(これらをそのまま参照により本明細書に組み入れる)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域(CDR)と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域および定常ドメインとを有する、所望の抗原と結合する非ヒト種由来の抗体分子である。往々にして、ヒトフレームワーク領域のフレームワーク残基をCDRドナー抗体由来の対応する残基で置換すると、抗原結合が改変される(好ましくは改善される)だろう。こうしたフレームワーク置換は当技術分野で公知の方法により確認することができ、例えば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定するには、CDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリングを行い、また、特定の位置にある特異なフレームワーク残基を同定するには、配列比較を行う。例えば、Queenら, 米国特許第5,585,089号; Riechmannら, *Nature*, 332: 323, 1988を参照されたい(これらをそのまま参照により本明細書に組み入れる)。抗体は、当技術分野で公知の様々な技法によりヒト化することができ、例えば、以下の方法が含まれる: CDR-グラフィング(EP 239,400; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 第5,530,101号および第5,585,089号)、ベニアリング(*veneering*)またはリサーフェシング(*resurfacing*) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498, 1991; Studnickaら, *Protein Engineering*, 7(6): 805-814, 1994; Roguskaら, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-973, 1994)、およびチェーンシャuffling(*chain shuffling*) (米国特許第5,565,332号) (これら全てをそのまま参照により本明細書に組み入れる)。

#### 【0150】

ヒト患者の治療には、完全にヒトの抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な方法で作製することができ、例えば、ヒト免疫グロブリン配列から誘導された抗体ライブラリーを用いる上記のファージディスプレイ法がある。米国特許第4,444,887号および第4,716,111号; ならびにPCT公開WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; およびWO 91/10741を参照されたい(これらをそのまま参照により本明細書に組み入れる)。

#### 【0151】

また、ヒト抗体は、トランスジェニックマウスを用いて製造することができ、かかるマウスは、機能的な内因性の免疫グロブリンを発現する能力がないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができる。ヒト抗体を製造するための当該技術の概要については、LonbergおよびHuszar, *Int. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, 1995を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を製造するための当該技術の詳細、ならびに前記抗体を製造するためのプロトコルについては、PCT公開WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; ヨーロッパ特許第0 598 877号; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569, 825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; および第5,939,598号を参照されたい(これらをそのまま参照により本明細書に組み入れる)。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)、Medarex (NJ) および Genpharm (San Jose, CA) といった会社は、上記の技法と類似した方法を用いて、所定の抗原に対するヒト抗体を提供することを請け負っている。

#### 【0152】

所定のエピトープを認識する完全にヒトの抗体は、「guided selection」と呼ばれる技法を用いて作製することができる。この方法では、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を案内するために、所定の非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を用いる（Jespersら、Bio/technology, 12: 899-903, 1988）。

【0153】

本発明は、ヒトまたはヒト化治療用抗体（例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体）のFc領域を、少なくとも1個のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含し、ただし前記改変は、Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させるものである。別の実施形態では、本発明は、ヒトまたはヒト化治療用抗体（例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体）のFc領域を、少なくとも1個のアミノ酸残基の改変により操作することに関し、ただし前記改変は、Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させ、かつFc領域のFc RIIIBに対する親和性を減少させるものである。操作された治療用抗体はさらに、当業者に公知の標準アッセイで測定して、増大したエフェクター機能（例えば、増大したADCC活性、食作用活性など）をもちうる。

10

【0154】

特定の実施形態において、本発明は、Her2/neuプロトオンコジーン（がん原遺伝子）に特異的なヒト化モノクローナル抗体（例えば、Carterら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9に記載されるようなAb4D5ヒト化抗体）を、少なくとも1個のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含し、ただし前記改変は、Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させるものである。別の特定の実施形態では、ヒト化Her2/neuモノクローナル抗体の改変はさらに、Fc領域のFc RIIIBに対する親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、操作された、Her2/neuに特異的なヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり本明細書にも開示する標準アッセイで測定して、増大したエフェクター機能をさらにもちうる。

20

【0155】

別の特定の実施形態においては、本発明は、マウスとヒトのキメラ抗CD20モノクローナル抗体2H7を、少なくとも1個のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含し、ただし前記改変は、Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させるものである。別の特定の実施形態では、抗CD20モノクローナル抗体2H7の改変はさらに、Fc領域のFc RIIIBに対する親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、操作された抗CD20モノクローナル抗体2H7は、当技術分野で公知であり本明細書にも開示する標準アッセイで測定して、増大したエフェクター機能をさらにもちうる。

30

【0156】

別の特定の実施形態においては、本発明は、抗Fc RIIIB抗体（2002年8月12日付の米国仮特許出願第60/403,266号および代理人整理番号011183-010-999を有する2003年8月14日付の米国特許出願第10/643,857号に開示される抗体を含むが、それらに限らない）を、少なくとも1個のアミノ酸残基の改変（例えば、置換、挿入、欠失）により操作することを包含し、ただし前記改変は、Fc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させるものである。本発明の方法に従って操作しうる抗Fc RIIIB抗体の例は、ATCC受託番号PTA-4591を有する2B6モノクローナル抗体およびATCC受託番号PTA-4592を有する3H7である（寄託：10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011）。別の特定の実施形態では、抗Fc RIIIB抗体の改変はさらに、Fc領域のFc RIIIBに対する親和性を減少させるものである。さらに別の特定の実施形態では、操作された抗Fc RIIIB抗体は、当技術分野で公知であり本明細書にも開示する標準アッセイで測定して、増大したエフェクター機能をさらにもちうる。特定の実施形態では、2B6モノクローナル抗体は、334位でのグルタミン酸、359位でのアスパラギン、および366位でのセリンによる改変(MgFcI3); または316位でのアスパラギン酸、378位でのバリン、および399位でのグルタミン酸による

40

50

置換(MgFc27); または243位でのイソロイシン、379位でのロイシン、および420位でのバリンによる置換(MgFc29); または392位でのトレオニン、および396位でのロイシンによる置換(MgFc38); または221位でのグルタミン酸、270位でのグルタミン酸、308位でのアラニン、311位でのヒスチジン、396位でのロイシン、および402位でのアスパラギン酸による置換(MgFc42); または410位でのヒスチジン、および396位でのロイシンによる置換(MgFc53); または243位でのロイシン、305位でのイソロイシン、378位でのアスパラギン酸、404位でのセリン、および396位でのロイシンによる置換(MgFc54); または255位でのイソロイシン、および396位でのロイシンによる置換(MgFc55); または370位でのグルタミン酸、および396位でのロイシンによる置換(MgFc59)を含む(表5参照)。

【0157】

10

#### 5.1.1 ポリペプチドおよび抗体コンジュゲート

変異型Fc領域を含む本発明の分子(すなわち、ポリペプチド、抗体)は、融合タンパク質を作製するために、異種ポリペプチド(すなわち、無関係なポリペプチドまたはその部分、好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド)と組換えにより融合させたり、または化学的に結合させたり(共有結合と非共有結合の両方を含む)することができる。融合は必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を介して行なってもよい。

【0158】

さらに、変異型Fc領域を含む本発明の分子(すなわち、ポリペプチド、抗体)は、治療薬または所与の生物学的応答を改変する薬物成分とコンジュゲートさせることができる。治療薬または薬物成分は古典的な化学治療薬に限定されると解釈されるべきでない。例えば、薬物成分は所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質の例としては、以下のものが挙げられる: 毒素、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素(すなわち、PE-40)、またはジフテリア毒素、リシン(ricin)、ゲロニン(gelonin)、およびヤマゴボウ(pokeweed)抗ウイルスタンパク質、腫瘍壊死因子のようなタンパク質、 $\alpha$ -インターフェロン(IFN- $\alpha$ )、 $\beta$ -インターフェロン(IFN- $\beta$ )を含むがこれらに限らないインターフェロン、神経成長因子(NGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)、アポトーシス薬(例えば、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、PCT公開WO 97/33899に開示されたAIM I)、AIM II (PCT公開WO 97/34911)、Fasリガンド(Takahashiら, J. Immunol., 6:1567-1574, 1994)、およびVEGI (PCT公開WO 99/23105)、血栓薬または抗血管形成薬(例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン)、または生物学的応答改変剤、例えば、リンホカイン(例: インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF))、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、または増殖因子、例えば成長ホルモン(GH); プロテアーゼ、またはリボヌクレアーゼ。

20

30

【0159】

本発明の分子(すなわち、ポリペプチド、抗体)は、マーカー配列、例えば精製を容易にするペプチド、と融合させることができる。好ましい実施形態においては、マーカーアミノ酸配列はヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えば、とりわけ、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)中に提供されるタグであり、これらのは多くは市販されている。Gentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989に記載の通り、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の精製を容易にする。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定するものではないが、インフルエンザヘマグルチンタンパク質から誘導されるエピトープに対応するヘマグルチニン「HA」タグ(Wilsonら, Cell, 37: 767 1984)および「flag」タグ(Knappikら, Biotechniques, 17(4):754-761, 1994)が挙げられる。

40

【0160】

さらなる融合タンパク質は、遺伝子-シャフリング、モチーフ-シャフリング、エキソン

50

-シャフリング、および/またはコドン-シャフリング(まとめて「DNAシャフリング」と呼ぶ)の技術を介して作製することができる。DNAシャフリングを用いて本発明の分子の活性を改変することができる(例えば、より高い親和性およびより低い解離速度をもつ抗体)。一般的には、米国特許第5,605,793号;第5,811,238号;第5,830,721号;第5,834,252号;および第5,837,458号、ならびにPattenら, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33;Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76;Hansson,ら, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265;ならびにLorenzoおよびBlasco, 1998, *BioTechniques* 24:308を参照されたい(これらの特許および刊行物をそのまま参照により本明細書に組み入れる)。変異型Fc領域を含む本発明の分子、または本発明の分子をコードする核酸は、組換えに先立って、誤りがちなPCRによる無作為突然変異誘発、無作為ヌクレオチド挿入または他の方法に供することによりさらに改変することができる。本発明の分子をコードするポリヌクレオチドの1以上の部分を、1以上の異種分子のモチーフ、セクション、パーツ、ドメイン、フラグメントなどの1以上の成分と組換えることもできる。

#### 【0161】

本発明はまた、診断薬もしくは治療薬とコンジュゲートされた、または血清半減期の増加が所望されかつ/または特定の細胞のサブセットにターゲティングされるいずれか他の分子とコンジュゲートされた、変異型Fc領域を含む本発明の分子(すなわち、抗体、ポリペプチド)を包含する。本発明の分子を診断に用いて、例えば、所与の治療計画の効力を調べるために、臨床試験操作の一部として疾患、障害または感染の発生または進行をモニターすることができる。本発明の分子を検出可能な物質とカップリングさせることにより、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、各種酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、ポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質を、直接的にまたは間接的に中間体(例えば、当技術分野で公知のリンカー)を介して、当技術分野で公知の技術により本発明の分子とカップリングまたはコンジュゲートすることができる。例えば、本発明に従って診断薬として使用される抗体にコンジュゲートすることができる金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照されたい。かかる診断および検出は、本発明の分子を、検出可能な物質にカップリングすることにより実施することができる。検出可能な物質としては、以下のものが挙げられる: 酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない; 補欠分子団複合体、例えば、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含むが、これらに限定されない; 蛍光物質、例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含むが、これらに限定されない; 発光物質、例えば、ルミノールを含むが、これに限定されない; 生物発光物質、例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含むが、これらに限定されない; 放射性物質、例えば、ビスマス( $^{213}\text{Bi}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、クロム( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ガリウム( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、ゲルマニウム( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタン( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム( $^{103}\text{Pd}$ )、リン( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジウム( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム( $^{47}\text{Sc}$ )、セレン( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、キセノン( $^{133}\text{Xe}$ )、イットルビウム( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム( $^{90}\text{Y}$ )、亜鉛( $^{65}\text{Zn}$ ); 様々なポジトロン放出断層撮影に用いるポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオン。

#### 【0162】

変異型Fc領域を含む本発明の分子(すなわち、ポリペプチド、抗体)は、治療成分、例えば細胞毒素(例えば、細胞増殖抑制薬または殺細胞薬)、治療薬または放射性元素(例

10

20

30

40

50

えば、線放射体、線放射体など)とコンジュゲートすることができる。細胞毒素または細胞毒性薬には、細胞に有害であればいずれの薬剤も含まれる。例としては、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体が挙げられる。治療薬としては、限定するものではないが、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロランブシル(thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(旧名称ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(旧名称アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、および抗有糸分裂薬(例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が挙げられる。

#### 【0163】

さらに、本発明の分子は、治療成分、例えば放射性物質または大環状キレート剤(放射性金属イオン(放射性物質の例については上記参照)をコンジュゲートするために有用である)にコンジュゲートすることができる。ある特定の実施形態においては、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体と結合することができる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)である。このようなリンカー分子は当技術分野では公知であり、Denardoら, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Petersonら, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; およびZimmermanら, 1999, Nucl. Med. Biol. 26: 943-50に記載されている(それぞれ、参照によりその全体を本明細書に組み入れる)。

#### 【0164】

このような治療成分を抗体とコンジュゲートする技術は周知であり、例えば、Arnonら, 「癌治療法における薬物の免疫ターゲティング用のモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら(編), 1985, pp.243-56, Alan R. Liss, Inc.; Hellstromら, 「薬物送達用の抗体(Antibody For Drug Delivery)」, Controlled Drug Delivery (第2版), Robinsonら(編), 1987, pp.623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, 「癌治療法における細胞毒性薬の抗体キャリアー: 総説(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら(編), 1985, pp.475-506; 「癌治療法における放射性標識抗体の治療用途の分析、結果、ならびに将来予測(Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら(編), 1985, pp.303-16, Academic Press; およびThorpeら, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982を参照されたい。

#### 【0165】

一つの実施形態において、本発明の分子が変異型Fc領域を含む抗体である場合、かかる抗体は、それにコンジュゲートされた治療成分を伴ってまたは伴わないで、単独で投与することができるし、または治療薬として用いるための細胞毒性因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与することもできる。あるいは、本発明の抗体を第2の抗体とコンジュゲートさせて、米国特許第4,676,980号(参照によりその全体を本明細書に組み入れる)においてSegalにより記載された抗体ヘテロコンジュゲートを作製することができる。本発明の抗体はまた、固相支持体に結合させてもよく、これはイムノアッセイまたは

10

20

30

40

50

標的抗原の精製に特に有用である。このような固相支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

【0166】

#### 5.2 変異型Fc領域を含む分子の、増大したFc RIII結合についてのスクリーニング、ならびにその特性決定

好ましい実施形態では、本明細書に記載した酵母ディスプレイ技術と1種以上の生化学的アッセイを、好ましくはハイスループット法において併用し、変更されたFc R親和性(例えば、増大したFc RIIIA親和性)を持つ変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定を実施する。1種以上の生化学的アッセイとしては、Fc-Fc R相互作用、すなわちFc領域のFc Rへの特異的結合を同定するための、当技術分野で知られているあらゆるアッセイが可能であり、限定するわけではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイ、アフィニティクロマトグラフィー、および平衡透析が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載した酵母ディスプレイ技術と1種以上の機能的アッセイを、好ましくはハイスループット法において併用し、変更されたFc R親和性(例えば、増大したFc RIIIA親和性)を持つ変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定を実施する。機能的アッセイとは、本明細書中、セクション5.2.6に記載するものなどの、1種以上のFc R介在エフェクター細胞機能を特定するための、当技術分野で知られているどんなアッセイでもよい。本発明の方法に従って使用することができるエフェクター細胞機能の非限定例として、限定するわけではないが以下が含まれる：抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、抗体依存性食作用、食作用、オプソニン作用、オプソニン食作用、細胞結合、ロゼット化、C1q結合、および補体依存性細胞傷害。いくつかの実施形態では、本明細書に記載した酵母ディスプレイ技術と1種以上の生化学的アッセイを、1種以上の機能的アッセイと組み合わせるか、同時進行させて、好ましくはハイスループット手法で併用して、変更されたFc R親和性(例えば、増大したFc RIIIA親和性)を持つ変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定を実施する。

【0167】

Fc領域のFc Rへの「特異的結合」との用語は、Fc領域と、例えば、ELISAまたは表面プラズモン共鳴アッセイ(例えば、BIAcore™)を使用して測定して、モノマーFc RIIIAの場合ならば少なくとも約150nM、ダイマーFc RIIBの場合ならば少なくとも約60nMの親和定数を持つ、特定のFc Rとの相互作用である。モノマーFc RIIIAに対するFc領域の親和定数は、150nM、200nMまたは300nMでよい。ダイマーFc RIIBに対するFc領域の親和定数は、60nM、80nM、90nM、または100nMでよい。本発明の方法で使用するためのダイマーFc RIIBは、当業者に知られた方法を使用して作製することができる。典型的には、Fc RIIBの細胞外領域を、ダイマー化が可能な異種ポリペプチドに共有結合させて、生成する融合タンパク質がダイマーとなるようにする。例えば、2003年1月13日付け出願の米国特許出願 No.60/439,709(代理人整理番号 11183-005-888)を参照されたい。その全体を参照により本明細書に組み入れる。特異的相互作用は一般的に、例えば以下のような生理学的条件下で安定である：ヒトまたはその他の脊椎動物もしくは無脊椎動物などの生命体中に見出される条件、ならびに細胞培養中に見出される条件、例えば哺乳動物細胞またはその他の脊椎動物組織もしくは非脊椎動物組織からの細胞を維持および培養するために使用される条件。

【0168】

特定の実施形態では、変異型Fc領域と変更されたFc R親和性を含む分子のスクリーニングおよび同定として以下が含まれる：変異型Fc領域を含む分子の酵母表面での提示；ならびに、Fc-Fc R相互作用の測定のための生化学的アッセイ、好ましくはELISAアッセイを使用する、変異型Fc領域を含む分子のFc R(1個またはそれ以上)への結合の特定。少なくとも1種の生化学的アッセイ、例えばELISAアッセイによって、変異型Fc領域を含む分子を1種以上のFc Rとのその相互作用について特性決定し、1種以上のFc Rに対して変更された親和性を持つことを判定した後、当技術分野で既知の標準的組換えDNA技法を使用し

て、その分子を完全免疫グロブリン中に導入し、さらに生化学的に特性決定するため、この変異型Fc領域を含む免疫グロブリンを哺乳動物細胞中で発現させる。本発明の変異型Fc領域を導入する(例えば、免疫グロブリンのFc領域を置換する)ことができる免疫グロブリンは、限定するわけではないが、以下を含むどんな免疫グロブリンでもよい: ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異的抗体、多重特異的抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体。好ましい実施形態では、変異型Fc領域を、細胞表面受容体、腫瘍抗原、または癌抗原に対して特異的な免疫グロブリン中に導入する。本発明の変異型Fc領域をその中に導入することができる免疫グロブリンは、癌または腫瘍抗原に特異的に結合することができるものであり、それらの抗原として、限定するわけではないが、例えば以下が含まれる: KS 1/4汎癌腫抗原(Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407-415)、卵巣癌抗原(CA125)(Yuら、1991, Cancer Res. 51 (2): 468-475)、前立腺酸性ホスフェート(Taylorら、1990, Nucl. Acids Res. 18 (16): 4928)、前立腺特異的抗原(Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160 (2): 903-910; Israeliら、1993, Cancer Res. 53: 227-230)、黒色腫関連抗原p97(Estinら、1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446)、黒色腫抗原gp75(Vijayasardahlら、1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380)、高分子量黒色腫抗原(HMW-MAA)(Nataliら、1987, Cancer 59: 55-63; Mittelmanら、1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144)、前立腺特異的膜抗原、癌胎児性抗原(CEA)(Foonら、1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294)、多形性上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪球抗原、結直腸腫瘍関連抗原(例えばCEA、TAG-72)(Yokataら、1992, Cancer Res. 52: 3402-3408)、C017-1A (Ragnhammarら、1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9(Herlynら、1982, J. Clin. Immunol. 2: 135)、CTA-1およびLEA)、パーキットリンパ腫抗原-38.13、CD19(Ghetieら、1994, Blood 83: 1329-1336)、ヒトBリンパ腫抗原-CD20(Reffら、1994, Blood 83: 435-445)、CD33(Sgourosら、1993, J. Nucl. Med. 34: 422-430)、黒色腫特異的抗原(例えばガングリオシドGD2(Salehら、1993, J. Immunol., 151, 3390-3398)、ガングリオシドGD3(Shitaraら、1993, Cancer Immunol. Immunother. 36: 373-380)、ガングリオシドGM2(Livingstonら、1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044)、ガングリオシドGM3(Hoonら、1993, Cancer Res. 53: 5244-5250)、腫瘍特異的移植型細胞表面抗原(TSTA)、ウイルス誘発腫瘍抗原など(例えばDNA腫瘍ウイルスのT抗原およびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原)、腫瘍胎児抗原-アルファフェトプロテイン(例えば結腸のCEA、膀胱腫瘍胎児抗原(Hellstromら、1985, Cancer Res. 45: 2210-2188))、分化抗原(例えばヒト肺癌抗原 L6、L20(Hellstromら、1986, Cancer Res. 46: 3917-3923))、線維肉腫の抗原、ヒト白血病T細胞抗原-Gp37(Bhattacharya-Chatterjeeら、1988, J of Immun. 141: 1398-1403)、新生糖タンパク質、スフィンゴリピド、乳癌抗原(例えばEGFR(上皮成長因子受容体))、HER2抗原(p185<sup>HER2</sup>)、多形上皮ムチン(PEM)(Hilkensら、1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359)、悪性ヒトリンパ球抗原-APO-1(Bernhardら、1989, Science 245: 301-304)、分化抗原(Feizi, 1985, Nature 314: 53-57)(例えば胎児赤血球中のI抗原)、着床前胚、成体赤血球中の初期内皮I抗原、胃腺癌中のI(Ma)、M18、乳房上皮中のM39、骨髄細胞中のSSEA-1、VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、結直腸癌中のD<sub>1</sub>56-22、TRA-1-85(血液型H)、結腸腺癌中のC14、肺腺癌中のF3、胃癌中のAH6、胚性癌細胞中のYハプテン、Le<sup>Y</sup>、TL5(血液型A)、A431細胞中のEGF受容体、膀胱癌中のE<sub>1</sub>シリーズ(血液型B)、胚性癌細胞中のFC10.2、胃腺癌抗原、腺癌中のC0-514(血液型Le<sup>a</sup>)、腺癌中のNS-10、C0-43(血液型Le<sup>b</sup>)、A431細胞のEGF受容体中のG49、結腸腺癌中のMH2(血液型ALe<sup>b</sup>/Le<sup>Y</sup>)、結腸癌、胃癌ムチン中の19.9、骨髄細胞中のT<sub>5</sub>A<sub>7</sub>、黒色腫中のR<sub>24</sub>、胚性癌細胞中の4.2、G<sub>D3</sub>、DI.1、OFA-1、G<sub>M2</sub>、OFA-2、G<sub>D2</sub>、およびMI:22:25:8、ならびに4~8細胞期の胚中のSSEA-3およびSSEA-4。一実施形態では、抗原は皮膚T細胞リンパ腫からのペプチドに由来するT細胞受容体である(Edelson, 1998, The Cancer Journal 4: 62、参照)。

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、本発明の変異型Fc領域を抗フルオレセインモノクローナル抗体、4-4-20(Kranzら、1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995; その全体を参照により

本明細書に組み入れる)中に導入する。別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域をマウス-ヒトキメラ抗CD20モノクローナル抗体2H7中に導入する。これはB細胞上のCD20細胞表面リタンパク質を認識する(Liuら、1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6; その全体を参照により本明細書に組み入れる)。さらに別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域をヒト表皮成長因子受容体2(pi 85 HER2)に対するヒト化抗体(Ab4D5)中に導入する。これについては、Carterらの記載がある(1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9; その全体を参照により本明細書に組み入れる)。さらに別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域をヒト化抗TAG72抗体(CC49)中に導入する(Shaら、1994 Cancer Biother. 9(4): 341-9)。別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域をリチュキサン(Rituxan)(リンパ腫の治療に使用される)中に導入する。

10

## 【 0 1 7 0 】

別の特定の実施形態では、限定するわけではないが、本発明は以下に開示されたいずれかの抗体を含む抗Fc RIIIB抗体を、少なくとも1個のアミノ酸残基の修飾(例えば、置換、挿入、欠損)によって、操作することを包含する: 米国仮出願No.60/403,266(2002年8月12日出願)、および米国出願(2003年8月14日出願、代理人整理番号 011183-010-999)。この修飾は、そのFc領域のFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を増大させるものとする。本発明の方法に従って操作することができる抗Fc RIIIB抗体の例は、2B6モノクローナル抗体(ATCC受託番号 PTA-4591)および3H7(ATCC受託番号 PTA-4592)である。別の特定の実施形態では、抗Fc RIIIB抗体の修飾によって、さらにそのFc領域のFc RIIIBに対する親和性を減少させる。また別の特定の実施形態では、操作された抗Fc RIIIB抗体は、当技術分野で既知であるか、本明細書中に開示および例示された標準的アッセイによって判定したときに、増大したエフェクター機能をさらに有する。いくつかの実施形態では、本発明の変異型Fc領域を、限定するわけではないが以下を含む、癌抗原または細胞表面受容体に特異的な治療用モノクローナル抗体中に導入する: Erbitux™(IMC-C225としても知られている)(ImClone Systems Inc.)(EGFRに対するキメラ化モノクローナル抗体); HERCEPTIN(登録商標)(Trastuzumab)(Genentech, CA)(転移性乳癌の患者の治療用のヒト化抗HER2モノクローナル抗体); REOPRO(登録商標)(アブシキシマブ)(Centocor)(血餅形成抑制用の血小板上の抗糖タンパク質IIb/IIIa受容体); ZENAPAX(登録商標)(ダクリズマブ)(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)(急性腎同種移植片拒絶抑制用の免疫抑制性のヒト化抗CD25モノクローナル抗体)。その他の例は、以下のものである: ヒト化抗CD18F(ab')<sub>2</sub>(Genentech); CDP860(ヒト化抗CD18F(ab')<sub>2</sub>)(Celltech, UK); PR0542(CD4と融合した抗HIV gp120抗体)(Progenics/Genzyme Transgenics); C14(抗CD14抗体)(ICOS Pharm); ヒト化抗VEGF IgG1抗体(Genentech); OVAREX™(マウス抗CA125抗体)(Altarex); PANOREX™(マウス抗17-IA細胞表面抗原IgG2a抗体)(Glaxo Wellcome/Centocor); IMC-C225(キメラ抗EGFR IgG抗体)(ImClone System); VITAXIN™(ヒト化抗 V 3 インテグリン抗体)(Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath1H/LDP-03(ヒト化抗CD52 IgG1抗体)(Leukosite); SmartM195(ヒト化抗CD33 IgG抗体)(Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™(キメラ抗CD20 IgG1抗体)(IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™(ヒト化抗CD22 IgG抗体)(Immunomedics); SmartID 10(ヒト化抗HLA抗体)(Protein Design Lab); ONCOLYM™(Lym-1)(放射性標識マウス抗HLADR抗体)(Techniclone); 抗CD1 Ia(ヒト化IgG1抗体)(Genetech/Xoma); ICM3(ヒト化抗ICAM3抗体)(ICOS Pharm); IDEC-114(霊長類化抗CD80抗体)(IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™(放射性標識マウス抗CD20抗体)(IDEC/Schering AG); IDEC-131(ヒト化抗CD40L抗体)(IDEC/Eisai); IDEC-151(霊長類化抗CD4抗体)(IDEC); IDEC-152(霊長類化抗CD23抗体)(IDEC/Seikagaku); SMART 抗CD3(ヒト化抗CD3 IgG)(Protein Design Lab); 5G1.1(ヒト化抗補体因子5(C5)抗体)(Alexion Pharm); IDEC-151(霊長類化抗CD4 IgG1抗体)(IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4(ヒト抗CD4 IgG抗体)(Medarex/Eisai/Genmab); CDP571(ヒト化抗TNF- IgG4抗体)(Celltech); LDP-02(ヒト化抗 4 7抗体)(LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A(ヒト化抗CD4 IgG抗体)(Ortho Biotech); ANTOVA™(ヒト化抗CD40L IgG抗体)(Biogen); ANTEGREN™(ヒト化抗VLA-4 IgG抗体)(Elan); MDX-33(ヒト化抗CD64(Fc R)抗体)(Medarex/Centeon); rhuMab-E25(ヒト化抗IgE IgG1抗体)(Genentech/N

20

30

40

50

orvartis/Tanox Biosystems) ; IDEC-152(霊長類化抗CD23抗体)(IDEC Pharm) ; ABX-CBL(マウス抗CD-147 IgM抗体)(Abgenix) ; BTI-322(ラット抗CD2 IgG抗体)(Medimmune/Bio Transplant) ; OrthoClone/OKT3(マウス抗CD3 IgG2a抗体)(ortho Biotech) ; SIMULECT™(キメラ抗CD25IgG1抗体)(Novartis Pharm) ; LDP-01(ヒト化抗<sub>2</sub>-インテグリンIgG抗体)(LeukoSite) ; 抗LFA-1(マウス抗CD18 F(ab')<sub>2</sub>)(Pasteur-Merieux/Immunotech) ; CAT-152(ヒト抗TG F-<sub>2</sub>抗体)(Cambridge Ab Tech) ; およびCorsevin M(キメラ抗因子VII抗体)(Centocor)。

【0171】

本発明の変異型Fc領域は、好ましくは免疫グロブリンと関係するが、これを1種以上の生化学的アッセイおよび/または1種以上の機能的アッセイで、好ましくはハイスループット法で、さらに特性決定する。別の実施形態では、本発明の変異型Fc領域を免疫グロブリン中に導入しないで、これを1種以上の生化学的アッセイおよび/または1種以上の機能的アッセイで、好ましくはハイスループット法において、さらに特性決定する。この1種以上の生化学的アッセイは、Fc-Fc R相互作用を同定するための、当技術分野で既知のいずれのアッセイでもよく、限定するわけではないが、以下が含まれる：ELISAアッセイ、ならびにFc-Fc R相互作用の速度論的パラメーターを判定するための表面プラズモン共鳴アッセイ、例えばBIAcoreアッセイ。この1種以上の機能的アッセイは、当業者に知られているか、または本明細書に記載した1種以上のFc Rが介在するエフェクター細胞機能を特性決定するための、当技術分野で既知のいずれのアッセイでもよい。特定の実施形態では、変異型Fc領域を含む免疫グロブリンを、1種以上のFc R、例えばFc RIIIA、Fc RIIA、Fc RIIAとの結合についてELISAアッセイで、その後1種以上のADCCアッセイでアッセイする。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含む免疫グロブリンを、表面プラズモン共鳴アッセイ、例えばBIAcoreをさらに使用して、アッセイする。表面プラズモン共鳴アッセイは当技術分野で周知であり、セクション5.2.7でさらに考察し、本明細書中、実施例6.8で例示することとする。

【0172】

変異型Fc領域を含む免疫グロブリンを特性決定するための代表的なハイスループットアッセイには、以下が含まれる：例えば、標準的組換えDNA技法によって、4-4-20抗体中に本発明の変異型Fc領域を導入し；変異型Fc領域を含む4-4-20抗体の、Fc R(例えば、Fc RIIIA、Fc RIIIB)への特異的結合をELISAアッセイによって特性決定し；変異型Fc領域を含む4-4-20抗体を(本明細書に開示する方法を使用して)ADCCアッセイで特性決定し、この際、標的細胞は変異型Fc領域を含む4-4-20抗体でオプソニン化され；その後変異型Fc領域を第2免疫グロブリン、例えば4D5、2H7中にクローニングし、この第2免疫グロブリンをADCCアッセイで特性決定し、この際、標的細胞は変異型Fc領域を含む第2抗体でオプソニン化される。次に、この変異型Fc領域を含む第2抗体を、ELISAアッセイを使用して分析して、Fc Rへの特異的結合を確認する。

【0173】

好ましくは、本発明の変異型Fc領域は、ELISAアッセイで判定して、野生型Fc領域よりも高親和性で、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに結合する。最も好ましくは、本発明の変異型Fc領域は、ELISAアッセイで判定して、野生型Fc領域よりも高親和性で、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに、そしてより低親和性でFc RIIIBに結合する。いくつかの実施形態では、変異型Fc領域は、ELISAアッセイで判定して、野生型Fc領域よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、さらに好ましくは6倍、最も好ましくは8~10倍高い親和性で、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに、そして野生型Fc領域よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、さらに好ましくは6倍、最も好ましくは8~10倍低い親和性でFc RIIIBに結合する。

【0174】

変異型Fc領域を含む免疫グロブリンは、本明細書に開示した方法と当業者に既知の方法を使用して、Fc-Fc R相互作用の速度論的パラメーターを確定するため、どの時点でも、表面プラズモン共鳴アッセイ、例えばBIAcoreを使用して、分析することができる。好ましくは、本発明の変異型Fc領域のモノマーFc RIIIAおよび/またはFc RIIAへの結合についてのKdは、BIAcore分析によって判定したときに、約100nM、好ましくは約70nM、最も好

10

20

30

40

50

ましくは約40nMであり、本発明の変異型Fc領域のダイマーFc RIIBへの結合についてのKdは、約80nM、約100nM、より好ましくは約200nMである。

【0175】

最も好ましい実施形態では、変異型Fc領域を含む免疫グロブリンを、Fc Rとの相互作用について、動物モデル中でさらに特性決定する。本発明の方法での使用に好ましい動物モデルは、例えば、ヒトFc Rを発現するトランスジェニックマウス、例えば、米国特許第5,877,397号(その全体を参照により本明細書に組み入れる)に記載されている、いずれかのマウスモデルである。本発明の方法で使用するためのトランスジェニックマウスとして、限定するわけではないが、以下が含まれる：ヒトFc RIIIAを保有するヌードノックアウトFc RIIIAマウス；ヒトFc RIIAを保有するヌードノックアウトFc RIIIAマウス；ヒトFc RIIBおよびヒトFc RIIIAを保有するヌードノックアウトFc RIIIAマウス；ヒトFc RIIBおよびヒトFc RIIAを保有するヌードノックアウトFc RIIIAマウス。

10

【0176】

### 5.2.1 Fc R-Fc結合アッセイ

変異型Fc領域を含む本発明の分子のFc Rへの結合を判定するため、Fc R-Fc結合アッセイを開発して、この受容体のリガンドに対する親和性が本来弱く、例えば、Fc RIIBおよびFc RIIIAについて $\mu$ M程度であっても、相互作用の検出および定量を行うことを可能にした。その方法には、複合体化しないFc Rに比較して、Fc領域に対する結合活性が向上したFc R複合体の形成が含まれる。本発明によれば、好ましい分子複合体は、以下を含むテトラマー-免疫複合体である：(a)Fc Rの可溶性領域(例えば、Fc RIIIA、Fc RIIAまたはFc RIIBの可溶性領域)；(b)Fc Rの可溶性領域(例えば、Fc RIIIA、Fc RIIAまたはFc RIIBの可溶性領域)のC末端に機能し得るように連結されたビオチン化15アミノ酸AVITAG配列(AVITAG)；および(c)ストレプトアビジン-フィコエリトリン(SA-PE)；テトラマーFc R複合体を形成するモル比(好ましくは5：1のモル比)とする。本発明の好ましい実施形態によれば、融合タンパク質を酵素的に、例えばE.coli Bir A酵素(15アミノ酸AVITAG配列中のリシン残基を特異的にビオチン化するビオチンリガーゼの1つ)を使用してビオチン化する。本発明の特定の実施形態では、当業者に知られた標準的な方法、限定するわけではないがストレプトアビジンシフトアッセイなどで判定して、融合タンパク質の85%をビオチン化する。本発明の好ましい実施形態によると、ビオチン化した可溶性Fc Rタンパク質を、1X SA-PE：5Xビオチン化可溶性Fc Rのモル比でSA-PEと混合して、テトラ

20

30

【0177】

本発明の好ましい実施形態では、Fc領域を含むポリペプチドは、本発明の方法に従って形成させたテトラマーFc R複合体と、モノマー性非複合体化Fc Rよりも少なくとも8倍高い親和性で結合する。Fc領域を含むポリペプチドのテトラマーFc R複合体への結合は、例えば以下のような当業者に知られた標準的技術を用いて判定することができる：蛍光活性化細胞選別(FACS)、放射性イムノアッセイ、ELISAアッセイ、その他。

【0178】

本発明は、細胞に基づく、または無細胞アッセイでFc領域を含む分子の機能性を判定するための、上記の方法に従って形成させた、免疫複合体の使用を包含する。

40

【0179】

便宜上、変異型Fc領域を含む分子がFc Rテトラマー複合体に結合する能力をアッセイするために、試薬をアッセイキット、すなわち、一括して配合された試薬として供給することができる。Fc-Fc R相互作用の判定での使用のため、その他の形態の分子複合体も本発明の方法で使用することを想定している。例えば、米国仮出願 60/439,709(2003年1月13日出願)(代理人整理番号 11183-005-888)(その全体を参照により本明細書に組み入れる)の記載に従って形成させた融合タンパク質である。

【0180】

### 5.2.2 突然変異誘発および酵母ディスプレイライブラリーの構築

変異型Fc領域を含む分子の最初のライブラリーは、当技術分野で既知の、任意のランダ

50

△突然変異誘発技術を使用して、製造する。当業者には、Fc領域のアミノ酸配列変異型が当業者に既知のどの突然変異誘発技術を使用しても取得することができることが理解されるはずである。これらの技術のいくつかを簡単に本明細書に記載したが、別の操作法でも同等の結果が得られることが認識されるであろう。好ましい実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子を、下記実施例6に例示するエラープローン (error-prone) PCRによって、調製する (Leungら、1989, Technique, 1: 11、参照)。本発明の方法での使用については、2~3 bp/Kbのエラー率を持つものが特に好ましい。一実施形態では、エラープローンPCRを使用して、2~3突然変異/kbの突然変異頻度が得られる。

#### 【0181】

突然変異誘発は、限定するわけではないが、以下を含む当技術分野で既知のいずれの技術によっても実施することができる：修飾すべきFc領域 (例えば、CH2もしくはCH3ドメイン) を含んでなる抗体またはポリペプチドのFc領域の配列内で、1種以上の修飾を持つオリゴヌクレオチドの合成。部位特異的突然変異誘発では、所望の突然変異を持つDNA配列とともに、十分な数の隣接ヌクレオチド (掛け渡される欠損部の両側に安定な二重鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列複雑性を有するプライマー配列を提供する) をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列の使用によって、突然変異体の製造が可能になる。典型的には、長さが約30~約45ヌクレオチドまたはそれ以上で、変更された配列の連結部の両側に約10~約25またはそれ以上の残基を持つプライマーが好ましい。1以上の位置で別種の多様な突然変異を導入する多数のこうしたプライマーを使用して、突然変異体のライブラリーを作製することができる。

#### 【0182】

部位特異的突然変異誘発の技術は、各種刊行物に例示されているように、当技術分野で周知である (例えば、Kunkelら、Methods Enzymol., 154: 367-82, 1987(その全体を参照により本明細書に組み入れる)、参照)。一般的には、部位特異的突然変異誘発は、最初に所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列内に含んでいる一本鎖ベクターを取得するか、二本鎖ベクターの2つの鎖を分離させることによって実施する。所望の突然変異配列を保有しているオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的には合成によって調製する。このプライマーを次に一本鎖ベクターとともにアニールし、突然変異保有鎖の合成を完遂させるため、DNAポリマー化酵素、T7 DNAポリメラーゼなどで処理する。こうして、一方の鎖が当初の非突然変異配列をコードし、第2鎖が所望の突然変異を保有しているヘテロ二本鎖が形成される。次にヘテロ二本鎖ベクターを使用してE. coli細胞などの適切な細胞を形質転換するか、これにトランスフェクトし、突然変異した配列配置を保有する組換えベクターを含んでいるクローンを選択する。理解されるように、この技術では、典型的には一本鎖および二本鎖の両方の形態で存在するファージベクターを利用する。部位特異的突然変異誘発に有用な典型的なベクターとして、M13ファージなどのベクターが含まれる。これらのファージは容易に市販品として入手でき、その使用は一般的に当業者に周知である。二本鎖プラスミドも部位特異的突然変異誘発で常套的に使用され、これによりプラスミドからファージへの目的の遺伝子の移動段階が省略できる。

#### 【0183】

別法として、Taq DNAポリメラーゼなどの市販の熱安定性酵素でのPCR<sup>TM</sup>を使用して、突然変異性オリゴヌクレオチドプライマーを増幅したDNA断片中に組み入れて、次にこれを適切なクローニングまたは発現ベクター中にクローニングすることができる。例えば、PCR<sup>TM</sup>利用突然変異誘発操作法について、Tomicら、Nucleic Acids Res., 18 (6): 1656, 1990、およびUppenderら、Biotechniques, 18(1) : 29-30, 32, 1995(その全体を参照により本明細書に組み入れる)を参照されたい。熱安定性ポリメラーゼに加えて熱安定性リガーゼを使用するPCR<sup>TM</sup>も使用して、リン酸化した突然変異性オリゴヌクレオチドを増幅したDNA断片中に組み入れることができ、次にこれを適切なクローニングまたは発現ベクター中にクローン化することができる (例えば、Michael, Biotechniques, 16 (3): 410-2, 1994(その全体を参照により本明細書に組み入れる)参照)。

#### 【0184】

本発明で使用する変異型を調製するための別の方法は、Wellsら(1985, Gene, 34: 315)が記載している技術に基づくカセット突然変異誘発である。その出発物質は、突然変異させるタンパク質をコードする所望のDNA(例えば、Fc領域を含むポリペプチドをコードするDNA)を含むプラスミドである。突然変異させるDNA配列中のコドン(群)が同定される；同定された突然変異部位(群)のそれぞれの端部には固有の制限エンドヌクレアーゼ部位が必要である。こうした制限部位が存在しない場合は、これをオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって作製することができる。制限部位をプラスミド中に導入した後、プラスミドをこれらの部位で切断し、線状化する。当業者に知られた標準的操作法を使用して、制限部位の間のDNAの配列をコードするが突然変異を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを合成する。この二本鎖オリゴヌクレオチドをカセットと称する。このカセットは、プラスミドに直接連結できるように、線状化プラスミドの末端と適合する3'および5'末端を持つように設計される。

#### 【0185】

Fc領域を含む抗体またはポリペプチドのFc領域の配列変異体を製造するため、当業者に知られたその他の方法を使用することができる。例えば、その抗体または断片の不変ドメインのアミノ酸配列をコードする組換えベクターを突然変異誘発因子(ヒドロキシルアミンなど)で処理して、配列変異体を取得することができる。

#### 【0186】

記載した方法に従って突然変異体ライブラリーを製造した後、この突然変異させたライブラリーを、当業者に知られた標準的酢酸リチウム形質転換プロトコルを使用して、酵母菌株、好ましくはEBY100(Invitrogen)、MATa ura3-52 trp1 leu2 1 his3 200pep4::HIS3 prb1 1.6R can1 GAL::GAL-AGAI中に形質転換する(参照あり)。

#### 【0187】

当業者であれば、所望の結合特性を持つ本発明の分子(例えば、少なくとも1個のアミノ酸修飾がある変異型Fc領域を持つ分子であって、その修飾によって、野生型Fc領域を含む対照分子と比較して、変異型Fc領域のFc RIIIに対する親和性が強化されたもの)を本発明の方法に従って同定した(セクション5.1および表2参照)後、標準的組換えDNA技術およびこのセクションに記載したいずれかの既知の突然変異誘発技術を使用して、別の分子(すなわち、治療用抗体)を操作して、同定された突然変異部位を保有する操作された分子を製造することができることを、理解できるであろう。

#### 【0188】

### 5.2.3 酵母表面ディスプレイ

変更されたFc R親和性(すなわち、強化されたFc RIIIAおよび/またはFc RIIA親和性)を持つ変異型Fc領域を含む分子のスクリーニングおよび同定のための好ましい方法は、酵母表面ディスプレイ法(総説として、Boder and Wittrup, 2000, Methods in Enzymology, 328: 430-444を参照、その全体を参照により本明細書に組み入れる)である。これは、細胞外翻訳後修飾タンパク質の結合相互作用のスクリーニングのための先行技術の欠陥に取り組むものである。具体的には、酵母表面ディスプレイとは、Fc突然変異型を含むポリペプチドを、Fc Rとの相互作用が可能になる形態で、酵母細胞壁上に発現させるための遺伝学的方法である。本発明の突然変異型Fc含有ポリペプチドの酵母表面ディスプレイは、当業者に知られたいずれの技術によっても実施することができる。米国特許第6,423,538; 6,114,147; および6,300,065号(これらの全体を参照により本明細書中に組み入れる)を参照されたい。以下を参照のこと: Boderら、1997 Nat. Biotechnol., 15: 553-7; Boderら、1998 Biotechnol. Prog., 14: 55-62; Boderら、2000 Methods Enzymol., 328: 430-44; Boderら、2000 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97: 10701-5; Shustarら、1998 Nat. Biotechnol., 1998, 16: 773-7; Shustarら、1999 J. Mol. Biol., 292: 949-56; Shustarら、1999 Curr. Opin. Biotechnol., 10: 117-22; Shustarら、2000 Nat. Biotechnol., 18: 754-9; Wittrupら、1994 Ann. N. Y. Acad. Sci., 745: 321-30; Wittrupら、1994 Cytometry, 16: 206-13; Wittrup, 1995 Curr. Opin. Biotechnol., 6: 203-8; Wittrup, 1999 Trends Biotechnol., 17: 423-4; Wittrup, 2000 Nat. Biotechnol.,

18: 1039-40 ; Wittrup, 2001 Curr. Opin. Biotechnol., 12: 395-9.

【 0 1 8 9 】

本発明は、セクション5.2.2に記載したようにして突然変異させた、Fc領域を含む分子を提示するために、酵母中にFc突然変異体ライブラリーを構築する方法を提供する。好ましくは、本発明の方法で使用するためのFc突然変異体ライブラリーは、少なくとも $10^7$ 細胞から、 $10^9$ 細胞までを含有する。本発明の方法で使用するFcライブラリーを構築するための代表的な1つの方法は、以下を含む：Fc領域を含む分子をコードする核酸を、酵母複製ベクターに由来するベクター（例えば、pCT302）中のマルチクローニングサイトにクローニングし；Fcをコードする核酸が、GAL1ガラクトース誘導性プロモーターの制御下に、かつAga2p（交雑させるアグルチニン細胞壁タンパク質）をコードするヌクレオチド配列とインフレームで発現できるようにする。好ましい実施形態では、Fc領域を含む分子をコードする核酸をAga2pコード領域のC末端にクローニングし、その結果、Fc領域-Aga2p融合タンパク質がコードされるようになる。本発明の好ましい構築物を使用して、Aga2pタンパク質およびFc領域を含むポリペプチドを含む融合タンパク質は細胞外に分泌され、固有細胞壁タンパク質であるAga1pタンパク質へのジスルフィド結合によって、細胞壁上に提示されるようにする。別の実施形態では、構築物はさらに、エピトープタグをコードするヌクレオチド配列を含む。本発明に従って、当業者に知られたどのエピトープタグヌクレオチドコード配列を使用してもよく、限定するわけではないが以下をコードするヌクレオチド配列が含まれる：ヘマグルチニン(HA)、c-myc Xpress TAG、His-TAG、またはV5TAG。酵母細胞表面上の融合タンパク質の存在は、FACS分析、共焦点蛍光顕微鏡法または標準的免疫染色方法を使用して検出することができる。これらのすべてが当業者に知られている。一実施形態では、酵母細胞表面上の本発明のFc融合タンパク質の存在を、以下を使用して検出することができる：Fc-特異的モノクローナル抗体(CH3特異的)、例えば、限定するわけではないがIgG1 Fc-特異的モノクローナル抗体、HP6017(Sigma)、JL512(Immunotech)、およびPartridgeら、1986, Molecular Immunology, 23(12): 1365-72(その全体を参照により本明細書に組み入れる)に開示されたいずれかの抗体。別の実施形態では、本発明のFc融合タンパク質の存在を、当業者に知られた技術を使用して、エピトープタグの免疫蛍光標識によって検出する。内部対照として、Fc融合タンパク質をコードする核酸に隣接させたエピトープタグをコードするヌクレオチド配列を使用して、融合タンパク質が一部タンパク質分解された形態で細胞壁上に提示されていないかどうかを検出することは、特に有用な本発明の方法である。

【 0 1 9 0 】

#### 5.2.4 酵母ディスプレイライブラリーのスクリーニング

本発明は、限定するわけではないが、細胞に基づくアッセイ、溶液アッセイ、および固相アッセイを含む免疫学的アッセイを使用する、酵母ディスプレイライブラリーのスクリーニングを包含する。

【 0 1 9 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、当業者に既知で、かつ本明細書に包含される親和性成熟 (affinity maturation) 法を用いた、改変されたFc R親和性を持つFc突然変異体の同定を包含する。概説すると、親和性成熟とは、突然変異体ライブラリー中に存在する個々の突然変異をランダムに組み合わせることによって、新規な対立遺伝子を創生することである。例えば以下を参照されたい：Hawkinsら、1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896 ; Stemmerら、1994 Nature, 370: 389-91(この両著の全体を参照により本明細書に組み入れる)。これを使用して、抗体、T細胞受容体およびその他のタンパク質の親和性を増加させるのに成功している。本発明は、強化された表現型を持つ新しい突然変異体ライブラリーを構築するための基礎として、増強されたFc R結合性を示す突然変異誘発の使用を包含する。本発明の方法を使用して、Fc R、例えばFc RIIIAに対する結合性の増強について、酵母表面ディスプレイによって富化されたIgG1 Fc突然変異体の1集団を選択することができる。DNA調製の後、当業者に知られ、かつ本明細書中で例示もしくは開示された方法を使用して、約700 bpまでの、Fcの突然変異させる領域を選択的に増幅する、隣接ブラ

イマーを使用するPCRによって、Fc領域を増幅することができる。こうして、例えば以下に開示された方法などを使用する、増幅したDNAのDNaseI処理および断片の単離による、Fc領域の突然変異の再シャッフルによって、新規な突然変異体を構築することができる：Stemmerら、1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-51(その全体を参照により本明細書に組み入れる)。次に当業者に知られた方法を使用して、断片を再連結し、入れ子式(nested)プライマーとともにPCR増幅し、酵母提示ベクター、例えばpYDI中にクローニングする。次に、組み換えられたライブラリーを酵母Fcディスプレイスクリーニングで再選択することができる。以下に開示されたものなどの当技術分野で知られた方法を使用して、 $K_D$ が10nMに低下するまで、Fc受容体からのFc RIIIAリガンドの解離速度の低下に基づいた親和性をさらに増加させるための条件を樹立することができる：Boderら、1998, Biotecnol. Prog 14: 55-62(その全体を参照により本明細書に組み入れる)。本発明は、酵母ライブラリーの速度論的スクリーニングを包含する。速度論的スクリーニングは、Fc提示細胞を標識したリガンド、例えば蛍光リガンドで飽和まで標識した後、既定の時間、過剰の非標識リガンドとともにインキュベートすることによって、確立することができる。過剰のバッファー(例えば、1X PBS, 0.5 mg/ml BSA)の添加によって、反応を停止させた後、細胞をFACSおよび選択用の選別ゲートセットによって分析する。各富化ラウンド後、個別の突然変異体を親和性の増加倍数について試験し、分散について順位化する。このin vitro組換え工程を反復してもよい。いくつかの実施形態では、in vitroで少なくとも3回反復する。

#### 【0192】

本発明のFc変異型の選択は、限定するわけではないが、Fc Rの遺伝子多型変異型を含むあらゆるFc Rを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、158位にフェニルアラニンを含有するFc RIIIAの多形変異型を使用して、Fc変異型の選択を実施する。別の実施形態では、158位にバリンを含有するFc RIIIAの多型変異型を使用して、Fc変異型の選択を実施する。Fc RIIIA 158Vは、158FよりもIgG1に対して高い親和性および増加したADCC活性を示す(例えば、Koeneら、1997, Blood, 90: 1109-14; Wuら、1997, J. Clin. Invest. 100:1059-70(この両著の全体を参照により本明細書に組み入れる)参照)。この残基は、IgG1-Fc RIIIA共結晶化研究によって最近示されたように、IgG1のヒンジ領域下流側と事実上直接相互作用する。例えば、Sondermanら、2000, Nature, 100: 1059-70(その全体を参照により本明細書に組み入れる)を参照されたい。研究によれば、いくつかの症例中、治療用抗体がFc RIIIA-158Vホモ接合患者で向上した効力を有している。例えば、ヒト化抗CD20モノクローナル抗体Rituximabが、Fc RIIIA 158Fホモ接合患者に比較して、Fc RIIIA158Vホモ接合患者で治療上より効果的であった(例えば、Cartronら、2002 Blood, 99(3): 754-8、参照)。特定の作用機構に束縛される意図はないが、Fc RIIIA 158Fアロタイプを用いた本発明のFc変異型の選択が、治療用抗体中に組み込まれたときに、Fc RIIIA 158Fホモ接合患者に対して臨床上より有効に働く変異型を提供する可能性がある。

#### 【0193】

本発明は、Fc RIIIAに対する親和性が増大しているだけでなく、Fc RIIBに対する親和性が低下したFc突然変異体を選択するための、Fc RIIB減損(depletion)およびFc RIIIA選択に基づく酵母ライブラリーのスクリーニングを包含する。酵母ライブラリーを、順次減損法、例えば、酵母ライブラリーをFc RIIBでコーティングした磁気ビーズとともにインキュベートすることによって、Fc RIIBに対する親和性が低下したクローンについて富化することができる。Fc RIIB減損は、好ましくはFc RIIBに対する親和性が低下したクローンについてライブラリーが富化されるように、順次実施する。いくつかの実施形態では、Fc RIIB減損ステップの結果、細胞の1集団で、30%、好ましくは10%、より好ましくは5%、最も好ましくは1%未満のみがFc RIIBと結合するようにする。いくつかの実施形態では、Fc RIIB減損は少なくとも3サイクル、少なくとも4サイクル、少なくとも6サイクル実施する。Fc RIIB減損ステップは好ましくは、例えばFc RIIIAに対して増大した親和性を持つFc変異型を選択するための、FACS選別を用いたFc RIIIA選択ステップと

組み合わせる。

【0194】

#### 5.2.4.1 FACSアッセイ；固相アッセイおよび免疫学的アッセイ

本発明は、セクション5.2.3に記載した方法に従って、酵母表面細胞壁上に提示された突然変異Fc融合タンパク質の特性決定を包含する。本発明の一態様は、所望の結合特性を持つ突然変異Fc融合タンパク質、具体的には、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIIAおよび/またはFc RIIAと結合するよりも大きい親和性で、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAと結合する突然変異Fc融合タンパク質の能力について選択するための方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、所望の結合特性を持つ突然変異Fc融合タンパク質、具体的には、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIIAおよび/またはFc RIIAと結合するよりも大きい親和性でFc RIIIAおよび/またはFc RIIAと結合し、さらに野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIBと結合するよりも小さい親和性でFc RIIBと結合する突然変異Fc融合タンパク質、の能力について選択するための方法を提供する。本発明の方法を使用して、いずれの分子のFc領域中の突然変異についても、どのような所望の結合特性でも同定およびスクリーニングすることができることが、当業者には理解されるであろう。

10

【0195】

突然変異Fc融合タンパク質を提示する酵母細胞は、結合相互作用を評価するため、当業者に知られたいずれの生化学的アッセイまたは免疫学的アッセイによっても、スクリーニングおよび特性決定することができる。

20

【0196】

好ましくは、酵母細胞表面に提示された突然変異Fc融合タンパク質を、Fc RIIIA、好ましくはFc RIIIAテトラマー複合体、または場合によってはFc RIIBとの結合についてスクリーニングするため、当業者に知られた技術のいずれかを使用する蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用する。フローソーター(flow sorters)は、ライブラリーインサートを含有する多数の細胞を迅速に試験することができる(例えば、 $10^6$ - $10^8$ 細胞/時間)(Shapiroら、Practical Flow Cytometry, 1995)。その上、特異的結合特性、例えば、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドに比較してFc RIIIAに対して高い親和性を持つFc融合タンパク質を提示する細胞を選択するため、限定するわけではないが、リガンド濃度(すなわち、Fc RIIIAテトラマー複合体)、速度論的競合時間、またはFACSストリンジェンシーを含む、最適化のために使用する特定のパラメーターを変更することができる。生物細胞を選別および試験するためのフローサイトメーターは当技術分野で周知である。既知のフローサイトメーターは例えば以下に記載されている：米国特許第4,347,935；5,464,581；5,483,469；5,602,039；5,643,796；および6,211,477号(これらの全内容を参照により本明細書中に組み入れる)。その他の既知のフローサイトメーターはBecton Dickinson and Company製のFACS Vantageシステム、およびUnion Biometrica製のCOPASTMシステムである。

30

【0197】

本発明の好ましい実施形態によれば、酵母細胞を蛍光活性化細胞選別(FACS)によって分析する。最も好ましい実施形態では、酵母細胞のFACS分析を反復形式で、少なくとも2回、少なくとも3回、または少なくとも5回、実施する。選択の各ラウンドの間に、細胞を再増殖させ、最大数の酵母細胞表面上にFc領域が提示されるように誘導する。特定の作用様式に拘泥する意図はないが、反復工程は、特定の表現型、例えばFc RIIIAに対して高結合性を持つ細胞の集団を富化する助けとなる。

40

【0198】

好ましい実施形態では、本発明のFc変異型のスクリーニングは、複数ラウンドのスクリーニング、例えば少なくとも2ラウンドのスクリーニングによる選択工程を含む。一実施形態では、Fc RIIIAに対して増大した親和性を持つFc変異型のスクリーニングは以下のステップを含む：スクリーニングの第1ラウンド中、酵母細胞のライブラリー(例えば $10^7$ 細胞の天然ライブラリー)を、例えば標識したテトラマーFc RIIIAを使用して、FACSに

50

よって、好ましくは反復形式で富化し、Fc RIIIAに対して増大した親和性を持つFc変異型について選択する；所望の表現型（例えばFc RIIIAに対して増大した結合性について選択された変異型Fc領域）を、次に抗体（例えば4-4-20抗体）中に導入し、この操作された抗体を、第2次スクリーニング、例えば、Fc Rへの結合についてのELISAを用いてアッセイする。スクリーニングの第2ラウンドにおいては、第1次スクリーニングに基づいて単一の突然変異ライブラリーを創生し、その結果Fc領域がFc RIIIAに対して増大した親和性を示す変異型を保有するようになる；そして例えば、標識したモノマーFc RIIIAを標識しない受容体の存在または不在中の両方で使用するFACSによって、富化する；そして次に変異型Fc領域を、抗体、例えば4-4-20抗体中に導入し、この操作された抗体を、第2次スクリーニング、例えば、Fc Rへの結合についてのELISAを使用して、アッセイする。いくつかの実施形態では、第2次スクリーニングはさらに、本明細書に開示した方法を使用するADCCまたはBIAcoreを基礎とするアッセイでの、Fc変異型を含む抗体の特性決定を含む。

10

## 【0199】

本発明は、平衡状態または速度論的条件下での突然変異酵母ライブラリーのFACSスクリーニングを包含する。スクリーニングを平衡条件下で実施する場合、過剰のFc突然変異体保有酵母ライブラリーを、Kdよりも5~10倍低い濃度のFc RIIIA、好ましくは標識したFc RIIIAとともに、少なくとも1時間インキュベートして、平衡条件下でのFc突然変異体のFc RIIIAへの結合を可能にする。スクリーニングを速度論的条件下で実施する場合、突然変異酵母ライブラリーを標識したFc RIIIAとともにインキュベートし；次にこの細胞を等モル量の非標識Fc RIIIAとともに既定時間インキュベートし、次に結合したFc RIIIAをモニターする。

20

## 【0200】

突然変異Fc融合タンパク質を発現する酵母細胞をFACSによって分析するための代表的な1つの方法は、PEなどの蛍光標識で標識したFc RIIIA-テトラマー複合体を持つ細胞と、蛍光標識したF(ab)<sub>2</sub>抗Fcなどの抗Fc抗体との同時染色である。本発明の方法に従って作製された酵母ライブラリーの蛍光測定は、好ましくは対照との比較を含む。例えば、Fc領域を含む分子をコードするインサートを欠如している酵母細胞（陰性対照）である。フローソーターは細胞内の蛍光シグナルを迅速に測定するだけでなく、特定の蛍光特性を持つ細胞を回収する能力も持っている。本発明の好ましい実施形態ではこの特徴を利用して、野生型Fc領域を含む対照のポリペプチドに比較して、特異的結合特性、例えば、Fc RIIIAに対する高い親和性を持つFc融合タンパク質を発現する細胞について、当初のライブラリー集団を富化することができる。本発明の好ましい実施形態では、酵母細胞を、酵母細胞表面上のFc発現量に比してFc RIIIAとの最大の親和性を示す細胞を選択するように樹立したFACSおよび選別ゲートによって、分析する。好ましい実施形態によれば、4種の順次選別を設け、この場合、各順次選別のゲートは5.5%、1%、0.2%、および0.1%である。本発明の方法に従って形成された酵母ディスプレイライブラリーは、希少クローンを単離する確率を向上させるため、少なくとも10倍過剰のクローンを試験する（例えば、10<sup>7</sup>クローンのライブラリーに由来する~10<sup>8</sup>細胞を分析する）ことが好ましい。あるいは、所望の表現型の細胞を選択するために、2~5選別を設ける。選別ゲートは当業者が経験によって設けることができる。

30

40

## 【0201】

別の好ましい実施形態では、酵母細胞表面上に提示された突然変異Fc融合タンパク質を、Fc R、例えばFc RIIIAへの結合について、固相アッセイ、例えばDyna1が供給するものなどの磁気ビーズを使用するアッセイを、好ましくはハイスループット法で使用して、スクリーニングする。一実施形態では、磁気ビーズアッセイを使用して、Fc RIIIAに対する増大した親和性および/またはFc RIIBに対する低下した親和性を持つ突然変異体を同定することができる。Fc RIIIAに対する増大した親和性およびFc RIIBに対する低下した親和性を持つ突然変異体を同定するための代表的なアッセイは、Fc RIIBでコーティングした磁気ビーズを使用する順次固相減損による突然変異体の選択と、その後のFc RI

50

IIAでコーティングした磁気ビーズでの選択を含む。例えば、アッセイの1つは以下のステップを含む：本発明の方法に従って作製した酵母細胞のライブラリーとFc RIIIBでコーティングした磁気ビーズとのインキュベーション；混合物を磁場に置くことによる、ビーズに結合した酵母細胞の非結合画分からの分離、非結合酵母細胞の除去、および別の培地中への移動；酵母細胞とFc RIIIAでコーティングしたビーズとの結合、混合物を磁場に置くことによる、ビーズに結合した酵母細胞の非結合画分からの分離、非結合酵母細胞の除去；激しいボルテックスによる結合細胞の除去；回収された細胞のグルコース含有培地中での増殖；ガラクトースを含有する選択培地中での再誘導。この選択工程を少なくとも1回反復する。次に当技術分野で知られた一般的な方法論、例えばPCRを使用して、Fcドメインを含有するインサートを増幅し、さらに特性決定するため、既述の方法によって抗体中に導入する。

10

#### 【0202】

別の実施形態では、酵母に基づかないシステムを使用して、本発明の分子の結合性を特性決定する。本発明の分子を特性決定するための代表的なシステムの1つは、抗フルオレセインモノクローナル抗体4-4-20の重鎖であって、その中に変異型Fc領域を持つ本発明の分子をコードする核酸がクローニングされているもの、を含有する哺乳動物発現ベクターを含む。結果として得られた組換えクローンを哺乳動物宿主細胞系統(すなわち、ヒト腎細胞系293H)中で発現させ、得られた組換え免疫グロブリンを、当業者に知られた標準的アッセイのいずれか、限定するわけではないが、ELISAおよびFACSなどを使用して、Fc Rとの結合について分析する。

20

#### 【0203】

本発明の分子(例えば、抗体、融合タンパク質、コンジュゲート分子)は多様な方法で特性決定することができる。特に、修飾されたFc領域を含む本発明の分子を、リガンド、例えばFc RIIIAテトラマー複合体に免疫特異的に結合する能力についてアッセイすることができる。こうしたアッセイは、溶液中(例えば、Houghten, Bio/Techniques, 13: 412-421, 1992)、ビーズ上(Lam, Nature, 354: 82-84, 1991)、チップ上(Fodor, Nature, 364: 555-556, 1993)、細菌上(米国特許第5,223,409号)、胞子上(米国特許第5,571,698; 5,403,484; および5,223,409号)、プラスミド上(Cullら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865-1869, 1992)、またはファージ上(Scott and Smith, Science, 249: 386-390, 1990; Devlin, Science, 249: 404-406, 1990; Cwirlaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378-6382, 1990; およびFelici, J; Mol. Biol., 222: 301-310, 1991)(これらそれぞれの全体を参照により本明細書中に組み入れる)において実施することができる。リガンド、例えばFc RIIIAに免疫特異的に結合することが同定された分子を、その後リガンドに対する特異性および親和性についてアッセイすることができる。

30

#### 【0204】

修飾されたFc領域を含むように操作された(例えば、治療用抗体)か、酵母ディスプレイシステム中で所望の表現型を持つことが同定された(セクション5.1参照)本発明の分子を、抗原(例えば癌抗原)に対する免疫特異的結合およびその他の抗原(例えばFc R)との交差反応性について、当技術分野で知られた方法のいずれによっても、アッセイすることができる。免疫特異的結合および交差反応性を分析するために使用することができるイムノアッセイとして、限定するわけではないが、以下に数例を示す技術を使用する競合および非競合アッセイシステムが含まれる：ウエスタンブロット、放射性イムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着剤アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射性測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイ。こうしたアッセイは、常套的であって、当技術分野で周知である(例えば、Ausubelら編集、1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York(その全体を参照により本明細書中に組み入れる)参照)。

40

#### 【0205】

修飾されたFc領域を含む本発明の分子のリガンド、例えばFc Rテトラマー複合体に対

50

する結合親和性および相互作用の消失速度を、競合結合アッセイによって、測定することができる。競合結合アッセイの一例は、放射性イムノアッセイであり、標識(例えば<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>I)したテトラマーFc Rなどのリガンドと目的の分子(例えば、修飾されたFc領域を含む本発明の分子)との、漸次的に増加させたテトラマーFc Rなどの非標識リガンドの存在中でのインキュベーション、および標識リガンドと結合した分子の検出を含む。本発明の分子のリガンドへの親和性および結合の消失速度を、飽和データから、スキヤッチャード(Scatchard)分析によって、測定することができる。

#### 【0206】

好ましい実施形態では、BIAcore速度論的分析を使用して、本発明の分子のFc Rなどのリガンドへの結合速度および解離速度を判定することができる。BIAcore速度論的分析は、表面に固定化された分子(例えば、修飾されたFc領域を含む分子)を持つチップへのリガンドの結合およびこれからの解離の分析を含む。

#### 【0207】

##### 5.2.5 突然変異体の配列決定

当技術分野で知られた多様な配列決定反応のいずれを使用しても、変異型Fc領域を含む本発明の分子を直接配列決定することができる。配列決定反応の例として、以下によって開発された技術を基礎とするものが含まれる: Maxim and Gilbert(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 560, 1977)またはSanger(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463, 1977)。多様な自動配列決定操作法を利用することができることも想定されている(BiolTechniques, 19: 448, 1995)。これにはマスペクトル分析による配列決定が含まれる(例えば、PC T公報No. WO 94/16101、Cohenら、Adv. Chromatogr., 36: 127-162, 1996、およびGriffinら、Appl. Biochem. Biotechnol., 38: 147-159, 1993)。

#### 【0208】

##### 5.2.6 変異型Fc領域を持つ分子の機能性アッセイ

本発明は、本発明の分子(例えば、上記の酵母ディスプレイ法によって同定された変異型Fc領域を含む抗体; または本発明の方法に従って操作された治療用モノクローナル抗体)についての、この分子のエフェクター細胞機能を同定するための当業者に知られたアッセイを使用した、特性決定を包含する。特に、本発明は、本発明の分子のFc Rが介在するエフェクター細胞機能の特性決定を包含する。本発明に従ってアッセイすることができるエフェクター細胞機能の例として、限定するわけではないが、以下が含まれる: 抗体依存性細胞傷害、食作用、オプソニン作用、オプソニン食作用、C1q結合、および補体依存性細胞傷害。エフェクター細胞機能活性を判定するために、当業者に知られた細胞に基づいた、または無細胞アッセイのいかなるものでも使用することができる(エフェクター細胞アッセイについては、以下を参照: Prussiaら、2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggioliniら、1998 Experientia, 44(10): 841-8; Lehmannら、2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munnら、1990 J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majidら、2002 Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Dingら、1998, Immunity 8:403-411(これらそれぞれの全体を参照として本明細書中に組み入れる))。

#### 【0209】

1つの実施形態では、本発明の分子をヒト単球中のFc R介在食作用についてアッセイすることができる。あるいは、本発明の分子のFc R介在食作用をその他の食細胞、例えば、好中球(多形核白血球; PMN); ヒト末梢血単球、単球由来マクロファージ中でアッセイしてもよい。これらは当業者に知られた標準的操作法を使用して取得することができる(例えば、Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-164、参照)。一実施形態では、本発明の分子の機能を、既述の方法(Tridandapaniら、2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7)により、フルオレセイン化IgG-オプソニン化ヒツジ赤血球細胞(SRBC)を貪食するTHP-1細胞の能力を測定することによって、特性決定する。例えば、Fc RIIIAに対して強化された親和性を持つ変異型Fc領域を含む本発明の分子の食作用を測定するための代表的なアッセイは、以下を含む: THP-1細胞を本発明の分子またはFc RIIIAに結合しない対照抗体

で処理し、この細胞の活性レベルを比較する、ここで、細胞の活性(例えば、ロゼット形成活性(IgG-コーティングSRBCと結合したTHP-1細胞の数)、接着活性(THP-1細胞に結合したSRBCの総数)、および食細胞率)の差異が本発明の分子の機能性を示唆することとなる。当業者は、この代表的なアッセイを使用して、本発明の方法によって同定される分子のいずれについてもアッセイすることができることを理解するはずである。

#### 【0210】

本発明の分子の食作用を判定するための別の代表的なアッセイは、抗体依存性オプソニン食作用アッセイ(ADCP)であり、これは以下を含む：エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)-標識FITC(Molecular Probes)またはスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)-FITCなどの標的生体粒子を、(i)Fc R依存性ADCPについての対照抗体としての、野生型4-4-20抗体(フルオレセインに対する抗体)(Bedzykら、1989, *J. Biol. Chem.*, 264(3): 1565-1569(その全体を参照により本明細書に組み入れる)参照)または(ii)Fc R依存性ADCPについてのバックグラウンド対照としての、Fc RIIIへの結合をロックアウトするD265A突然変異を保有する4-4-20抗体、(iii)本発明の方法によって同定し、実施例6.6に例示するようにして製造した、変異型Fc領域を保有する4-4-20抗体、でコーティングし；そしてオプソニン化した粒子を形成させ；記載したオプソニン化粒子(i~iii)のいずれかをTHP-1エフェクター細胞(単球細胞系、ATCCより入手可能)に60：1の比率で添加して、Fc R介在食作用を発生させ；好ましくはこの細胞と*E. coli*-FITC/抗体を37 °Cで1.5時間インキュベートし；インキュベーション後、細胞にトリパンブルーを添加(好ましくは室温で2~3分)して、内部に取り込まれないで細胞表面の外側に接着した細菌の蛍光を消失させ；細胞をFACSバッファー(例えば、0.1%BSA、0.1%アジ化ナトリウム、PBS中)中に移動させ、FACS(例えば、BD FACS Calibur)を使用して、THP1細胞の蛍光を分析する。好ましくは、アッセイに用いられるTHP-1細胞を、FACSにより細胞表面上のFc Rの発現について分析する。THP-1細胞はCD32AおよびCD64の両方を発現する。CD64は、本発明の方法のADCPアッセイを実行する際にブロックされる、高親和性Fc Rである。THP-1細胞を、好ましくは100 μg/mL可溶性IgG1または10%ヒト血清でブロックする。ADCPの程度を分析するため、ゲートを好ましくはTHP-1細胞についてセットし、蛍光強度の中央値を測定する。個々の突然変異体についてのADCP活性を算出し、得られた野生型chMab 4-4-20に対する標準化した数値として記録する。オプソニン化した粒子をTHP-1細胞に、THP-1細胞に対するオプソニン化した粒子の比率が30：1または60：1になるように、添加する。最も好ましい実施形態では、ADCPアッセイを以下のような対照とともに実行する：培地中の*E. coli*-FITC、*E. coli*-FITCおよびTHP-1細胞(Fc R非依存性ADCP活性として役立てるため)、*E. coli*-FITC、THP-1細胞および野生型4-4-20抗体(Fc R依存性ADCP活性として役立てるため)、*E. coli*-FITC、THP-1細胞、4-4-20 D265A(Fc R依存性ADCP活性についてのバックグラウンド対照として役立てるため)。

#### 【0211】

別の実施形態では、本発明の分子を、当業者に知られた標準的な方法のいずれかを使用して、エフェクター細胞、例えばナチュラルキラー細胞中で、Fc R介在ADCC活性についてアッセイすることができる(例えば、Perussiaら、2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92、参照)。本発明の分子のADCC活性を判定するための代表的なアッセイは、以下を含む<sup>51</sup>Cr放出アッセイである：標的細胞を[<sup>51</sup>Cr]Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>で標識し(この細胞膜透過性分子が標識用に一般的に使用される。なぜならば、これは細胞質タンパク質と結合し、細胞から速度論的に緩慢に放出されるが、標的細胞の壊死後、大量に放出されるからである)；変異型Fc領域を含む本発明の分子で標的細胞をオプソニン化し；オプソニン化した放射性標識標的細胞とエフェクター細胞を、エフェクター細胞に対する標的細胞の適切な比率で、マイクロタイタープレート中で混合し；細胞の混合物を16~18時間、37 °Cでインキュベートし；上清を回収し；そして放射活性を分析する。その後、本発明の分子の細胞傷害を、例えば以下の数式を使用して、判定することができる：溶解% = (実験cpm - 標的漏出cpm) / (界面活性剤溶解cpm - 標的漏出cpm) x 100%、あるいは、溶解% = (ADCC-AICC) / (最大放出 - 自発的放出)。特異的溶解は以下の数式を使用して算出することができる：特異的溶

解 = 本発明の分子存在中での溶解% - 本発明の分子不在中での溶解%。標的：エフェクター細胞の比率または抗体濃度のいずれかを変更することによって、グラフを作成することができる。

【0212】

さらに別の実施形態では、本発明の分子を、抗体依存性細胞傷害(ADCC)について特性決定する。例えば、Dingら、Immunity, 1998, 8: 403-11(その全体を参照により本明細書に組み入れる)を参照されたい。

【0213】

好ましくは、本発明のADCCで使用する細胞は末梢血単核細胞(PBMC)である。これは好ましくは、当業者に知られた標準的方法、例えばFicoll-Paque密度勾配遠心分離を使用して、正常ヒト血液から精製される。本発明の方法で使用するための好ましいエフェクター細胞は、別種のFc R活性化受容体を発現する。本発明は、Fc抗体突然変異体が野生型IgG1抗体に比較して増加したADCC活性および食作用を示すかどうかを判定するための、エフェクター細胞、Fc RI、Fc RIIAおよびFc RIIBを発現するTHP-1、ならびにFc RIIIAおよびFc RIIBの両方を発現する、ヒト全血から誘導した単球由来の一次マクロファージを包含する。

【0214】

ヒト単球細胞系、THP-1は、高親和性受容体Fc RIおよび低親和性受容体Fc RIIAの発現を介して食作用を活性化する(Fleitら、1991, J. Leuk. Biol. 49: 556)。THP-1細胞は、Fc RIIAまたはFc RIIBを構成的(constitutively)には発現しない。サイトカインを用いたこれらの細胞の刺激はFc R発現パターンに影響する(Pricopら、2000 J. Immunol. 166: 531-7)。サイトカインIL4の存在下でのTHP-1細胞の成長はFc RIIB発現を誘発し、Fc RIIAおよびFc RI発現の減退をもたらす。Fc RIIB発現も細胞密度の増加によって、増大させることができる(Tridandapaniら、2002, J. Biol Chem. 277: 5082-9)。対照的に、IFN はFc RIIIAの発現を導くことができることが報告されている(Pearseら、1993 PNAS USA 90: 4314-8)。細胞表面上の受容体の存在または不在は、当業者に知られた一般的方法を使用して、FACSによって判定することができる。サイトカインが誘発する細胞表面上のFc Rの発現は、Fc RIIBの存在中での活性化および抑制の両方を試験するシステムを提供する。THP-1細胞がFc RIIBを発現することができない場合は、本発明は別のヒト単球細胞系、U937をも包含する。これらの細胞は、IFN およびTNFの存在中で、最終的にマクロファージに分化する(Korenら、1979, Nature 279: 328-331)。

【0215】

Fc R依存性腫瘍細胞の死滅は、マウス腫瘍モデル中でマクロファージおよびNK細胞によって仲介される(Clynesら、1998, PNAS USA 95 : 652-656)。本発明は、食作用およびADCCアッセイの両方で、標的細胞の細胞傷害を誘発するFc突然変異体の効力を分析するため、エフェクター細胞としてドナーからの分離された単球の使用を包含する。Fc RI、Fc RIIIA、およびFc RIIBの発現パターンは、異なる増殖条件によって影響を受ける。凍結被分離単球、新鮮被分離単球、10% FBS中に維持した単球、FBS + GM-CSF中および/またはヒト血清中で培養した単球からのFc R発現を、当業者に知られた一般的方法を使用して、判定することができる。例えば、細胞をFc R特異的抗体で染色し、FACSによって分析して、Fc R特性を判定することができる。その後、マクロファージのin vivo Fc R発現を最もよく模倣する条件を本発明の方法で使用する。

【0216】

いくつかの実施形態では、本発明は、特に適合するFc R特性を持つヒト細胞を取得することができない場合には、マウス細胞の使用を包含する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトFc RIIIAでトランスフェクトすることができるマウスマクロファージ細胞系RAW264.7(ATCC)、および当技術分野で知られた方法を使用して単離された安定な形質転換体を包含する(例えば、Ralphら、J. Immunol. 119: 950-4、参照)。形質転換体を、通常の実験操作を用いたFACS分析によって、Fc RIIIA発現について定量し、高発現体を本発明のADCCアッセイに使用することができる。別の実施形態では、本発明は、本明細書で

10

20

30

40

50

開示したものなどのロックアウトトランスジェニックマウスからの、ヒトFc Rを発現する脾臓腹腔マクロファージの単離を包含する。

【0217】

リンパ球は、Ficoll-Paque勾配(Pharmacia)を使用して、ドナーの末梢血(PBM)から回収することができる。単離された細胞の単核集団内で、大多数のADCC活性は、その表面にFc RIIIAを含むがFc RIIBは含まないナチュラルキラー細胞(NK)を介して起こる。これらの細胞での結果は、NK細胞 ADCCの誘発に対する突然変異体の効力を示唆し、分離単球での試験用の試薬を確立する。

【0218】

本発明のADCCアッセイで使用される標的細胞として、限定するわけではないが、以下が含まれる：乳癌細胞系、例えばSK-BR-3(ATCC受託番号 HTB-30)(例えば、Tremら、1976, Cancer Res. 33-41、参照)；Bリンパ球；パーキットリンパ腫由来の細胞、例えばRaji細胞(ATCC受託番号 CCL-86)(例えば、Epsteinら、1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240、参照)、およびDaudi細胞(ATCC受託番号 CCL-213)(例えば、Kleinら、1968, Cancer Res. 28: 1300-10、参照)。標的細胞はアッセイすべき免疫グロブリンの抗原結合部位によって認識されるものでなければならない。

【0219】

ADCCアッセイは、アポトーシス経路によって細胞死を仲介するNK細胞の能力に基づいている。NK細胞は部分的に、細胞表面の抗原に結合したIgGをFc RIIIAが認識することによって、細胞死を仲介する。本発明の方法に従って使用するADCCアッセイは、放射性アッセイまたは蛍光アッセイでもよい。変異型Fc領域を含む本発明の分子を特性決定するために使用するADCCアッセイは以下を含む：標的細胞、例えばSK-BR-3、MCF-7、OVCAR3、Raji、Daudi細胞を標識し；標的細胞を、抗原結合部位を介して標的細胞上の細胞表面受容体を認識する抗体でオプソニン化し；標識したオプソニン化標的細胞とエフェクター細胞を適切な比率(これは通常の実験操作によって決定することができる)で混合し；細胞を回収し；使用した標識に基づく適切な検出スキームを使用して、溶解した標的細胞の上清中の標識を検出する。標的細胞は当技術分野で知られた標準的方法を使用して、放射性標識または蛍光標識のいずれかで標識することができる。例えば、標識として、限定するわけではないが以下が含まれる： $[^{51}\text{Cr}]\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ；および蛍光強化リガンド、2,2':6',2''-テルピリジン-6-6'-ジカルボキシラート(TDA)、のアセトキシメチルエステル。

【0220】

特定の好ましい実施形態では、蛍光強化リガンド、2,2':6',2''-テルピリジン-6-6'-ジカルボキシラート(TDA)、のアセトキシメチルエステルで標識した標的細胞に対するADCC活性を測定するため、時間分解蛍光分光アッセイを使用する。こうした蛍光分光アッセイは、当技術分野で知られている。例えば、Blombergら、1996, Journal of Immunological Methods, 193: 199-206(その全体を参照により本明細書に組み入れる)を参照されたい。簡単に述べると、標的細胞を膜透過性TDAのアセトキシメチルジエステル(ビス(アセトキシメチル)2,2':6',2''-テルピリジン-6-6'-ジカルボキシラート(BATDA))で標識する。これは生存細胞の細胞膜を通過して迅速に拡散する。細胞内エステラーゼがエステル基を切り離し、再生された膜非透過性TDA分子は細胞の内側に捕捉される。エフェクターおよび標的細胞を例えば、少なくとも2時間、長くとも3.5時間、37℃、5% CO<sub>2</sub>下でインキュベートした後、溶解標的細胞から放出されたTDAをEu<sup>3+</sup>とキレート化させ、生成したユーロピウム-TDAキレートの蛍光を時間分解蛍光光度計(例えば、Victor 1420, PerkinElmer/Wallac)で定量する。

【0221】

別の特定の実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子を特性決定するために使用するADCCアッセイは以下のステップを含む：好ましくは $4\text{-}5 \times 10^6$ 標的細胞(例えば、SK-BR-3、MCF-7、OVCAR3、Raji細胞)をビス(アセトキシメチル)2,2':6',2''-テルピリジン-6-6'-ジカルボキシラート(DELFIA BATDA Reagent, Perkin Elmer/Wallac)で標識する。最適標識効率のため、ADCCアッセイで使用する標的細胞の数は、好ましくは $5 \times 10^6$ を超

10

20

30

40

50

えないようにすべきである。この細胞にBATDA試薬を添加し、混合物を37℃、好ましくは5%CO<sub>2</sub>下で、少なくとも30分間インキュベートする。次に細胞を生理学的バッファー、例えば0.125mMスルフィンピラゾールを含むPBS、および0.125mMスルフィンピラゾールを含有する培地で洗浄する。次に標識した標的細胞を、変異型Fc領域を含む本発明の分子、すなわち限定するわけではないが、以下のものなどの、本発明の変異型Fc領域を含む免疫グロブリンでオプソニン化(コーティング)する：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異的抗体、多重特異的抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体。好ましい実施形態では、ADCCアッセイで使用する変異型Fc領域を含む免疫グロブリンは、細胞表面受容体、腫瘍抗原、または癌抗原に対して特異的である。本発明の変異型Fc領域を中に導入する免疫グロブリンは、セクション5.4に列挙するものなどのいずれかの癌または腫瘍抗原と特異的に結合することができる。その上、本発明の変異型Fc領域を中に導入する免疫グロブリンはセクション5.4に列挙するものなどの癌抗原の1つに特異的ないずれかの治療用抗体である。いくつかの実施形態では、ADCCアッセイで使用する変異型Fc領域を含む免疫グロブリンは以下のものである：抗フルオレセインモノクローナル抗体、4-4-20(Kranzら、1982 J. Biol.Chem. 257 (12): 6987-6995)、マウス-ヒトキメラ抗CD20モノクローナル抗体2H7(Liuら、1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6)、またはヒト表皮成長因子受容体2(p185 HER2)に対するヒト化抗体(Ab4D5)(Carterら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9)。ADCCアッセイ中の標的細胞は、免疫グロブリンが標的細胞の細胞表面受容体と特異的に結合するように、本発明の変異型Fc領域を導入した免疫グロブリンに応じて、選択される。好ましくは、本発明のADCCアッセイを、本発明のFc変異型を保有している1種以上の操作された抗体、例えば、抗Her2/neu、4-4-20、2B6、Rituxan、および2H7を使用して実施する。最も好ましい実施形態では、本発明のFc変異型を少なくとも3抗体中に導入して、そのADCC活性を試験する。特定の作用機構によって束縛される意図はないが、これらの機能的アッセイで少なくとも3抗体を実験することで、有効なFc突然変異を誤って排除する機会は減少するものと思われる。

#### 【0222】

オプソニン化した標的細胞をエフェクター細胞、例えばPBMCに、エフェクター：標的の比率が約50：1、75：1、または100：1になるように添加する。特定の実施形態では、変異型Fc領域を含む免疫グロブリンが4-4-20の可変性ドメインを持つ場合、エフェクター：標的は75：1である。エフェクターおよび標的細胞を少なくとも2時間、長くとも3.5時間、37℃、5% CO<sub>2</sub>下でインキュベートする。細胞上清を回収し、酸性ユーロピウム溶液(例えば、DELFLIA Europium Solution, Perkin Elmer/Wallac)に添加する。生成したユーロピウム-TDAキレートの蛍光を、時間分解蛍光光度計(例えば、Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac)で定量する。最大放出(MR)および自発放出(SR)を、標的細胞と1% TX-100および培地のみのそれぞれとのインキュベーションによって、測定する。抗体非依存性細胞傷害(AIC)を、抗体不在中での標的とエフェクター細胞とのインキュベーションによって、測定する。各アッセイは、好ましくは3回ずつ実施する。特異的溶解の平均パーセントを以下によって算出する：実験放出値(ADCC)-AICC)/(MR-SR) x 100。

#### 【0223】

##### 5.2.7 その他のアッセイ

変異型Fc領域を含む本発明の分子を、Fc-Fc<sub>R</sub>相互作用性結合の速度論的パラメーターの特性決定について、当技術分野で知られた表面プラズモン共鳴アッセイのいずれかを使用して、アッセイすることもできる。限定するわけではないが以下を含む市販のSPR装置を本発明で使用することができる：Biacore AB製BIAcore Instruments(Uppsala, Sweden)；Affinity Sensors製IASys装置(Franklin, MA. )；Windsor Scientific Limited製IBISシステム(Berks, UK)；Nippon Laser and Electronics Labpеп製SPR-細胞IAシステム(Hokkaido, Japan)；およびTexas Instruments製SPR Detector Spreeta(Dallas, TX)。SPRに基づく技法の概説については、以下を参照されたい：Mulletら、2000, Methods 22: 77-91；Dongら、2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23；Fivashら、1998, Current Opinion in Biotechnology 9:97-101；Richら、2000, Current Opinion in Biotechnology

10

20

30

40

50

11: 54-61(その全体を参照により本明細書中に組み入れる)。さらに、米国特許第6,373,577 ; 6,289,286 ; 5,322,798 ; 5,341,215 ; 6,268,125号に記載されたタンパク質-タンパク質相互作用を測定するためのSPR装置およびSPRに基づく方法のいずれをも、本発明の方法中に含むことを意図する(その全体を参照により本明細書中に組み入れる)。

#### 【0224】

簡単に述べると、SPRに基づくアッセイは、結合する対の一方を表面に固定化し、その結合対の他方との溶液中での相互作用をリアルタイムでモニターすることを含む。SPRは、複合体の生成または解離時に出現する表面付近での溶媒の屈折率の変化の測定に基づくものである。固定化を行う表面はセンサーチップであって、これがSPR技法の心臓部となるものである。これは金の薄層で被覆されたガラス表面により構成され、分子の表面への結合を最適化するように設計される種々の特異化された表面の土台を形成する。特に上記の会社から、多様なセンサーチップが市販されており、これらのすべてを本発明の方法で使用することができる。センサーチップの例としてBIAcore AB, Inc.から市販されているもの、例えばSensor Chip CM5、SA、NTA、およびHPAが含まれる。本発明の分子は、限定するわけではないが、以下を含む、当技術分野で知られた固定化方法および化学のいずれを使用しても、センサーチップの表面に固定化することができる：アミン基を介した直接共有結合、スルフヒドリル基を介した直接共有結合、アビジン被覆表面へのビオチン接着、炭水化物基へのアルデヒド結合、およびヒスチジンタグを介したNTAチップとの接着。

#### 【0225】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子、例えば変異型Fc領域を含む免疫グロブリンのFc Rとの結合の速度論的パラメーターを、BIAcore装置(例えば、BIAcore装置1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ)を使用して、測定することができる。任意のFc Rを使用して、変異型Fc領域を含む本発明の分子との相互作用を評価することができる。特定の実施形態では、Fc RはFc RIIIA、好ましくは可溶性モノマーFc RIIIAである。例えば、1つの実施形態では、可溶性モノマーFc RIIIAは、リンカー-AVITAG配列に連結されたFc RIIIAの細胞外領域である(米国仮出願 No. 60/439,498、2003年1月9日出願(代理人整理番号 11183-004-888)および米国仮出願 No. 60/456,041、2003年3月19日出願(これらの全体を参照により本明細書中に組み入れる)、参照)。別の特定の実施形態では、Fc RはFc RIIB、好ましくは可溶性ダイマーFc RIIBである。例えば、一実施形態では、可溶性ダイマーFc RIIBタンパク質を以下に記載された方法に従って調製する：米国仮出願 No. 60/439,709、2003年1月13日出願(その全体を参照により本明細書に組み入れる)。

#### 【0226】

変異型Fc領域を含む分子が4-4-20抗体である場合に、分子のFc Rに対する速度論的パラメーターを測定するための、BIAcore装置を用いた代表的なアッセイは、以下を含む：BSA-FITCをセンサーチップ表面の4つのフロー細胞の1つに、好ましくはアミン連結化学方法を介して、約5000応答単位(RU)のBSA-FITCが表面に固定化されるように、固定化する。好適な表面を調製した後、Fc突然変異を保有する4-4-20抗体を、好ましくは20 μg/mL溶液の流速5 μL/mLでの1分間の注入によって、表面を通過させる。表面に結合した4-4-20抗体のレベルは、400~700RUの範囲である。次に、HBS-Pバッファー(20mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, pH 7.5)中の受容体(Fc RIIAおよびFc RIIB-Fc融合タンパク質)の一連の希釈物を表面上に100 μL/分で注入する。別種の受容体希釈間にわたる抗体の再生は、好ましくは100mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4 ; 3M NaClの1回の5秒間注入によって行われる。当技術分野で知られたいずれの再生技術も、本発明の方法中に想定されている。

#### 【0227】

全てのデータセットを取得した後、生成する結合曲線を、SPR装置製造元、例えばBIAcore, Inc.(Piscataway, NJ)から供給されているコンピュータアルゴリズムを使用して、大まかにフィット(fit)させる。これらのアルゴリズムでは、 $K_{on}$ および $K_{off}$ の両方を算出し、これらから見かけの平衡結合定数、 $K_d$ を、2つの速度定数の比として演繹する(すなわち、 $K_{off}/K_{on}$ )。個々の速度定数をどのようにして誘導するかについてのさらに詳細な処理

法は、BIAevaluation Software Handbook(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)から得られる。作成したデータの分析は、当技術分野に知られたどの方法を使用しても実施することができる。作成した速度論的データの解釈のための各種の方法の概説については、以下を参照されたい：Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisherら、1994, Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaikenら、1992, Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Mortonら、1995, Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessyら、1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83(これらの全体を参照により本明細書中に組み入れる)。

#### 【0228】

好ましい実施形態では、SPR分析、例えばBIAcoreを使用して測定した速度論的パラメータを、本発明の分子が機能的アッセイ、例えばADCC中で、どのように機能するかを予測する指標として使用することができる。SPR分析から取得した速度論的パラメータに基づいて本発明の分子の効力を予測するための代表的な方法は、以下を含む：本発明の分子のFc RIIIAおよびFc RIIBとの結合についての $K_{off}$ 値を測定し；ADCCデータに対して、(1) Fc RIIIAについての $K_{off}(wt)/K_{off}(mut)$ ；(2) Fc RIIBについての $K_{off}(mut)/K_{off}(wt)$ をプロットする。野生型に比較して、1よりも高い数値がFc RIIIAについて減少した解離速度、そしてFc RIIBについて増加した解離速度を示し、増大したADCC機能を有することを示す。

#### 【0229】

### 5.3 本発明の分子の組換えによる製造方法

#### 5.3.1 本発明の分子をコードするポリヌクレオチド

本発明は、本発明の方法によって同定される本発明のポリペプチドおよび抗体などの分子をコードするポリヌクレオチドも含む。当技術分野で知られたどんな方法によっても、本発明の分子をコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。

#### 【0230】

本発明の方法によって同定された分子(例えば、抗体)のヌクレオチド配列を決定した後、そのヌクレオチド配列を当技術分野で周知の方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCR、その他を使用して操作し(例えば以下に記載された技術を参照されたい：Sambrookら、2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; およびAusubelら編集、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(これらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れる))、例えばアミノ酸の置換、欠損、および/または挿入を作製することによって、例えば別種のアミノ酸配列を持つ抗体を作製することができる。

#### 【0231】

特定の実施形態では、核酸が抗体をコードする場合、通常組換えDNA技術を使用して、フレームワーク領域内に1以上のCDRを挿入する。フレームワーク領域は天然に生起するものでも共通フレームワーク領域でもよく、好ましくはヒトフレームワーク領域である(ヒトフレームワーク領域の一覧については、例えば、Chothiaら、1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479を参照)。

#### 【0232】

別の実施形態では、ヒトライブラリーまたは当技術分野で利用し得るその他のあらゆるライブラリーを当技術分野で知られた標準的技術によってスクリーニングして、本発明の分子をコードする核酸をクローニングすることができる。

#### 【0233】

#### 5.3.2 本発明の分子の組換え発現

本発明の分子(すなわち、抗体)をコードする核酸配列が得られたら、該分子を産生するためのベクターを、組換えDNA技術により当技術分野で周知の技術を用いて作ることができる。当業者に周知の方法を利用して、本発明の分子をコードする配列および適当な転

10

20

30

40

50

写・翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝的組換えが挙げられる（例えば、Sambrookら、1990、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、およびAusubelら編、1998、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NYに記載される技術を参照されたい）。

【0234】

本発明の方法により同定された分子（すなわち、抗体）のヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、通常の技術（例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈降）により宿主細胞に導入し、次いでトランスフェクトした細胞を従来の技法により培養して、本発明の分子を産生させることができる。特定の実施形態においては、本発明の分子の発現を構成的、誘導性、または組織特異的なプロモーターにより制御する。

10

【0235】

本発明の方法により同定された分子を発現させるために利用する宿主細胞は、細菌細胞、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）であるか、または好ましくは、特に組換え免疫グロブリン分子を発現させるためには、真核細胞でありうる。特に、哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと一緒にあって、免疫グロブリンのための有効な発現系である（Foeckingら、1998、*Gene* 45:101；Cockettら、1990、*Bio/Technology* 8:2）。

20

【0236】

様々な宿主-発現ベクター系を利用して、本発明の方法により同定された分子を発現させることができる。このような宿主-発現系は、本発明の分子のコード配列を産生し、続いて精製することができるビヒクルを表すが、また、適当なヌクレオチドコード配列により形質転換またはトランスフェクトされると本発明の分子を*in situ*で発現することができる細胞も表す。これらとしては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：例えば、本発明の方法により同定された分子のコード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された微生物、例えば大腸菌（*E. coli*）や枯草菌（*B. subtilis*）のような細菌；本発明の方法により同定された分子のコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス属、ピキア属）；本発明の方法により同定された分子のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；本発明の方法により同定された分子のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）およびタバコモザイクウイルス（TMV））を感染させたまたは組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、293T、3T3細胞、リンパ球（米国特許第5,807,715号を参照）、Per C.6細胞（CruceIIにより開発されたヒト網膜細胞））。

30

40

【0237】

細菌系においては、発現される分子に対して意図される用途に応じて、いくつかの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体の医薬組成物を調製するために大量のこのようなタンパク質を産生させる必要がある場合には、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指令するベクターが望ましい。このようなベクターとしては、限定するものではないが、抗体コード配列をベクター中でlacZコード領域とインフレームで個々にライゲートして融合タンパク質が産生されるようにする大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Rutherら、1983、*EMBO J.* 2: 1791）；pINベクター（Inouye & Inouy

50

e, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 ; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509) などが挙げられる。また、pGEXベクターを用いると、外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させることができる。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸収および結合、続いて遊離グルタチオンの存在下での溶出により容易に精製することができる。pGEXベクターはトロンピンまたは因子Xaプロテアーゼ切断部位を含むように設計されており、その結果、クローニングされた標的遺伝子産物をGST成分から切り離すことが可能である。

#### 【0238】

昆虫系においては、オートグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (ACNPV) が外来遺伝子を発現させるためのベクターとして利用される。このウイルスは *Spodoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。抗体コード配列をウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) 中に個々にクローニングして、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置する。

10

#### 【0239】

哺乳動物宿主細胞においては、いくつかのウイルスに基づく発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合には、目的の抗体コード配列を、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3分節 (tripartite) リーダー配列とライゲートすることができる。このキメラ遺伝子を次いでアデノウイルスゲノムに *in vitro* または *in vivo* 組換えにより挿入する。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、E1またはE3領域) への挿入により、感染した宿主内で生存可能でありかつ免疫グロブリン分子を発現することができる組換えウイルスが得られる (例えば、Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359を参照されたい)。特定の開始シグナルも、挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳のために必要でありうる。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、開始コドンは、全インサートの翻訳を確実にするために、目的のコード配列のリーディングフレームと同じフェーズになければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、様々な起源のものであってよく、天然でも合成でもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることにより増強することができる (Bittnerら, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544を参照されたい)。

20

30

#### 【0240】

さらに、挿入配列の発現をモジュレートしたり、遺伝子産物を所望の特定の様式で修飾またはプロセッシングしたりする宿主細胞株を選択することができる。このようなタンパク質産物の修飾 (例えばグリコシル化) およびプロセッシング (例えば切断) はタンパク質の機能にとって重要でありうる。それぞれの宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾に対する特徴的かつ特異的な機構を有する。適当な細胞株または宿主系を選ぶことにより、発現される外来タンパク質の正しい修飾とプロセッシングを確実にすることができる。このために、一次転写物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を持つ真核宿主細胞を用いることができる。このような哺乳動物宿主細胞としては、限定するものではないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、293T、3T3、WI38、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、CRL7030およびHs578Bstが挙げられる。

40

#### 【0241】

組換えタンパク質を長期間、高収率で産生させるためには、安定した発現が好ましい。例えば、本発明の抗体を安定に発現する細胞株を遺伝子工学的に作製することができる。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使うよりもむしろ、宿主細胞は、選択マーカーおよび適当な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) により制御されるDNAで形質転換しうる。外来DNAを導入した後に、遺伝子操作した細胞を富化培地中で1~2日間増殖させ、次いで

50

選択培地に切り替える。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与するので、細胞が安定してプラスミドをその染色体中に組み込み、増殖して巣を形成し、続いてクローニングして細胞株を増やすことが可能である。この方法は、本発明の抗体を発現する細胞株を遺伝子工学的に作製するために有利に使用することができる。このような遺伝子工学的に作製された細胞株は、本発明の抗体と直接的にまたは間接的に相互作用する化合物をスクリーニングして評価する上で特に有用である。

#### 【0242】

いくつかの選択系を利用することができ、それらには、限定するものではないが、以下のものが含まれる：単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら, 1977, Cell 11: 223)、ヒポキサンチンアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら, 1980, Cell 22:817) 遺伝子はそれぞれtk-、hgprt-またはaprt-細胞において使用することができる。また、代謝拮抗物質耐性は以下の遺伝子を選択するための基礎として用いることができる：メトトレキサート耐性を与えるdhfr (Wiglerら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); ミコフェノール酸耐性を与えるgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); アミノグリコシドG-418耐性を与えるneo (Clinical Pharmacy 12:488-505; WuおよびWu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; ならびにMorganおよびAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-215); ヒグロマイシン耐性を与えるhygro (Santerreら, 1984, Gene 30:147)。組換えDNA技術の分野で公知であって利用しうる方法は、Ausubelら編, 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; ならびに第12および13章, Dracopoliら(編), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1に記載されている。

#### 【0243】

本発明の抗体の発現レベルはベクター増幅により増加させることができる(概要については、BebbingtonおよびHentschel, 「DNAクローニングにおける哺乳動物細胞でのクローン化遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づくベクターの利用 (The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)」, Vol.3, Academic Press, New York, 1987を参照されたい)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルを増加させると、マーカー遺伝子のコピー数が増加するだろう。増幅された領域は抗体のヌクレオチド配列と結びついているので、抗体の産生も増加するだろう (Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

#### 【0244】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、すなわち、重鎖由来のポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2のベクターで同時トランスフェクトすることができる。これら2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択マーカーを含有してもよい。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを用いてもよい。このような状況では、軽鎖を重鎖の前に配置して毒性の遊離重鎖が過剰になるのを避けるべきである (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197)。重鎖および軽鎖をコードする配列は、cDNAでもゲノムDNAでもよい。

#### 【0245】

本発明の分子(すなわち、抗体)が組換えにより発現されたら、これを、当技術分野で公知の、ポリペプチドまたは抗体を精製するための方法で精製することができる。かかる精製方法として、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインA後の特異的抗原に対するアフィニティーによる、およびサイジングカラ

10

20

30

40

50

ムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度、またはポリペプチドや抗体を精製するための他の標準技術がある。

【0246】

#### 5.4 予防および治療方法

本発明は、疾患、障害または感染に関連した1以上の症状を予防し、治療し、または軽減するために、1種以上の本発明の分子(すなわち、抗体)を動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに投与することを包含する。本発明の分子は、Fc Rにより媒介されるエフェクター細胞機能(例えば、ADCC)の増大した効力が望まれる疾患または障害を治療または予防するのに特に有用である。本発明の方法および組成物は、原発性または転移性の新生物疾患(すなわち、癌)および感染性疾患の治療または予防に特に有用である。本発明の分子は、当技術分野で知られているかまたは本明細書に記載されるような、医薬として許容される組成物の形で提供されうる。以下に詳述するように、本発明の分子は、癌(特に、受動免疫療法による)、自己免疫疾患、炎症性疾患、または感染性疾患を治療または予防する方法に使用することができる。

10

【0247】

本発明の分子はまた、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、または感染性疾患を治療または予防するための当技術分野で公知の他の治療薬と組み合わせて、有利に使用することもできる。特定の実施形態では、本発明の分子を、例えば、該分子と相互作用して免疫応答を高めるエフェクター細胞の数または活性を増加させるのに役立つ、モノクローナルもしくはキメラ抗体、リンホカインまたは造血性増殖因子(例えば、IL-2、IL-3およびIL-7など)と併用してもよい。本発明の分子はまた、疾患、障害、または感染を治療するために用いる1種以上の薬物、例えば抗癌剤、抗炎症剤または抗ウイルス剤と組み合わせて有利に利用することもでき、これらは、例えば、以下のセクション5.4.1.2および5.4.2.1に詳述される。

20

【0248】

##### 5.4.1 癌

本発明は、被験体に治療上有効な量の変異型Fc領域を含む1種以上の分子を投与することを含む、その被験体の癌または転移の治療または予防のための方法および組成物を包含する。

【0249】

変異型Fc領域を含む本発明の分子(すなわち、ポリペプチド、抗体)を使用して、原発腫瘍の増殖または癌性細胞の転移を予防し、抑制し、または減少させることができる。1つの実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIII Aおよび/またはFc RIIAと結合するよりも高い親和性でFc RIII Aおよび/またはFc RIIAと結合する変異型Fcを含み、かつ/またはその変異型Fc領域は増強したエフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、食作用、オプソニン作用、その他を有する。こうした分子を単独で使用して、癌を治療または予防することができる。別の実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIII Aおよび/またはFc RIIAと結合するよりも高い親和性でFc RIII Aおよび/またはFc RIIAと結合し、さらに野生型Fc領域を含む対応するポリペプチドがFc RIIBと結合するよりも低い親和性でFc RIIBと結合する変異型Fcを含み、かつ/またはその変異型Fc領域は増強したエフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、食作用、オプソニン作用、その他を有する。こうした分子を単独で使用して、癌を治療または予防することができる。

30

40

【0250】

いくつかの実施形態では、本発明は、Fc RIII A-158VまたはFc RIII A-158F対立遺伝子についてのホモ接合のようなFc R遺伝子多型を持つ被験体の癌の治療または予防のための方法および組成物を包含する。いくつかの実施形態では、本発明は、治療用抗体、例えば本発明の方法の腫瘍特異的モノクローナル抗体の操作を包含し、操作された抗体はFc RIII Aの低親和性対立遺伝子(158F)についてのホモ接合患者において増大した効力を持つ。別の実施形態では、本発明は、治療用抗体、例えば本発明の方法の腫瘍特異的モノクロー

50

ーナル抗体の操作を包含し、操作された抗体はFc RIIIAの高親和性対立遺伝子(158V)についてのホモ接合患者において増大した効力を持つ。

【0251】

いくつかの実施形態では、本発明の操作された抗体は非ホジキンリンパ腫(NHL)の治療および/または予防に特に有効である。本発明の操作された抗体は、限定するわけではないが、抗CD20 mAbであるRituximabを使用する化学療法および免疫療法を含む、NHLのための現行の治療方式よりも、治療上有効である。抗CD20モノクローナル抗体の効力は、しかしながら、被験体のFc R遺伝子多型に依存する(Cartonら、2002 Blood, 99: 754-8; Wengら、2003 J Clin Oncol. 21(21): 3940-7(この両者の全体を参照により本明細書に組み入れる))。これらの受容体はエフェクター細胞の表面上に発現し、ADCCを仲介する。低親和性活性化受容体の高親和性対立遺伝子は、エフェクター細胞の、ADCCを仲介する能力を向上させる。本発明の方法によって、Fc突然変異を有する抗CD20抗体を操作して、その変更されたFcドメインによってエフェクター細胞上のFc Rに対するその親和性を増大させることが可能になる。本発明の操作された抗体は、患者についてそのFc R遺伝子多型にかかわらず、よりよい免疫療法試薬を提供する。

10

【0252】

被験体中での操作された抗CD20抗体の効力を判定するための代表的な方法は、以下を含む：Fc突然変異を持ち、ADCCにおいて実質的に増大した殺傷性を示すキメラ抗HER2/neu重鎖遺伝子を有するプラスミドを、Rituximab重鎖遺伝子に由来する可変ドメイン中へ移すための骨格として使用することができる。抗HER2/neu Fc変異型に由来する可変部は、Rituximab由来の可変部で置き換えられる。野生型FcドメインもしくはFc R結合性を無効にするD265A突然変異、または抗CD20 Fc変異体を含むプラスミドを、Rituximab軽鎖遺伝子とともに馴化(conditioned)培地中の293H細胞に一時的に同時トランスフェクトし、通常の手法を用いて、抗体をタンパク質Gカラムにより精製する。

20

【0253】

Fc変異型を有する抗CD20mAbを、培養したB細胞系を用いたADCCによって試験して、Fc突然変異体のADCCを増大させる能力を判定する。本明細書に開示した方法を使用して、標準的ADCCを実施する。Ficoll-Paque勾配(Pharmacia)を使用して、リンパ球を末梢血から採取する。標的Daudi細胞(CD20を発現するB細胞系統)にユーロピウム(PerkinElmer)を負荷し、エフェクターとともに37℃で4時間インキュベートする。蛍光プレートリーダー(Wallac)を使用して、放出されたユーロピウムを検出する。得られたADCCデータは、NK細胞介在細胞傷害を誘発するFc変異型の効力を示し、どの抗CD20 Fc変異体が患者サンプルおよび分離単球の両方について試験されるべきかを立証する。その後、抗CD20抗体の効力を増大させるのに最大の能力を示すFc変異型を、患者由来のPBMCを用いたADCCアッセイで試験する。健康なドナー由来のPBMCがエフェクター細胞として用いられる。抗CD20変異型およびRituximabを用いたin vitro ADCCアッセイは、甲状腺リンパ腫の患者由来の原発リンパ腫細胞中で行われる。当技術分野で知られた方法を使用して、ドナーの特異的Fc R遺伝子多型を判定し、リストを作成する。ADCCアッセイは、異なるFc RIIIAおよびFc RIIA遺伝子型を持つ患者由来のエフェクター細胞によって行われる。

30

【0254】

本発明の一態様によれば、変異型Fc領域を含む本発明の分子(例えば、抗体)は、野生型Fc領域を含有する分子に比較して、抗体エフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、食作用、オプソニン作用その他の能力を増大させることによって、癌免疫療法の効力を増強する。特定の実施形態では、変異型Fc領域を持つ本発明の分子を使用して、抗体依存性細胞傷害性および/または腫瘍細胞の食作用が増強される。本発明の分子は、少なくとも1つの抗体介在エフェクター機能を強化することによって、免疫療法による癌治療の効力を増強することができる。特定の一実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、補体依存性カスケードを強化することによって、免疫療法による治療の効力を増強する。本発明の別の実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、標的腫瘍細胞の食作用および/またはオプソニン作用を強化することによって、免疫療法による治療の効力を増強する。

40

50

本発明の別の実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、標的腫瘍細胞の破壊における抗体依存性細胞傷害性(“ADCC”)を強化することによって、治療の効力を増強する。

【0255】

本発明はさらに、例えば治療用抗体のエフェクター機能(例えば、ADCC)を強化することによって、治療用抗体の治療効力を増強するための、治療用抗体(例えば、腫瘍特異的モノクローナル抗体)の操作を想定する。好ましくはその治療用抗体は細胞傷害性および/またはオプソニン作用性抗体である。当業者は、本発明の方法に従って、所望の結合特性を持つ本発明の分子(例えば、少なくとも1個のアミノ酸修飾がある変異型Fc領域を有する分子であって、この修飾が、野生型Fc領域を含む対応する分子と比較して、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する変異型Fc領域の親和性を強化するもの)を同定した(セクション5.2および表5参照)後、セクション5.2.2に記載したように、標準的組換えDNA技術および任意の既知の突然変異誘発技術を使用して、治療用抗体を操作し、同定された所望の結合特性を持つ突然変異部位を保有する、操作された治療薬を製造することができることを理解できるはずである。癌治療での治療上の有用性が証明されている、表6に列挙した治療用抗体のいずれも、本発明の方法に従って操作することができ(例えば、野生型Fc領域を持つ治療用抗体と比較して、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対して増大した親和性を持つようにFc領域を修飾することによって)、かつ癌抗原によって特徴付けられる癌の治療および/または予防のために使用することができる。

10

本発明はまた、限定するわけではないが、ENBRELなどの、治療上の有用性を有するFc領域を含むその他のあらゆるポリペプチドを本発明の方法に従って操作することを含み、該操作は、例えばFc領域を含むポリペプチドのエフェクター機能を強化することによって、こうしたポリペプチドの治療効力を増強するためのものである。

20

【表6】

本発明の方法にしたがって操作することができる治療用抗体

会社	製品	疾患	標的
Abgenix	ABX-EGF	癌	EGF受容体
AltaRex	OvaRex	卵巣癌	腫瘍抗原CA125
	BravaRex	転移性癌	腫瘍抗原MUC1
Antisoma	Theragyn (pentumomabイットリウム-90)	卵巣癌	PEM抗原
	Therex	乳癌	PEM抗原
Boehringer Ingelheim	bivatuzumab	頭および頸部癌	CD44
Centocor/J&J	Panorex	大腸直腸癌	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	急性MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	虚血性卒中	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAb、イディオタイプ105AD7	大腸直腸癌ワクチン	gp72
Crucell	抗EpCAM	癌	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb、肺癌	非小細胞肺癌	NA
Genentech	Herceptin	転移性乳癌	HER-2
	Herceptin	初期乳癌	HER-2
	Rituxan	再発/抵抗性低度または濾胞性NHL	CD20
	Rituxan	中度及び高度NHL	CD20
	MAb-VEGF	NSCLC、転移性	VEGF
	MAb-VEGF	大腸直腸癌、転移性	VEGF

10

20

30

会社	製品	疾患	標的
	AMD Fab	加齢に伴う黄斑変性症	CD18
	E-26 (2 <sup>nd</sup> gen. IgE)	アレルギー喘息および鼻炎	IgE
IDEC	Zevalin (リツキサン+イトリウム-90)	低度の濾胞性、再発または抵抗性、CD20-陽性、B細胞NHLおよびリツキシマブ抵抗性NHL	CD20
ImClone	セツキシマブ+インノテカン	抵抗性大腸直腸癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチンおよび放射	新しく診断されたまたは再発性頭及び頸部癌	EGF受容体
	セツキシマブ+ゲムシタピン	新しく診断された転移性肺癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチン+5FUまたはタキソール	再発性または転移性頭及び頸部癌	EGF受容体
	セツキシマブ+カルボプラチン+バクリタキセル	新しく診断された非小細胞肺癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチン	頭及び頸部癌(広汎な不治の局所領域疾患および遠くへの転移)	EGF受容体
	セツキシマブ+放射	局所進行性頭及び頸部癌	EGF受容体
	BEC2+カルメット-ゲラン桿菌	小細胞肺癌	ガングリオシドGD3を模倣する
	BEC2+カルメット-ゲラン桿菌	黒色腫	ガングリオシドGD3を模倣する
	IMC-1C11	肝転移を伴う大腸直腸癌	VEGF-受容体
ImmonoGEN	nuC242-DM1	大腸直腸、胃、および膵臓癌	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	非ホジキンリンパ腫	CD22

10

20

30

会社	製品	疾患	標的
	LymphoCideY-90	非ホジキンリンパ腫	CD22
	CEA-Cide	転移性固形腫瘍	CEA
	CEA-CideY-90	転移性固形腫瘍	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	大腸直腸癌(放射イメージ ジング)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	乳癌(放射イメージジング)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	肺癌(放射イメージジング)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	術中腫瘍 (放射イメージジング)	CEA
	LeukoScan (Tc-99m-標識 sulesomab)	軟部組織感染 (放射イメージジング)	CEA
	LymphoScan (Tc-99m-標識)	リンパ腫(放射イメージ ジング)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-標識)	liver7gem-細胞癌(放射 イメージジング)	AFP
Intracep	HumaRAD-HN (+イットリウム -90)	頭および頸部癌	NA
	HumaSPECT	大腸直腸イメージジング	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	前立腺および他の癌	CTLA-4
	MDX-210 (her-2過剰発現)	前立腺癌	HER-2
	MDX-210/MAK	癌	HER-2
MedImmune	Vitaxin	癌	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	MAB 425	様々な癌	EGF受容体
	IS-IL-2	様々な癌	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	慢性リンパ性白血病	CD52
NeoRx	CD20-ストレプトアビジン(+ ビオチン-イットリウム90)	非ホジキンリンパ腫	CD20
	Avidicin (アルブミン+ NRLU13)	転移性癌	NA

10

20

30

40

会社	製品	疾患	標的
Peregrine	Oncolym (+ヨウ素-131)	非ホジキンリンパ腫	HLA-DR10BETA
	Cotara (+ヨウ素-131)	切除不能の悪性神経膠腫	DNA-関連タンパク質
Pharmacia Corporation	C215 (+ブドウ球菌性エンテロトキシン)	膵臓癌	NA
	MAb、肺/腎臓癌	肺および腎臓癌	NA
	nacolumab tafentox (C242 +ブドウ球菌性エンテロトキシン)	大腸および膵臓癌	NA
Protein Design Labs	Nuvion	T細胞悪性腫瘍	CD3
	SMARTM195	AML	CD33
	SMARTD10	NHL	HLA-DR抗原
Titan	CEAVac	大腸直腸癌、進行した	CEA
	TriGem	転移性黒色腫&小細胞肺癌	GD2-ガングリオシド
	TriAb	転移性乳癌	MUC-1
Trilex	CEAVac	大腸直腸癌、進行した	CEA
	TriGem	転移性黒色腫&小細胞肺癌	GD2-ガングリオシド
	TriAb	転移性乳癌	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2放射標識	非ホジキンリンパ腫	NA
	Monopharm C	大腸直腸&膵臓癌	SK-1抗原
	GlioMab-H (+gelonin毒素)	神経膠腫、黒色腫&神経芽細胞腫	NA
Xoma	Rituxan	再発性/抵抗性低度または濾胞性NHL	CD20
	Rituxan	中および高度のNHL	CD20
	ING-1	腺腫癌	Ep-CAM

## 【 0 2 5 6 】

従って本発明は、癌抗原に結合し、細胞傷害性であり、本発明に従ってFc領域中の1以上の部位が修飾されることによって元の治療用抗体よりも高い親和性でFc R11IAおよび/またはFc R11Aと結合し、かつ/または、より有効にエフェクター機能(例えば、ADCC、食作用)を仲介する治療用抗体を使用する、癌抗原により特徴付けられる癌の予防または治療方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、癌抗原に結合し、細胞傷害性であり、本発明に従って操作されることによって元の治療用抗体よりも高い親和性でFc R11IAおよび/またはFc R11Aと結合し、そしてより低い親和性でFc R11Bと結合し、かつ/または、より有効にエフェクター機能(例えば、ADCC、食作用)を仲介する治療用抗体を使用する、癌抗原により特徴付けられる癌の予防または治療方法を提供する。本発明に従って操作された治療用抗体は、増大した細胞傷害活性(例えば、増大した腫瘍細胞殺傷および/または例えば増大したADCC活性もしくはCDC活性)を持つので、癌の予防または治療のために有用である。

## 【 0 2 5 7 】

癌抗原が関係する癌は、癌抗原に結合し、細胞傷害性であり、本発明の方法に従って操作されることにより、例えば増大したエフェクター機能を有する治療用抗体の投与によって、治療または予防することができる。特定の一実施形態では、本発明の方法によって操作された治療用抗体は、特定の癌抗原に特異的な抗体の、抗体介在細胞傷害効果を増強する。例えば、限定するわけではないが、以下の癌抗原が関係する癌を本発明の方法および組成物によって治療または予防することができる：KS 1/4 汎癌腫抗原(Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415)、卵巣癌抗原(CA125)(Yuら、1991, Cancer Res. 51(2): 468-475)、前立腺酸性ホスフェート(Tailorら、1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928)、前立腺特異的抗原(Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2):903-910; Israeliら、1993, Cancer Res. 53 :227-230)、黒色腫関連抗原p97(Estinら、1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446)、黒色腫抗原gp75(Vijayasardahlら、1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380)、高分子量黒色腫抗原(HMW-MAA)(Nataliら、1987, Cancer 59: 55-63; Mittelmanら、1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144)、前立腺特異的膜抗原、癌胎児性抗原(CEA)(Foonら、1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294)、多形性上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪小球抗原、結直腸腫瘍関連抗原(例えばCEA、TAG-72(Yokataら、1992, Cancer Res. 52: 3402-3408)、C017-1A(Ragnhammarら、1993, Int. J.Cancer 53: 751-758); GICA 19-9(Herlynら、1982, J. Clin. Immunol. 2: 135)、CTA-1およびLEA)、パーキットリンパ腫抗原-38.13, CD19(Ghetieら、1994, Blood 83: 1329-1336)、ヒトB-リンパ腫抗原-CD20(Reffら、1994, Blood 83: 435-445)、CD33 (Sgourosら、1993, J. Nucl. Med. 34: 422-430)、黒色腫特異的抗原(例えばガングリオシドGD2(Salehら、1993, J. Immunol., 151,3390-3398)、ガングリオシドGD3(Shitaraら、1993, Cancer Immunol. Immunother. 36: 373-380)、ガングリオシドGM2(Livingstonら、1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044)、ガングリオシドGM3(Hoonら、1993, Cancer Res. 53: 5244-5250)、腫瘍特異的移植型細胞表面抗原(TSTA)(例えばDNA腫瘍ウイルスのT抗原およびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原を始めとするウイルス誘発腫瘍抗原など)、腫瘍胎児抗原-アルファフェトプロテイン(例えば結腸のCEA)、膀胱腫瘍胎児抗原(Hellstromら、1985, Cancer. Res. 45: 2210-2188)、分化抗原(例えばヒト肺癌抗原L6、L20(Hellstromら、1986, Cancer Res. 46: 3917-3923))、線維肉腫の抗原、ヒト白血病T細胞抗原-Gp37(Bhattacharya-Chatterjeeら、1988, J of Immun. 141: 1398-1403)、新生糖タンパク質、スフィンゴリピド、乳癌抗原(例えばEGFR(上皮成長因子受容体)、HER2抗原(p185<sup>HER2</sup>)、多形上皮ムチン(PEM)(Hilkensら、1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359)、悪性ヒトリンパ球抗原-APO-1 (Bernhardら、1989, Science 245: 301-304)、分化抗原(Feizi, 1985, Nature 314: 53-57)(例えば胎児赤血球および初期内胚葉中のI抗原)、胃腺癌中のI(Ma)、乳房上皮中のM18およびM39、骨髄細胞中のSSEA-1、結直腸癌中のVEP8、VEP9、MyI、VIM-D5およびD<sub>1</sub>56-22、TRA-1-85(血液型H)、結腸腺癌中のC14、肺腺癌中のF3、胃癌中のAH6、胚性癌細胞中のYハプテンであるLe<sup>Y</sup>、TL5(血液型A)、A431細胞中のEGF受容体、膵癌中のE<sub>1</sub>シリーズ(血液型B)、胚性癌細胞中のFC10.2、胃腺癌抗原、腺癌中のCO-514(血液型Le<sup>a</sup>)、腺癌中のNS-10、CO-43(血液型Le<sup>b</sup>)、G49、EGF受容体、結腸腺癌中のMH2(血液型ALe<sup>b</sup>/Le<sup>Y</sup>)、結腸癌、胃癌ムチン中の19.9、骨髄細胞中のT<sub>5</sub>A<sub>7</sub>、黒色腫中のR<sub>24</sub>、胚性癌細胞中の4.2、G<sub>D3</sub>、DI.1、OFA-1、G<sub>M2</sub>、OFA-2、G<sub>D2</sub>、およびMI:22:25:8、ならびに4~8細胞胚中のSSEA-3およびSSEA-4。別の実施形態では、抗原は皮膚T細胞リンパ腫のペプチドに由来するT細胞受容体である(Ede Ison, 1998, The Cancer Journal 4: 62参照)。

#### 【 0 2 5 8 】

本発明の方法および組成物によって治療または予防することができる癌および関連疾患には、限定するわけではないが、以下が含まれる：白血病(限定するものではないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血球性白血病、および脊髄形成異常症候群など)、慢性白血病(限定するわけではないが、慢性骨髄性(顆粒球)白血病、慢性リンパ性白血病、毛様細胞白血病など)；真性赤血球増加症；リンパ腫(限定するわけではないが、ホジキン病、非ホジキ

10

20

30

40

50

ン病など)；多発骨髄腫(限定するわけではないが、非定型的多発骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫など)；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；特徴未確定の単クローングロブリン血症；良性単クローングロブリン血症；重鎖病；骨および結合組織肉腫(限定するわけではないが、骨部肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨の線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管腫(血管肉腫)、線維肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫など)；脳腫瘍(限定するわけではないが、グリオーマ、星状細胞腫、脳幹グリオーマ、上衣細胞腫、希突起グリオーマ、非グリア腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体腫、松果体芽腫、初発脳リンパ腫など)；乳癌(限定するわけではないが、腺癌、小葉(小細胞)癌、管内癌、髄様乳癌、粘液乳癌、管状乳癌、乳頭癌、ページェット病、および炎症性乳癌など)；副腎癌、(限定するわけではないが、クロム親和性細胞腫および副腎皮質癌など)；甲状腺癌(限定するわけではないが、乳頭性もしくは小葉性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および未分化甲状腺癌など)；膵癌、(限定するわけではないが、膵島細胞腫、ガトリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドもしくは膵島細胞腫瘍など)；下垂体癌(限定するわけではないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、末端肥大症、および尿崩症など)；眼の癌(限定するわけではないが、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、および毛様体黒色腫などの眼部黒色腫、および網膜芽腫など)；陰癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌、腺癌、および黒色腫など)；外陰部癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびページェット病など)；子宮頸部癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌、および腺癌など)；子宮癌(限定するわけではないが、子宮内膜癌および子宮肉腫など)；卵巣癌(限定するわけではないが、卵巣上皮癌、境界性腫瘍、胚細胞腫瘍、および間質腫瘍など)；食道癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘膜表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣状癌、および燕麦細胞(小細胞)癌など)；胃癌(限定するわけではないが、腺癌、菌状(ポリープ状)、潰瘍性、表在性、拡散性、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および癌肉腫など)；結腸癌；直腸癌；肝癌(限定するわけではないが、肝細胞癌および肝芽腫など)；胆嚢癌(限定するわけではないが、腺癌など)；胆管癌(限定するわけではないが、乳頭様、結節性、および拡散性など)；肺癌(限定するわけではないが、非小細胞肺癌、扁平上皮癌(表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌など)；精巣癌(限定するわけではないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化性、古典的(典型的)、精子細胞、非精上皮腫、胎児性癌、奇形腫、絨毛癌(卵黄のう腫瘍)など)；前立腺癌(限定するわけではないが、腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫など)；陰茎癌；口腔癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌など)；基底癌；唾液腺癌(限定するわけではないが、腺癌、粘膜表皮癌、および腺様嚢胞癌など)；咽頭癌(限定するわけではないが、扁平上皮癌、および疣状癌など)；皮膚癌(限定するわけではないが、基底細胞癌、扁平上皮癌および黒色腫、表在性黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子黒色腫、末端性黒子性黒色腫など)；腎癌(限定するわけではないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行性細胞癌(腎骨盤および/または子宮))；ウィルムス腫瘍；膀胱癌(限定するわけではないが、移行性細胞癌、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫など)。さらに、癌は以下を含む：粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌(こうした疾患の総説については、以下を参照されたい：Fislunanら、1985、Medicine、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia およびMurphyら、1997、Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America)。

#### 【 0 2 5 9 】

従って、本発明の方法および組成物は、(限定するわけではないが)以下を含む多様な癌またはその他の異常増殖疾患の治療または予防においても有用である：癌(膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、前立腺、子宮頸部、甲状腺および皮膚の癌を含

10

20

30

40

50

む)；扁平上皮癌など；リンパ造血系腫瘍、例えば白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫など；骨髓造血系腫瘍、例えば急性および慢性骨髓性白血病および前骨髓球性白血病など；間葉起源の腫瘍、例えば線維肉腫および横紋筋肉腫など；その他の腫瘍、例えば黒色腫、精上皮腫、奇形癌、神経芽腫およびグリオーマなど；中枢および末梢神経系の腫瘍、例えば星状細胞腫、神経芽腫、グリオーマ、および神経鞘腫など；間葉起源の腫瘍、例えば線維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫など；ならびにその他の腫瘍、例えば黒色腫、色素性乾皮症(、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺小胞癌および奇形癌など。アポトーシスの異常に起因する癌も、本発明の方法および組成物によって治療されることが想定されている。こうした癌として、限定するわけではないが以下が含まれる：小胞腫、p53突然変異を伴う癌、乳房、前立腺および卵巣のホルモン依存性腫瘍、ならびに家族性腺腫様ポリープ症および脊髄形成異常症候群などの前癌性病変。特定の実施形態では、卵巣、膀胱、乳房、結腸、肺、皮膚、膵臓または子宮中で、悪性もしくは増殖異常変化(異形成および形成不全など)、または過剰増殖疾患を、本発明の方法および組成物によって治療または予防する。別の特定の実施形態では、肉腫、黒色腫、または白血病を、本発明の方法および組成物によって、治療または予防する。

10

#### 【0260】

特定の実施形態では、本発明の分子(例えば、変異型Fc領域を含む抗体、または本発明の方法に従って操作した治療用モノクローナル抗体)は、原発腫瘍の増殖または癌性細胞の転移を、この本発明の分子の非存在下での原発腫瘍の増殖または転移に比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%、抑制するか減少させる。

20

#### 【0261】

##### 5.4.1.1 併用療法

本発明はさらに、限定するわけではないが、現行の標準的および実験的化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法を含む、癌の治療または予防について当業者に知られたその他の療法と併用して、本発明の分子を投与することを包含する。いくつかの実施形態では、本発明の分子を、治療上または予防上有効な量の1種以上の抗癌剤、治療用抗体(例えば、表6に列挙した抗体)、または癌の治療および/または予防について当業者に知られたその他の薬剤(セクション5.4.1.2参照)と併用して、投与することができる。

30

#### 【0262】

いくつかの実施形態では、1種以上の本発明の分子を、癌の治療に有用なその他の1種以上の治療薬と同時に、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。「同時に」なる用語は、予防または治療薬の正確な同時投与に限定するものではなく、むしろ本発明の分子およびその他の薬剤を哺乳動物に順次または一定の時間間隔以内に投与して、本発明の分子がその他の薬剤と同時に作用して、これらを別の方法で投与した場合よりも増大した利益を提供するようにしたものを意味する。例えば、予防または治療用(例えば、化学療法、放射線療法、ホルモン療法または生物学的療法)薬のそれぞれを、同時に、または任意の順序で順次、別の時点で投与することができる。しかし、同時に投与しない場合は、所望の治療または予防効果が提供されるように、時間的に十分近接させて投与すべきである。各治療薬は、任意の適切な形態で、かつ任意の好適な経路で、別々に投与することができる。種々の実施形態では、予防または治療薬を以下のように投与する：1時間未満の間隔、約1時間間隔、約1時間～約2時間間隔、約2時間～約3時間間隔、約3時間～約4時間間隔、約4時間～約5時間間隔、約5時間～約6時間間隔、約6時間～約7時間間隔、約7時間～約8時間間隔、約8時間～約9時間間隔、約9時間～約10時間間隔、約10時間～約11時間間隔、約11時間～約12時間間隔、24時間間隔以下または48時間間隔以下。好ましい実施形態では、2以上の成分を患者の同一来診時に投与する。

40

50

## 【0263】

別の実施形態では、予防または治療薬を、約2~4日間隔、約4~6日間隔、約1週間間隔、約1~2週間間隔、2週間以上の間隔で、投与する。好ましい実施形態では、予防または治療薬を、両方の薬剤が依然活性である時間枠内に、投与する。当業者ならば、投与する薬剤の半減期を測定することによって、こうした時間を決定することができるはずである。

## 【0264】

ある実施形態では、本発明の予防または治療薬を、被験体に周期的に投与する。周期治療には、第1薬剤をある期間投与した後、第2薬剤および/または第3薬剤をある期間投与し、この順次投与を反復することを含む。周期治療は、1種以上の療法に対する耐性の進行を減少させ、療法の1つの副作用を回避するかまたは減少させ、かつ/あるいは治療の効力を向上させることができる。

10

## 【0265】

ある実施形態では、予防または治療薬を、約3週間未満、約2週間毎に1回、約10日毎に1回、または約1週間毎に1回、の周期で投与する。1周期には、周期毎に約90分間、周期毎に約1時間、周期毎に約45分間かけて注入することによる、治療または予防薬の投与が含まれる。各周期は少なくとも1週間の休止、少なくとも2週間の休止、少なくとも3週間の休止期を含む。投与の周期の回数は約1~約12周期、より典型的には約2~約10周期、より典型的には約2~約8周期である。

## 【0266】

さらに別の実施形態では、本発明の治療および予防薬を、メトロノーム的投薬方式で、長期の休止期間を置かずに、連続注入または頻繁投与のいずれかによって、投与する。こうしたメトロノーム的投与には、休止期間のない、一定の間隔での投薬が含まれる。典型的には、治療薬、特に細胞傷害薬を低用量で使用する。こうした投薬方式には、長期間の比較的 low 用量の連日投与が含まれる。好ましい実施形態では、低用量の使用は、毒性副作用を最少にし、休止期間を排除することができる。ある実施形態では、治療および予防薬は、以下の範囲で、連日低用量投与または連続注入によって、送達される：約24時間~約2日、~約1週間、~約2週間、~約3週間、~約1ヶ月、~約2ヶ月、~約3ヶ月、~約4ヶ月、~約5ヶ月、~約6ヶ月。こうした投薬方式のスケジュールは腫瘍専門家が最適化することができる。

20

30

## 【0267】

別の実施形態では、複数の治療方針を、1の哺乳動物に同時に適用する。すなわち、個々の用量の治療薬を別々に投与するけれども、本発明の分子が別の薬剤または薬剤群と協同して作用できる時間間隔内になるようにする。例えば、1成分を1週間に1回投与し、それと組み合わせて、別の成分は2週間毎に1回、または3週間毎に1回投与してもよい。言い換えれば、治療薬を同時にまたは患者の同一来診時に投与しなくても、治療薬の複数の投与方式を同時に実行する。

## 【0268】

その他の予防および/または治療薬と併用する場合、本発明の分子ならびにその他の予防および/または治療薬は相加的に、あるいはより好ましくは、相乗的に作用することができる。1つの実施形態では、本発明の分子を1以上の治療薬とともに同一の医薬組成物中で同時に投与する。別の実施形態では、本発明の分子を1以上の治療薬とともに別の医薬組成物中で同時に投与する。さらに別の実施形態では、本発明の分子を、その他の予防または治療薬の投与前、またはその後投与する。本発明は、同一または異なる投与経路、例えば経口および腸管外で、本発明の分子をその他の予防または治療薬と併用して投与することを想定している。ある実施形態では、本発明の分子を、限定するわけではないが、毒性などの有害副作用をもたらす可能性があるその他の予防または治療薬と同時に投与する場合、その予防または治療薬を、有害副作用が誘発される閾値より低い用量で投与するのが有益である。

40

## 【0269】

50

本明細書で提供する投薬量および投与頻度には、「治療上有効な」および「予防上有効な」の意味が包含されている。投薬量および頻度はさらに、典型的には各患者に特異的な要因に従って、投与する特定の治療または予防薬、癌の重篤度およびタイプ、投与経路、ならびに患者の年齢、体重、応答度、および過去の病歴に応じて、変更されるべきものである。好適な方式は、こうした要因を考慮し、例えば文献に報告され、また以下で推奨されている投薬量にしたがうことによって、当業者が選択し得るものである：Physician's Desk Reference（第56版，2002）。

【0270】

#### 5.4.1.2 その他の治療/予防薬

特定の実施形態では、本発明の方法は、1以上の本発明の分子と、癌の治療および/または予防のために使用される1以上の治療薬との投与を包含する。1つの実施形態では、血管形成阻害薬を本発明の分子と併用して投与することができる。本発明の方法および組成物中で使用することができる血管形成阻害薬として、限定するわけではないが以下が含まれる：アンギオスタチン(Angiostatin)(プラスミノゲン断片)；抗血管形成抗トロンピンII；アンギオザイム(Angiozyme)；ABT-627；Bay 12-9566；ベネフィン(Benefin)；ベバシズマブ(Bevacizumab)；BMS-275291；軟骨由来阻害薬(CDI)；CAI；CD59 補体断片；CEP-7055；Col 3；コンブレタスタチン(Combretastatin)A-4；エンドスタチン(Endostatin)(コラーゲンXVIII断片)；フィブロネクチン(Fibronectin)断片；グロベータ(Gro-beta)；ハロフギノン(Halofuginone)；ヘパリナーゼ類；ヘパリン6サッカライド断片；HMV833；ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)；IM-862；インターフェロンアルファ/ベータ/ガンマ；インターフェロン誘導性タンパク質 (IP-10)；インターロイキン-12；クリングル(Kringle)5(プラスミノゲン断片)；マリマスタット(Marimastat)；金属プロテイナーゼ阻害薬(TIMPs)；2-メトキシエストラジオール；MMI 270(CGS 27023A)；MoAbIMC-1C11；ネオバスタット(Neovastat)；NM-3；パンゼム(Panzem)-S；テトラチオモリブダート；サリドマイド；トロンボスポンジン-1(TSP-1)；TNP-470；トランスフォーミング増殖因子-ベータ(TGF- $\beta$ )；バスキュロスタチン(Vasculostatin)；バソスタチン(Vasostatin)(カルレチキュリン断片)；ZD6126；ZD 6474；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬(FTI)；およびビスホスホナート類。

【0271】

本発明の医薬組成物および投与剤形ならびにキットを含む、本発明の各種の実施形態中で本発明の分子と併用して使用することができる抗癌薬として、限定するわけではないが以下が含まれる：アシピシン(acivicin)；アクラルピシン(aclarubicin)；塩酸アコダゾール(acodazole)；アクロニン(acronine)；アドゼレシン(adozelesin)；アルデスロイキン(aldesleukin)；アルトレタミン(altretamine)；アンボマイシン(ambomycin)；酢酸アメタントロン(ametantrone)；アミノグルテチミド(aminoglutethimide)；アンサクリン(amsacrine)；アナストロゾール(anastrozole)；アントラマイシン(anthracycline)；アスパラギナーゼ；アスペルリン(asperlin)；アザシチジン(azacitidine)；アゼテパ(azetepa)；アゾトマイシン(azotomycin)；バチマスタット(batimastat)；ベンゾデパ(benzodepa)；ピカルタミド(bicalutamide)；塩酸ビスアントレン(bisantrene)；ジメシル酸ビスナフィド(bisnafide)；ビゼレシン(bizelesin)；硫酸ブレオマイシン(bleomycin)；ナトリウムブレキナル(brequinar)；プロピリミン(bropirimine)；ブスルファン(busulfan)；カクチノマイシン(cactinomycin)；カルステロン(calusterone)；カラセミド(caracemide)；カルベチメル(carbetimer)；カルボプラチン(carboplatin)；カルムスチン(carmustine)；塩酸カルピシン(carubicin)；カルゼレシン(carzelesin)；セデフィンゴル(cedefingol)；クロランブシル(chlorambucil)；シロレマイシン(cirolemycin)；シスプラチン(cisplatin)；クラドリピン(cladribine)；メシル酸クリスナトル(crisnatol)；シクロホスファミド；シタラピン(cytarabine)；ダカルバジン(dacarbazine)；ダクチノマイシン(dactinomycin)；塩酸ダウノルピシン(daunorubicin)；デシタビン(decitabine)；デキソルマプラチン(dexormaplatin)；デザグアニン(dezaguanine)；メシル酸デザグアニン(dezaguanine)；ジアジクオン(diaziquone)；ドセタキセル(docetaxel)；ドキソルピシン(doxorubicin)

in) ; 塩酸ドキシソルピシン(doxorubicin) ; ドロロキシフェン(droloxifene) ; クエン酸ドロロキシフェン(droloxifene) ; プロピオン酸ドロモスタノロン(dromostanolone) ; ジュアゾマイシン(duazomycin) ; エダトレキサート(edatrexate) ; 塩酸エフロルニチン(eflornithine) ; エルサミトルシン(elsamitrucin) ; エンドプラチン(enloplatin) ; エンプロマート(enpromate) ; エピプロピジン(epipropidine) ; 塩酸エピルピシン(epirubicin) ; エルプロゾール(erbulozole) ; 塩酸エソルピシン(esorubicin) ; エストラムスチン(estramustine) ; リン酸エストラムスチン(estramustine)ナトリウム ; エタニダゾール(etanidazole) ; エトポシド(etoposide) ; リン酸エトポシド(etoposide) ; エトプリン(etoprine) ; 塩酸ファドロゾール(fadrozole) ; ファザラビン(fazarabine) ; フェンレチニド(fenretinide) ; フロキシウリジン(floxuridine) ; リン酸フルダラビン(fludarabine) ; アルオロウラシル ; フロシタピン(flurocitabine) ; フォスキドン(fosquidone) ; ナトリウムフォストリエシン(fostriecin) ; ゲムシタピン(gemcitabine) ; 塩酸ゲムシタピン(gemcitabine) ; ヒドロキシウレア ; 塩酸イダルピシン(idarubicin) ; イフォスファミド(ifosfamide) ; イルモフォシン(ilmofofosine) ; インターロイキンII(組換えインターロイキンII、またはrIL2を含む)、インターフェロンアルファ-2a ; インターフェロンアルファ-2b ; インターフェロンアルファ-n1 ; インターフェロンアルファ-n3 ; インターフェロンベータ-1a ; インターフェロンガンマ-1b ; イプロプラチン(iproplatin) ; 塩酸イリノテカン(irinotecan) ; 酢酸ランレオチド(lanreotide) ; レトロゾール(letrozole) ; 酢酸ロイプロリド(leuprolide) ; 塩酸リアロゾール(liarozole) ; ロメトレキソール(lometrexol)ナトリウム ; ロムスチン(lomustine) ; 塩酸ロソキサントロン(losoxantrone) ; マソプロコル(masoprocol) ; メイタンシン(maytansine) ; 塩酸メクロレタミン(mechlorethamine) ; 酢酸メゲストロル(megestrol) ; 酢酸メレンゲストロル(melengestrol) ; メルファラン(melphalan) ; メノガリル(menogaril) ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; ナトリウムメトトレキサート ; メトプリン(metoprine) ; メツレデパ(meturedepa) ; ミチンドミド(mitindomide) ; ミトカルシン(mitocarcin) ; ミトクロミン(mitocromin) ; ミトギリリン(mitogillin) ; ミトマルシン(mitomalcin) ; マイトマイシン ; ミトスペル(mitosper) ; ミトタン(mitotane) ; 塩酸ミトキサントロン(mitoxantrone) ; ミコフェノール酸(mycophenolic acid) ; ノコダゾール(nocodazole) ; ノガラマイシン(nogalamycin) ; オルマプラチン(ormaplatin) ; オキシスラン(oxisuran) ; パクリタキセル(paclitaxel) ; ペガスパルガーゼ(pegaspargase) ; ペリオマイシン(peliomycin) ; ペンタムスチン(pentamustine) ; 硫酸ペプロマイシン(peplomycin) ; ペルホスファミド(perfosfamide) ; ピボプロマン(pipobroman) ; ピボスルファン(piposulfan) ; 塩酸ピロキサントロン(piroxantrone) ; プリカマイシン(plicamycin) ; プロメスタン(plomestane) ; ポルフィマー(porfimer)ナトリウム ; ポルフィロマイシン(porfiromycin) ; プレドニムスチン(prednimustine) ; 塩酸プロカルバジン(procarbazine) ; ピューロマイシン(puomycin) ; 塩酸ピューロマイシン(puomycin) ; ピラゾフリリン(pyrazofurin) ; リボプリン(ribooprine) ; ログレチミド(rogletimide) ; サフィンゴル(safingol) ; 塩酸サフィンゴル(safingol) ; セムスチン(semustine) ; シントラゼン(simtrazene) ; ナトリウムスパルフォサート(sparfosate) ; スパルソマイシン(sparsomycin) ; 塩酸スピロゲルマニウム(spirogermanium) ; スピロムスチン(spiromustine) ; スピロプラチン(spiroplatin) ; ストレプトニグリン(streptonigrin) ; ストレプトゾシン(streptozocin) ; スロフェヌル(sulofenur) ; タリソマイシン(talisomycin) ; テコガラン(tecogalan) ナトリウム ; テガフル(tegafur) ; 塩酸テロキサントロン(teloxantrone) ; テモポルフィン(temoporfin) ; テニポシド(teniposide) ; テロキシロン(teroxirone) ; テストラクトン(testolactone) ; チアミプリン(thiamiprine) ; チオグアニン(thioguanine) ; チオテパ(thiotepa) ; チアゾフリリン(tiazofurin) ; チラパザミン(tirapazamine) ; クエン酸トレミフェン(toremifene) ; 酢酸トレストロン(trestolone) ; リン酸トリシリピン(triciribine) ; トリメトレキサート(trimetrexate) ; グルクロン酸トリメトレキサート(trimetrexate) ; トリプトレリン(triptorelin) ; 塩酸ツブロゾール(tubulozole) ; ウラシルマスタード(uracil mustard) ; ウレデパ(uredepa) ; バプレオチド(vapreotide) ; ベルテポルフィン(verteporfin) ; 硫酸ビンブラスチン(vinblastine) ; 硫酸ビンクリスチン(vincristine) ; ビンデ

シン(vindesine)；硫酸ビンデシン(vindesine)；硫酸ビンエピジン(vinepidine)；硫酸ビ  
 ングリシナート(vinglycinat)；硫酸ビンレウロシン(vinleurosine)；酒石酸ビノレルビ  
 ン(vinorelbine)；硫酸ビンロシジン(vinrosidine)；硫酸ビンゾリジン(vinzolidine)；  
 ボロゾール(vorozole)；ゼニプラチン(zeniplatin)；ジノスタチン(zinostatin)；塩酸ゾ  
 ルピシン(zorubicin)。その他の抗癌薬として、限定するわけではないが、以下が含まれ  
 る:20-エピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3；5-エチニルウラシル；アビラテロン(abiraterone)；  
 アクラルピシン(aclarubicin)；アシルフルベン(acylfulvene)；アデシベノル(adecyphenol)；  
 アドゼレシン(adozelesin)；アルデスロイキン(aldesleukin)；ALL-TK拮抗薬  
 ；アルトレタミン；アンバムスチン(ambamustine)；アミドックス(amidox)；アミフォス  
 チン(amifostine)；アミノレブリン酸；アンルピシン(amrubicin)；アンサクリン(amsacrine) 10  
 ；アナグレリド(anagrelide)；アナストロゾール(anastrozole)；アンドログラホリ  
 ド(andrographolide)；血管形成阻害薬；拮抗薬D；拮抗薬G；アンタレリクス(antarelix)  
 ；抗背方形形態発生タンパク質-1；抗アンドロゲン前立腺癌；抗エストロゲン；抗ネオ  
 プラトン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；グリシン酸アフィジコリン(aphidicolin)  
 ；アポトーシス遺伝子モジュレーター；アポトーシスレギュレーター；アプリン酸；アラ  
 -CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アシュラクリン(asulacriner)；アタメスタン  
 (atamestane)；アトリムスチン(atrimustine)；アキシナスタチン(axinastatin)1；アキ  
 シナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン(azasetron)；アザトキシン(azatoxin)  
 ；アザチロシン(azatyrosine)；バッカチンIII誘導体；バラノル(balanol)；パチマスタ  
 ット(batimastat)；BCR/ABL拮抗薬；ベンゾクロリン類；ベンゾイルスタウロスポリン( 20  
 benzoylstaurosporine)；ベータラクタム誘導体；ベータアレチン(beta-alethine)；ベ  
 タクラマイシン(betaclamycin)B；ベチュリン酸；bFGF阻害薬；ビカルタミド(bicalutami  
 de)；ビスアントレン(bisantrene)；ビスアジリジニルスペルミン(bisaziridinylspermine)；  
 ビスナフィド(bisnafide)；ビストラテン(bistratene)A；ビゼレシン(bizelesin)；ブレ  
 フラート(breflate)；プロピリミン(bropirimine)；ブドチタン(budotitan)；ブチオニ  
 ンスルホキシイミン(buthionine sulfoximine)；カルシポトリオール(calciptotriol)；カル  
 ホスチン(calphostin)C；カンプトテシン(camptothecin)誘導体；カナリポクス(canarypo  
 x)IL-2；カペシタピン(capecitabine)；カルボキサミド-アミノ-トリアゾール；カルボキ  
 シアミドトリアゾール；CaRest M3；CARN 700；軟骨由来阻害薬；カルゼレシン(carzelesin)  
 ；カゼインキナーゼ阻害薬(ICOS)；カスターノスペルミン(castanospermine)；セクロピ  
 ン(cecropin)B；セトロレリクス(cetrorelix)；クロルン(chlorins)；クロロキノキサリ  
 ンスルホンアミド；シカプロスト(cicaprost)；シスポルフィリン；クラドリピン(cladri  
 bine)；クロミフェン(clomifene)類似体；クロトリーマゾール(clotrimazole)；コリスマイ  
 シン(collismycin)A；コリスマイシンB；コンプレタスタチン(combretastatin)A4；コン  
 プレタスタチン類似体；コナゲニン(conagenin)；クランベシジン(crambescidin)816；ク  
 リスナトル(crisnatol)；クリプトフィシン(cryptophycin)8；クリプトフィシンA誘導体  
 ；キュラシン(curacin)A；シクロペンタアントラキノン類；シクロプラタム(cycloplatam)  
 ；シベマイシン(cypemycin)；シタラピンオクホスファート(cytarabineocfosfate)；細  
 胞溶解因子；シトスタチン(cytostatin)；ダクリキシマブ(dacliximab)；デシタピン(dec  
 itabine)；デヒドロジデムニン(dehydrodidemnin)B；デスロレリン(deslorelin)；デキサ  
 メタゾン(dexamethasone)；デキシホスファミド(dexifosfamide)；デクスラゾキサ  
 ン(dexrazoxane)；デクスベラパミル(dexverapamil)；ジアジクオン(diaziquone)；ジデ  
 ミン(didemnin)B；ジドクス(didox)；ジエチルノルスペニン(diethylnorspennine)；ジ  
 ヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール,9-；ジオキサマイシン(dioxamycin)；ジ  
 フェニルスピロムスチン(diphenyl spiromustine)；ドセタキセル(docetaxel)；ドコ  
 サノル(docosanol)；ドラセトロン(dolasetron)；ドキシフルリジン(doxifluridine)；ド  
 ロロキシフェン(droloxifen)；ドロナピノル(dronabinol)；デュオカルマイシン(duocarmycin)SA；  
 エブセレン(ebselen)；エコムスチン(ecomustine)；エデルフォシン(edelfosine)；エド  
 レコロマブ(edrecolomab)；エフロルニチン(eflornithine)；エレメン(elemene)；エミテ  
 フル(emitofur)；エピルピシン(epirubicin)；エプリステリド(epristeride)；エストラム 50

スチン(estramustine)類似体；エストロゲン作動薬；エストロゲン拮抗薬；エタニダゾール(etanidazole)；リン酸エトポシド(etoposide)；エキセメスタン(exemestane)；ファドロゾール(fadrozole)；ファザラビン(fazarabine)；フェンレチニド(fenretinide)；フィルグラスチム(filgrastim)；フィナステリド(finasteride)；フラボピリドール(flavopiridol)；フレゼラスチン(flezelastine)；フルアステロン(fluasterone)；フルダラビン(fludarabine)；塩酸フルロダウノルニシン(fluorodaunorubicin)；ホルフェニメクス(forfenimex)；ホルメスタン(formestane)；ホストリエシン(fostriecin)；ホテムスチン(fotemustine)；テキサフィリンガドリニウム(gadolinium texaphyrin)；硝酸ガリウム；ガロシタピン(galocitabine)；ガニレリクス(ganirelix)；ゲラチナーゼ阻害薬；ゲムシタピン(gemcitabine)；グルタチオン阻害薬；ヘプスルファム(hepsulfam)；ヘレグリン(hereregulin)；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ハイペリシン(hypericin)；イバンドロン酸；イダルビシン(idarubicin)；イドキシフェン(idoxifene)；イドラマントン(idramantone)；イルモフォシン(ilmofosine)；イロマスタット(ilomastat)；イミダゾアクリドン類；イミキモド(imiquimod)；免疫刺激ペプチド類；インスリン様成長因子-1受容体阻害薬；インターフェロン作動薬；インターフェロン類；インターロイキン類；イオベングアン(iobenguane)；ヨードキシソルビシン(iododoxorubicin)；イポメアノール(ipomeanol),4-；イロプラクト(iroplact)；イルソグラジン(irsogladine)；イソベンガゾール(isobengazole)；イソホモハリコンドリン(isohomohalicondrin)B；イタセトロン(itasetron)；ジャスブラキノリド(jasplakinolide)；カハラリド(kahalalide)F；3酢酸ラメラリン(lamellarin)-N；ランレオチド(lanreotide)；レイナマイシン(leinamycin)；レノグラスチム(lenograstim)；硫酸レンチナン(lentinan)；レプトルスタチン(leptolstatin)；レトロゾール(letrozole)；白血病抑制因子；白血球アルファインターフェロン；ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン；ロイプロレリン(leuprorelin)；レバミソール(levamisole)；リアロゾール(liarozole)；線状ポリアミン類似体；親油性ジサッカライドペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド(lissoclinamide)7；ロバプラチン(lobaplatin)；ロンブリシン(lombricine)；ロメトレキソール(lometrexol)；ロニダミン(lonidamine)；ロソキサントロン(losoxantrone)；ロバスタチン(lovastatin)；ロキソリピン(loxoribine)；ルルトテカン(lurtotecan)；テキサフィリンルテチウム(lutetium texaphyrin)；リソフィリン(lysofylline)；溶解性ペプチド類；マイタンシン(maitansine)；マンノスタチン(mannostatin)A；マリマスタット(marimastat)；マソプロコル(masoprocol)；マスピン(maspin)；マトリリシン(matri lysin)阻害薬；マトリックスメンブタン阻害薬；メノガリル(menogaril)；メルバロン(merbarone)；メテレリン(meterelin)；メチオニナーゼ；メトクロプラミド(metoclopramide)；MIF阻害薬；ミフェプリストン(mifepristone)；ミルテホシン(miltefosine)；ミリモスチム(mirimostim)；ミスマッチ二本鎖RNA；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトラクトル(mitolactol)；マイトマイシン類似体；ミトナフィド(mitonafide)；マイトトキシシン線維芽成長因子-サポリン(saporin)；ミトキサントロン(mitoxantrone)；モファロテン(mofarotene)；モルグラモスチム(molgramostim)；モノクローナル抗体、ヒト絨毛ゴナドトロフィン；モノホスホリルリピドA+ミオバクテリウム細胞壁sk；モピダモル(mopidamol)；多重薬剤耐性遺伝子阻害薬；多発性腫瘍抑制因子1-に基づく薬剤；マスタード抗癌薬；マイカペルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン(myriaporone)；N-アセチルジナリン(acetyldinaline)；N-置換ベンズアミド類；ナファレリン(nafarelin)；ナグレスチップ(nagrestip)；ナロキソン(naloxone)+ペンタゾシン(pentazocine)；ナパビン(napavin)；ナフテルピン(naphterpin)；ナルトグラスチム(nartograstim)；ネダプラチン(nedaplatin)；ネモルビシン(nemorubicin)；ネリドロロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド(nilutamide)；ニサマイシン(nisamycin)；一酸化窒素モジュレーター；ニトロキシド抗酸化剤；ニトルリン(nitru lly n)；06-ベンジルグアニン；オクトレオチド(octreotide)；オキセノン(okicenone)；オリゴヌクレオチド類；オナプリストン(onapristone)；オndanセトロン(ondansetron)；オndanセトロン(ondansetron)；オラシン(oracin)；経口サイトカイン誘導薬；オルマプラチン(ormaplatin)；オサテロン(osaterone)；オキサリプラチン(oxal

10

20

30

40

50

iplatin) ; オキサウノマイシン(oxaunomycin) ; パクリタキセル(paclitaxel) ; パクリタキセル類似体 ; パクリタキセル誘導体類 ; パラウアミン(palauamine) ; パルミトイルリゾキシシン(palmitoylrhizoxin) ; パミドロン酸 ; パナキシトリオール ; パノミフェン(panomifene) ; パラバクチン(parabactin) ; パゼリプチン(pazelliptine) ; ペグアスパルガーゼ(pegaspargase) ; ペルデシン(peldesine) ; ポリ硫酸ペントサンナトリウム ; ペントスタチン(pentostatin) ; ペントゾール(pentozole) ; パーフルブロン(perflubron) ; パーホスファミド ; ペリリルアルコール ; フェナジノマイシン(phenazinomycin) ; 酢酸フェニル ; リン酸塩阻害薬 ; ピシバニル(picibanil) ; 塩酸ピロカルピン(pilocarpine) ; ピラルピシン(pirarubicin) ; ピリトレキシム(piritrexim) ; プラセチン(placetin)A ; プラセチンB ; プラスミノゲン活性化因子阻害薬 ; 白金複合体 ; 白金化合物 ; 白金-トリアミン複合体 ; ポルフィマー(porfimer)ナトリウム ; ポルフィロマイシン(porfiromycin) ; プレドニゾン(prednisone) ; プロビルビスアクリドン ; プロスタグランジンJ2 ; プロテアソーム阻害薬 ; タンパク質Aに基づく免疫モジュレーター ; タンパク質キナーゼC阻害薬 ; タンパク質キナーゼC阻害薬、ミクロアルガル(microalgal) ; タンパク質チロシンホスファターゼ阻害薬 ; プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害薬 ; プルプリン類 ; ピラゾロアクリジン ; ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート ; raf拮抗薬 ; ラルチトレキセド(raltitrexed) ; ラモセトロン(ramosetron) ; rasファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害薬 ; ras阻害薬 ; ras-GAP阻害薬 ; 脱メチル化レテリプチン(retelliptine) ; レニウムRe186エチドロナート ; リゾキシシン(rhizoxin) ; リボザイム類 ; RIIレチナミド(retinamide) ; ログレチミド(rogletimide) ; ロヒツキン(rohitukine) ; ロムルチド(romurtide) ; ロキニメクス(roquinimex) ; ルビギノン(rubiginone)BI ; ルボキシル(ruboxyl) ; サフィンゴル(safingol) ; サイントピン(saintopin) ; SarCNU ; サルコフィトル(sarcophytol)A ; サルグラモスチン(sargramostim) ; Sdi 1模倣体 ; セムスチン(semustine) ; セネセンス誘導阻害薬1 ; センスオリゴヌクレオチド類 ; シグナル導入阻害薬 ; シグナル導入モジュレーター ; 一本鎖抗原結合性タンパク質 ; シゾフィラン(sizofiran) ; ソブゾキサソ( sobuzoxane) ; ボロカプト酸ナトリウム ; フェニル酢酸ナトリウム ; ソルベロル(solverol) ; ソマトメジン結合性タンパク質 ; ソネルミン(sonermin) ; スパルホジン酸(sparfosic acid) ; スピカマイシンD ; スピロムスチン(spiromustine) ; スプレノペンチン(splenopentin) ; スポンギスタチン(spongistatin)1 ; スクアラミン ; 幹細胞阻害薬 ; 幹細胞分割阻害薬 ; スチピアミド(stipiamide) ; ストロメリシン(stromelysin)阻害薬 ; スルフィノシン(sulfinosine) ; 高作用性血管作用性腸内ペプチド拮抗薬 ; スラジスタ(suradista) ; スラミン(suramin) ; スウェインソニン(swainsonine) ; 合成グリコサミンオグリカン ; タリムスチン(tallimustine) ; タモキシフェンメチオジド(tamoxifen methiodide) ; タウロムスチン(tauromustine) ; タザロテン(tazarotene) ; 塩化テコガラン(tecogalan) ; テガフル(tegafur) ; テルラピリリウム(tellurapyrylium) ; テロメラゼ阻害薬 ; テモポルフィン(temoporphin) ; テモゾロミド(temozolomide) ; テニボシド(teniposide) ; テトラクロロデカオキシド ; テトラゾミン(tetrazomine) ; タリブラスチン(thaliblastine) ; チオコラリン(thiocoraline) ; トロンボポエチン ; トロンボポエチン模倣体 ; チマルファシン(thymalfasin) ; チモポエチン(thymopoietin)受容体作動薬 ; チモトリナン(thymotrinan) ; 甲状腺刺激ホルモン ; チエニルエチオブルプリン ; 2塩化チタノセン ; トプセンチン(topsentin) ; トレミフェン(toremifene) ; 全能性幹細胞因子 ; 翻訳阻害薬 ; トレチノイン(tretinoin) ; トリアセチルウリジン ; トリシリピン(triciribine) ; トリメトレキサート ; トリプトレリン(triptorelin) ; トロピセトロン(tropisetron) ; ツロステリド(turosteride) ; チロシンキナーゼ阻害薬 ; チルホスチン類 ; UBC阻害薬 ; ウベニメクス(ubenimex) ; 尿生殖洞由来成長抑制因子 ; ウロキナーゼ受容体拮抗薬 ; バブレオチド(vapreotide) ; バリオリン(variolin)B ; ベクターシステム、赤血球遺伝子治療薬 ; ベラレソル(velaresol) ; ベラミン(veramine) ; ベルジン類 ; ベルテポルフィン(verteporfin) ; ビノレルピン(vinorelbine) ; ビンキサルチン(vinxaltine) ; ビタキシシン(vitaxin) ; ボロゾール(vorozole) ; ザノテロン(zanoterone) ; ゼニプラチン(zeniplatin) ; ジラスコルブ(zilascorb) ; およびジノスタチンスチマラマー(zinostatin stimalamer)。好ましいその他の

10

20

30

40

50

抗癌薬は5-フルオロウラシルおよびロイコボリン(leucovorin)である。

【0272】

本発明の方法で使用することができる治療用抗体の例として、限定するわけではないが、以下が含まれる：ZENAPAXS(daclizumab)(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)(急性腎同種移植片拒絶反応の予防用の、免疫抑制性ヒト化抗CD25モノクローナル抗体)；PANOR EXTM(マウス抗17-IA細胞表面抗原IgG2a抗体)(Glaxo Wellcome/Centocor)；BEC2(マウス抗イディオタイプ(GD3エピトープ)IgG抗体)(ImClone System)；IMC-C225(キメラ抗EGFR IgG抗体)(Clone System)；VITAXBSFM(ヒト化抗 V 3インテグリン抗体)(Applied Molecular Evolution/MedImmune)；SmartM195(ヒト化抗CD33 IgG抗体)(Protein Design Lab/Kanebo)；LYMPHOCIDE<sup>TM</sup>(ヒト化抗CD22 IgG抗体)(Immunomedics)；ICM3(ヒト化抗ICAM3抗体(ICOS 10 Phann)；IDEC-114(霊長類化抗CD80抗体)(IDECPharm/Mitsubishi)；IDEC-131(ヒト化抗CD40L抗体)(IDEC/Eisai)；IDEC-151(霊長類化抗CD4抗体)(IDEC)；IDEC-152(霊長類化抗CD23抗体)(IDEC/Seikagaku)；SMART抗CD3(ヒト化抗CD3 IgG)(Protein Design Lab)；5G1.1(ヒト化抗補体因子5(C5)抗体)(Alexion Pharm)；D2E7(ヒト化抗TNF- 抗体)(CAT/BASF)；CDP 870(ヒト化抗TNF- Fab断片)(Celltech)；IDEC-151(霊長類化抗CD4 IgG1抗体)(IDECPharm/SmithKline Beecham)；MDX-CD4(ヒト抗CD4 IgG抗体)(Medarex/Eisai/Genmab)；CDP571(ヒト化抗TNF- IgG4抗体)(Celltech)；LDP-02(ヒト化抗 4 7抗体)(LeukoSite/Genentech)；OrthoClone OKT4A(ヒト化抗CD4 IgG抗体)(Ortho Biotech)；ANTOVA<sup>TM</sup>(ヒト化抗CD40L IgG抗体)(Biogen)；ANTEGREN<sup>TM</sup>(ヒト化抗 VLA-4 IgG抗体)(Elan)；およびCAT-152(ヒト 20 抗TGF- 抗体)(Cambridge Ab Tech)。本発明に従って使用することができる治療用抗体のその他の例を表6に示す。

【0273】

5.4.2 自己免疫疾患および炎症性疾患

いくつかの実施形態では、本発明の分子は、変異型Fc領域を含み、1以上の領域内に1以上のアミノ酸改変を有し、該改変は該変異型Fc領域の、Fc RIIBに対する親和性を増大させるが、該変異型Fc領域の、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する親和性を減少させる。そのような結合特性を有する本発明の分子は、例えば自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する免疫反応の阻害のような、免疫反応の制御において有用である。いかなる作用機構にもとらわれることを意図するものではないが、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する減少した親和性を有する本発明の分子は、Fc Rの活性化反応を鈍らせ、かつ細胞の反応性の阻害につながる可能性がある。 30

【0274】

いくつかの実施形態では、変異型Fc領域を含む本発明の分子は、免疫グロブリンではなく、少なくとも1つのアミノ酸改変を含み、該改変は、野生型Fc領域を含む分子と比較して、該変異型Fc領域の、Fc RIIBに対する親和性を増大させるものである。他の実施形態では、該分子はさらに1以上のアミノ酸改変を含み、該改変は活性化Fc Rへの当該分子の親和性を減少させるものである。いくつかの実施形態では、該分子は可溶性(すなわち、膜結合型でない)Fc領域である。本発明は、該可溶性Fc領域内の他のアミノ酸改変を意図するものであり、該改変は、本明細書中に記載されているような、当業者に公知のものを 40 含む、種々のFc受容体に対する該領域の親和性をモジュレートするものである。他の実施形態では、該分子(例えば、1以上のアミノ酸改変を含むFc領域)は、当業者に公知の技術を用いて、本明細書に記載されているように改変され、それにより、当該Fc領域のin vivoでの半減期が延びる。そのような分子は、自己免疫障害の治療および/または阻止において、治療上の有用性を有する。いかなる作用機構にもとらわれることを意図するものではないが、Fc RIIBに対する増大した親和性を有するそのような分子は、受容体の活性化を鈍らせ、従って免疫反応を鈍らせることにつながり、自己免疫障害の治療および/または予防において、治療上の有効性を有する。

【0275】

ある実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増大させ、一方で、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を減少させる1以上のアミノ酸改変は、以下の改変を 50

含む：246位でのトレオニンへの置換および396位でのヒスチジンへの置換；または268位でのアスパラギン酸への置換および318位でのアスパラギン酸への置換；または217位でのセリンへの置換、378位でのバリンへの置換、および408位でのアルギニンへの置換；または375位でのシステインへの置換および396位でのロイシンへの置換；または246位でのイソロイシンへの置換および334位でのアスパラギン酸への置換。1つの実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増大させ、一方で、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を減少させる1以上のアミノ酸改変は、247位でのロイシンへの置換を含む。他の実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増大させ、一方で、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を減少させる1以上のアミノ酸改変は、372位でのチロシンへの置換を含む。また別の実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増大させ、一方で、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を減少させる1以上のアミノ酸改変は、326位でのグルタミン酸への置換を含む。1つの実施形態では、変異型Fc領域のFc RIIBに対する親和性を増加させ、一方で、変異型Fc領域のFc RIIIAに対する親和性を減少させる1以上のアミノ酸改変は、224位でのロイシンへの置換を含む。

10

## 【0276】

野生型Fc領域を有する対応する分子に比べて、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する減少した親和性を有する変異型Fc領域は、自己免疫疾患または炎症性疾患を治療する、または予防するのに用いられてもよい。本発明は、被験体の、自己免疫障害または炎症性障害に関する1以上の症状を防ぐ、治療する、または管理する方法を提供し、該方法は、野生型Fc領域を有する対応する分子に比べて、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する減少した親和性を有する変異型Fc領域を含む本発明の1種以上の分子の、治療上、または予防上有効な量を、該被験体に投与することを含む。

20

## 【0277】

本発明はまた、被験体における、炎症性障害に関する1以上の症状を防ぐ、治療する、または管理する方法を提供し、該方法は、1以上の抗炎症薬の、治療上、または予防上有効な量を該被験体に投与することをさらに含む。本発明はまた、自己免疫疾患に関する1以上の症状を防ぐ、治療する、または管理する方法を提供し、該方法は、1以上の免疫調節薬の、治療上、または予防上有効な量を該被験体に投与することをさらに含む。セクション5.4.2.1は、抗炎症薬および免疫調節薬の限定されるものでない例を掲げる。

30

## 【0278】

本発明の分子を投与することにより治療できる自己免疫障害の例は、限定されるものではないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫卵巣炎および睾丸炎、自己免疫血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎（celiac sprue-dermatitis）、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャージ-ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、円板状狼瘡、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギャン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、紅斑性狼瘡、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、I型または免疫を介する糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、疱疹状皮膚炎脈管炎のような血管炎、白斑、およびヴェーグナー肉芽腫症を含む。炎症性障害の例は、限定されるものではないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー障害、敗血症ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性的なウイルスまたは細菌感染から生じ

40

50

る慢性炎症を含む。本明細書のセクション2.2.2に記載の通り、いくつかの自己免疫障害は炎症性症状と関連している。このように、自己免疫障害と考えられる障害と炎症性障害の間には重複がある。従って、いくつかの自己免疫障害は炎症性障害としても特徴付けられる。本発明の方法によって予防、治療または管理することができる炎症性障害の例としては、限定されるものでないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー障害、敗血症ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性的なウイルスまたは細菌感染から生じる慢性炎症が挙げられる。

【0279】

野生型Fc領域を有する対応する分子に比べて、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAに対する減少した親和性を有する変異型Fc領域を含む本発明の分子はまた、炎症性障害の動物、特に哺乳動物が感じる炎症を軽減することも可能である。特定の実施形態では、本発明の分子は動物の炎症を、前記分子を投与されてない動物の炎症と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%軽減する。

10

【0280】

野生型Fc領域を有する対応する分子に比べて、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAに対する減少した親和性を有する変異型Fc領域を含む本発明の分子はまた、移植組織の拒絶を防ぐために用いることもできる。

20

【0281】

本発明は、自己免疫疾患または炎症性疾患の治療および/または予防用の当技術分野において公知のあらゆる抗体の操作をさらに意図するものであり、それにより該抗体が、野生型Fc領域を有する対応する分子に比べて、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAに対する減少した親和性を有することが本発明の方法により示されている1以上のアミノ酸改変を含む変異型Fc領域を含むようにする。本発明に従って操作を加えることができる、炎症性障害を治療または予防するために使用される抗体の限定されるものでない例を表7Aに掲げ、自己免疫障害を治療または予防するために使用される抗体の限定されるものでない例を表7Bに掲げる。

30

【表 7 A】

本発明に従って用いることができる炎症性疾患および自己免疫疾患用の抗体

抗体名	標的抗原	産物型	アイソタイプ	スポンサー	適応症
5G1.1	補体(C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	関節リウマチ
5G1.1	補体(C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	補体(C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	腎炎
5G1.1-SC	補体(C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	心肺バイパス
5G1.1-SC	補体(C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	心筋梗塞
5G1.1-SC	補体(C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	血管形成術
ABX-CBL	CBL	ヒト		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	マウス	IgG	Abgenix Inc	同種移植拒絶反応
ABX-IL8	IL-8	ヒト	IgG2	Abgenix Inc	乾癬
アンテグレン	VLA-4	ヒト化	IgG	Athena/Elan	多発性硬化症
抗 CD11a	CD11a	ヒト化	IgG1	Genentech Inc/ Xoma	乾癬
抗 CD18	CD18	ヒト化	Fab' 2	Genentech Inc	心筋梗塞
抗 LFA1	CD18	マウス	Fab' 2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	同種移植拒絶反応
Antova	CD40L	ヒト化	IgG	Biogen	同種移植拒絶反応
Antova	CD40L	ヒト化	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	ラット	IgG	Medimmune Inc	GvHD、乾癬
CDP571	TNF $\alpha$	ヒト化	IgG4	Celltech	クローン病
CDP571	TNF $\alpha$	ヒト化	IgG4	Celltech	関節リウマチ
CDP850	E-セレクトイン	ヒト化		Celltech	乾癬
Corsevin M	Fact VII	キメラ		Centocor	抗凝固薬
D2E7	TNF $\alpha$	ヒト		CAT/BASF	関節リウマチ
Hu23F2G	CD11/18	ヒト化		ICOS Pharm Inc	多発性硬化症
Hu23F2G	CD11/18	ヒト化	IgG	ICOS Pharm Inc	卒中
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	中毒性ショック
ICM3	ICAM-3	ヒト化		ICOS Pharm Inc	乾癬
IDEC-114	CD80	霊長類化		IDEC Pharm/Mitsubishi	乾癬
IDEC-131	CD40L	ヒト化		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	ヒト化		IDEC Pharm/Eisai	多発性硬化症
IDEC-151	CD4	霊長類化	IgG1	IDEC Pharm/ Glaxo SmithKline	関節リウマチ
IDEC-152	CD23	霊長類化		IDEC Pharm	喘息/アレルギー
インフリキシマブ	TNF $\alpha$	キメラ	IgG1	Centocor	関節リウマチ
インフリキシマブ	TNF $\alpha$	キメラ	IgG1	Centocor	クローン病
LDP-01	$\beta$ 2-インテグリン	ヒト化	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	卒中
LDP-01	$\beta$ 2-インテグリン	ヒト化	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	同種移植拒絶反応
LDP-02	$\alpha$ 4 $\beta$ 7	ヒト化		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	潰瘍性大腸炎
MAK-195F	TNF $\alpha$	マウス	Fab' 2	Knoll Pharm, BASF	中毒性ショック
MDX-33	CD64(FcR)	ヒト		Medarex/Centeon	自己免疫性血液系疾患
MDX-CD4	CD4	ヒト	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	関節リウマチ
MEDI-507	CD2	ヒト化		Medimmune Inc	乾癬
MEDI-507	CD2	ヒト化		Medimmune Inc	GvHD

10

20

30

40

抗体名	標的抗原	産物型	アイソタイプ	スポンサー	適応症
OKT4A	CD4	ヒト化	IgG	Ortho Biotech	同種移植拒絶反応
オルソクロ ーン OKT4A	CD4	ヒト化	IgG	Ortho Biotech	自己免疫疾患
オルソクロ ーン/抗 CD3 OKT3	CD3	マウス	mIgG2a	Ortho Biotech	同種移植拒絶反応
RepPro/ア ブシキシマ ブ	gbIIbIIIa	キメラ	Fab	Centocor/Lilly	冠動脈血管形成 術の合併症
rhuMab-E25	IgE	ヒト化	IgG1	Genentech/ Novartis/Tanox Biosystems	喘息/アレルギー
SB-240563	IL5	ヒト化		GlaxoSmithKline	喘息/アレルギー
SB-240683	IL-4	ヒト化		GlaxoSmithKline	喘息/アレルギー
SCH55700	IL-5	ヒト化		Celltech/Scherin g	喘息/アレルギー
シムレクト	CD25	キメラ	IgG1	Novartis Pharm <sup>a</sup>	同種移植拒絶反応
SMART a-CD3	CD3	ヒト化		Protein Design Lab	自己免疫疾患
SMART a-CD3	CD3	ヒト化		Protein Design Lab	同種移植拒絶反応
SMART a-CD3	CD3	ヒト化	IgG	Protein Design Lab	乾癬
ゼナパック ス	CD25	ヒト化	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	同種移植拒絶反応

10

20

【表 7 B】

本発明に従って用いることができる自己免疫障害用の抗体

抗体	適応症	標的抗原
ABX-RB2		T 細胞、B 細胞および NK 細胞上の CBL 抗原に対する抗体 異種マウスに由来する完全ヒト抗体
5c8(抗 CD-40 リガンド抗体)	フェーズ II 試験を 99 年 10 月に中止した '有害事象'を調査	CD-40
IDEC131	全身性エリテマトーデス (SLE)	抗 CD-40 ヒト化
IDEC151	関節リウマチ	霊長類化；抗 CD4
IDEC152	喘息	霊長類化；抗 CD23
IDEC114	乾癬	霊長類化；抗 CD80
MEDI-507	関節リウマチ；多発性硬化症 クローン病 乾癬	抗 CD2
LDP-02(抗 b7 mAb)	炎症性腸疾患 クローン病 潰瘍性大腸炎	白血球上の a4b7 インテグリン受容体
SMART 抗 $\gamma$ インターフェロン抗体	自己免疫疾患	抗 $\gamma$ インターフェロン
Verteportin	関節リウマチ	
MDX-33	自己免疫反応によって生じる血液障害 特発性血小板減少性紫斑病 (TTP) 自己免疫溶血性貧血	FcRI 受容体に対するモノクローナル抗体
MDX-CD4	関節リウマチおよび他の自己免疫を治療する	CD4 受容体分子に対するモノクローナル抗体
VX-497	自己免疫疾患 多発性硬化症 関節リウマチ 炎症性腸疾患 狼瘡 乾癬	イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ(新規の RNA および DNA をつくるのに必要な酵素、ヌクレオチド産生において用いられる、リンパ球増殖に必要な)の阻害剤
VX-740	関節リウマチ	ICE インターロイキン-1 $\beta$ (変換酵素、攻撃性免疫反応につながる経路を調節する)の阻害剤
VX-745	炎症に特異的免疫反応の化学シグナル伝達に関わる 炎症の開始と進行	P38MAP キナーゼ(ミトジェン活性化タンパク質キナーゼ)の阻害剤
エンブレル(エタネルセプト)		TNF(腫瘍壊死因子)を標的とする
IL-8		IL-8(インターロイキン 8)に対する完全ヒトモノクローナル抗体
Apogen MP4		組換え抗原 疾患に関連した T 細胞を選択的に破壊する アポトーシスを引き起こす T 細胞はプログラムされた細胞死によって排除され、身体自身の細胞を攻撃しない 特定の apogen は特定の T 細胞を標的とする

#### 5.4.2.1 免疫調節薬と抗炎症薬

本発明は、自己免疫疾患および炎症性疾患に対する治療法を提供し、該方法は、Fc RIIBに対する増大した親和性および、Fc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する減少した親和性を有する変異型Fc領域を持つ分子を、他の治療薬と併せて投与することを含む。免疫応答調節薬の例は、限定されるものでないが、メトトレキサート、エンブレル(ENBREL)、レミケード(REMICADE™)、レフルノミド、シクロホスファミド、シクロスポリンA、およびマクロライド抗生物質(例えば、FK506(タクロリムス))、メチルプレドニゾン(MP)、副腎皮質ステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン(シロリムス)、ミゾリピン、デオキシスベルグアリン(deoxyspergualin)、ブレキナル(brequinar)、マロノニトリルアミド(例えば、レフルノマイド)、T細胞受容体モジュレーター、およびサイトカイン受容体モジュレーターを含む。

10

##### 【0283】

抗炎症薬は、炎症性および自己免疫障害の治療に成功をおさめており、現在、このような障害のための共通かつ標準の治療薬となっている。当業者に周知のいずれの抗炎症薬を本発明の方法に使用してもよい。抗炎症薬の限定されるものでない例は、非ステロイド抗炎症薬(NSAID)、ステロイド抗炎症薬、作動薬、抗コリン作動薬、およびメチルキサンチンを含む。NSAIDの例は、限定されるものでないが、アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ(CELEBREX™)、ジクロフェナク(VOLTAREN™)、エトドラク(LODINE™)、フェノプロフェン(NALFON™)、インドメタシン(INDOCIN™)、ケトロラク(TORADOL™)、オキサプロジン(DAYPRO™)、ナブメトン(RELAFEN™)、スリンダク(CLINORIL™)、トルメチン(TOLECTIN™)、ロフェコキシブ(VIOXX™)、ナプロキセン(ALEVE™)、NAPROSYN™)、ケトプロフェン(ACTRON™)およびナブメトン(RELAFEN™)を含む。このようなNSAIDはシクロオキシゲナーゼ酵素(例えば、COX-1および/またはCOX-2)を阻害することにより機能する。ステロイド抗炎症薬の例は、限定されるものでないが、グルココルチコイド、デキサメタゾン(DECADRON™)、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン(DELTASONE™)、プレドニゾン、トリアムシノロン、アザルフィジン、およびエイコサノイド、例えばプロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエンを含む。

20

##### 【0284】

#### 5.4.3 感染症

本発明はまた、被験体における感染症の治療または予防の方法を包含し、該方法は、本発明の1種以上の分子を、治療上または予防上有効な量、投与することを含む。本発明の分子によって治療または予防しうる感染症は、これに限定されるものではないが、ウイルス、細菌、真菌、原虫、およびウイルスを含む感染因子により引き起こされる。

30

##### 【0285】

本発明の方法に関連して、本発明の分子を用いて治療または予防しうるウイルス性疾患は、限定されるものでないが、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス(HSV-I)、II型単純ヘルペスウイルス(HSV-II)、牛痘ウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス(echinovirus)、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、天然痘ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、I型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-I)、II型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-II)、および髄膜炎、脳炎、デング熱または天然痘のようなウイルス性疾患の因子により引き起こされるものを含む。

40

##### 【0286】

本発明の方法に関連して、本発明の分子を用いて治療または予防しうる細菌性疾患は、限定されるものでないが、マイコバクテリア、リケッチア、マイコプラズマ、ナイセリア、肺炎球菌(S. pneumonia)、ライム病ボレリア(Borrelia burgdorferi)(ライム病)、炭疽菌(炭疽病)、破傷風菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、マイコバク

50

テリウム、破傷風菌、百日咳菌、コレラ菌、ペスト菌、ジフテリア菌、クラミジア、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）およびレジオネラ菌を含む細菌により引き起こされるものを含む。

【0287】

本発明の方法に関連して、本発明の分子を用いて治療または予防しうる原虫性疾患は、限定されるものでないが、リーシュマニア、*kokzidioa*、トリパノソーマまたはマラリア原虫を含む原虫により引き起こされる。

【0288】

本発明の方法に関連して、本発明の分子を用いて治療または予防しうる寄生虫性疾患は、限定されるものでないが、クラミジアおよびリケッチアを含む寄生虫により引き起こされる。

10

【0289】

本発明の1つの態様によれば、変異型Fc領域を有する本発明の分子は、野生型Fc領域を含む対応する分子と比べて、例えば病原性タンパク質のような感染因子に対する増強された抗体エフェクター機能を有する。具体的な実施形態では、本発明の分子は、感染症を引き起こす感染因子の貪食および/またはオプソニン作用を増強することで、感染症の治療効力を高める。他の具体的な実施形態では、本発明の分子は、感染症を引き起こす感染された細胞のADCCを増強することで、感染症の治療効力を高める。

【0290】

いくつかの実施形態では、本発明の分子は、感染症の治療および/または予防のために、当業者に公知の1種以上のさらなる治療薬の治療上または予防上有効な量と組み合わせることで投与してもよい。本発明は、感染症の治療および/または予防のための、当業者に公知の抗生物質と組み合わせた本発明の分子の使用を意図する。本発明の分子と組み合わせることができる抗生物質は、限定されるものでないが、マクロライド（例えばトブラマイシン（Tobi<sup>TM</sup>）、セファロスポリン（例えばセファレキシン（ケフレックス<sup>TM</sup>）、セフラジン（Velocef<sup>TM</sup>）、セフロキシム（セフチン<sup>TM</sup>）、セフプロジル（セフジル<sup>TM</sup>）、セファクロール（Ceclor<sup>TM</sup>）、セフィキシム（Suprax<sup>TM</sup>）またはセファドロキシル（Duricef<sup>TM</sup>）、クラリスロマイシン（例えばクラリスロマイシン（パイアキシン<sup>TM</sup>）、エリスロマイシン（例えばエリスロマイシン（EMycin<sup>TM</sup>）、ペニシリン（例えば、ペニシリンV（V-Cillin K<sup>TM</sup>またはPen Vee K<sup>TM</sup>））またはキノロン（例えばオフロキサシン（フロキシシン<sup>TM</sup>）、シプロフロキサシン（Cipro<sup>TM</sup>）またはノルフロキサシン（Noroxin<sup>TM</sup>）、アミノ配糖体系抗生物質（例えばアプラマイシン、アルベカシン、バンパーマイシン（bambermycin）、ブチロシン、ジベカシン、ネオマイシン、ネオマイシン、ウンデシレネート、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、およびスペクチノマイシン）、アンフェニコール（amphenicol）系抗生物質（例えばアジダムフェニコール（azidamphenicol）、クロラムフェニコール、フロルフェニコール、およびチアンフェニコール）、アンサマイシン系抗生物質（例えばリファマイド（riphamide）およびリファンピン）、カルバセフェム系（例えばロラカルベフ）、カルバペネム系（例えばピアペネムおよびイミペネム）、セファロスポリン系（例えばセファクロール、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン（cefazedone）、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、およびセフピロム）、セファマイシン系（例えばセフペラゾン、セフメタゾール、およびセフミノクス）、モノバクタム系（例えばアズトレオナム、カルモナム、およびチゲモナム（tigemonam））、オキサセフェム系（例えばフロモキセフ、およびモキサラクタム）、ペニシリン系（例えばアムジノシリン（amdinocillin）、アムジノシリンピボキシル（amdinocillin pivoxil）、パカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン、フェンペニシリン、フロキサシリン、ペナムシリン、ペネタメートヒドリオダイド（penethamate hydriodide）、ペニシリンo-ベネタミン、ペニシリン0、ペニシリンV、ペニシリンVベンザチン、ペニシリンVヒドラバミン（penicillin V hydrabamine）、ペニメピシクリン（penimepicycline）、およびフェンシヒシリン（phencihicillin）カリウム）、リンコサミド系（例えばク

20

30

40

50

リンダマイシン、およびリンコマイシン)、アンフォマイシン、バシトラシン、カプレオマイシン、コリスチン、エンジュラシジン、エンピオマイシン、テトラサイクリン系(例えばアピサイクリン(apicycline)、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、およびデメクロサイクリン)、2,4-ジアミノピリミジン系(例えばブロジモプリム(brodinoprim))ニトロフラン系(例えばフラルタドン、および塩化フラゾリウム(furazolium chloride))、キノロンおよびその類似体(例えばシノキサシン、クリナフロキサシン、フルメキン、およびグレパグロキサシン(grepagloxacin))、スルホンアミド系(例えばアセチルスルファメトキシピラジン、ベンジルスルファアミド、ノプリルスルファアミド、フタリルスルファセトアミド、スルファクリソイジン(sulfachrysoidine)、およびスルファシチン(sulfacytine))、スルホン系(例えばジアチモスルホン(diathymosulfone)、グルコスルホンナトリウム、およびソラスルホン(solasulfone))、シクロセリン、ムピロシンおよびチュベリン(tuberin)を含む。

10

#### 【0291】

ある実施形態では、本発明の分子は、治療上または予防上有効な量の1種以上の抗真菌剤と組み合わせて投与することができる。本発明の分子と組み合わせて用いることができる抗真菌剤は、これに限定されるものでないが、アンフォテリシンB、イトラコナゾール、ケトコナゾール、フルコナゾール、イントラセカル(intrathecal)、フルシトシン、ミコナゾール、ブトコナゾール、クロトリマゾール、ニスタチン、テルコナゾール、チオコナゾール、シクロピロクス、エコナゾール、ハロプログリン(haloprogrin)、ナフチフィン、テルビナフィン、ウンデシレネート、およびグリセオフルピンを含む。

20

#### 【0292】

いくつかの実施形態では、本発明の分子は、治療上または予防上有効な量の1種以上の抗ウイルス薬と組み合わせて投与することができる。本発明の分子と組み合わせて用いることができる有効な抗ウイルス薬は、限定されるものでないが、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤およびヌクレオシド類似体である。抗ウイルス薬の例は、限定されるものでないが、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ピダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン、およびリバビリン、同様にホスカルネット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、アンプレナビル、ロピナビル、リトナビル、インターフェロン；アデフォビル、クレバジン(clevadine)、エンテカビル、プレコナリルを含む。

30

#### 【0293】

### 5.5 ワクチン療法

本発明は、本発明の組成物を用いて、抗原性または免疫原性物質に対する免疫応答を誘発することをさらに包含し、該物質は、限定されるものでないが、癌抗原および感染症抗原(これらの例は後述する)を含む。本発明のワクチン組成物は、それに対する免疫応答が希望されるような1以上の抗原性または免疫原性物質を含み、該1以上の抗原性または免疫原性物質は、Fc RIIIAに対する増大した親和性を有する本発明の変異型抗体によりコーティングされている。特定の作用機構にとらわれることを意図するものではないが、Fc RIIIAに対する増大した親和性を有する本発明の変異型抗体による抗原性または免疫原性物質のコーティングは、体液性の、または細胞を介した反応を引き起こすことにより、目的の抗原性または免疫原性物質に対する免疫反応を増強する。本発明のワクチン組成物は、抗原性または免疫原性物質に対する免疫応答、好ましくは防御性免疫応答を引き起こすのに特に有効である。

40

#### 【0294】

いくつかの実施形態では、本発明のワクチン組成物における抗原性または免疫原性物質は、それに対する免疫応答が望まれるようなウイルスを含む。該ウイルスは組換え体またはキメラでもよく、好ましくは弱毒化されている。組換え体、キメラ、および弱毒化ウイルスの産生は、当業者に公知の標準的な手法を用いて行われうる。本発明は、本発明に従って設計されるべき生組み換えウイルスワクチンまたは不活化組換えウイルスワクチンを包含する。生ワクチンが好ましく、なぜなら宿主内での複製が、自然な感染において起こ

50

るのと同種かつ同程度の持続的な刺激をもたらし、従って十分な、長期的な免疫を付与するためである。そのような生組換えウイルスワクチン製剤の生産は、細胞培養またはニワトリ胚尿嚢中でのウイルス増殖と、それに続く精製を含む従来の方法を用いて実現しうる。

【0295】

具体的な実施形態では、組換えウイルスは、それが投与される被験体に対して非病原性である。これに関して、ワクチン用途での遺伝的に操作されたウイルスの使用は、これらのウイルス種における弱毒化特性の存在を必要とする。トランスフェクションに用いる鋳型に対する適当な変異（例えば欠失）の導入は、弱毒化特性を有する新規のウイルスを提供しうる。例えば、温度感受性または寒冷適応に関する特定のミスセンス変異を、欠失変異中に導入することができる。これらの変異は、寒冷または温度感受性変異体に関連する点突然変異よりも安定であるはずであり、復帰変異の頻度が極めて低いはずである。組換えウイルスを作製するための組換えDNA技術は、当業者に公知であり、本発明に包含される。例えば、負鎖RNAウイルスの改変のための技術が当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,166,057号を参照されたい（その全文を参照により本明細書に組み入れられる）。

10

【0296】

代わりに、「自殺」特性を有するキメラワクチンが、本発明の皮内ワクチン製剤における使用のために構築されうる。そのようなウイルスは、宿主内でわずかに1~数回の複製しか行うことがない。ワクチンとして用いたときには、該組換えウイルスは限られた複製サイクルを行い、免疫応答には十分なレベルを誘発するが、ヒト宿主中で行き過ぎて病気を引き起こすことはない。一方で、不活化（死滅）ウイルスを本発明に従って製剤化することができる。不活化ワクチン製剤は、キメラウイルスを「死滅させる」従来の方法を用いて調製することが可能である。不活化ワクチンは、その感染性が破壊されているという意味で「死んで」いる。理想的には、ウイルスの感染性は、免疫原性を損なうことなく破壊されている。不活化ワクチンを調製するために、キメラウイルスは細胞培養もしくはニワトリ胚尿嚢中で生育され、ゾーン超遠心により精製され、ホルムアミドもしくは -プロピオラクトンにより不活化され、そしてプールされる。

20

【0297】

ある実施形態では、完全に外来性のエピトープ（他のウイルス性または非ウイルス性病原体に由来する抗原を含む）が本発明の皮内ワクチン製剤における使用のためのウイルスに組み込まれうる。例えば、例えばHIV（gp160、gp120、gp41）のような非関連ウイルスの抗原、寄生虫抗原（例えばマラリア）、細菌もしくは真菌抗原または腫瘍抗原を、弱毒化したウイルス種内に組み込むことができる。

30

【0298】

ほとんどあらゆる異種起源の遺伝子配列が、皮内ワクチン製剤での使用するための本発明のキメラウイルスに組み込まれうる。好ましくは、異種起源の遺伝子配列は、生物学的反応の修飾因子として働きうる部分またはペプチドである。好ましくは、あらゆる種類の病原体に対する防御性免疫反応を引き起こすエピトープ、または中和抗体に結合する抗原が、キメラウイルスによって、またはその一部として発現される。例えば、本発明のキメラウイルスに組み込むことができる異種起源の遺伝子配列は、限定されるものでないが、インフルエンザおよびパラインフルエンザの血球凝集素、ノイラミニダーゼおよび融合糖タンパク質（例えばヒトPIV3のHNおよびF遺伝子）を含む。また別の実施形態では、キメラウイルスに組み込むことができる異種起源の遺伝子配列は、免疫修飾活性を有するコードタンパク質を含む。免疫修飾タンパク質の例は、限定されるものでないが、サイトカイン、I型インターフェロン、インターフェロン、コロニー刺激因子、インターロイキン-1、-2、-4、-5、-6、-12、およびこれらの物質のアンタゴニストを含む。

40

【0299】

また別の実施形態では、本発明は変異型抗体をその表面に発現する病原細胞またはウイルス、好ましくは弱毒化ウイルスを包含する。

50

## 【0300】

代わりの実施形態では、本発明のワクチン組成物は、抗原性または免疫原性物質がFc RIIIAに対する増大した親和性を有する本発明の変異型抗体と機能しうる形で連結されている融合ポリペプチドを含む。本発明のワクチン組成物における使用のための融合ポリペプチドの作製は、慣例的な組換えDNA技術の方法を用いて行われるものであり、通常の技能の範囲内である。

## 【0301】

本発明は、本発明の組成物を投与することにより、被験体中での耐性を誘発する方法をさらに包含する。好ましくは、被験体中での耐性を誘発するのに好適な組成物は、本発明の変異型抗体によってコーティングされた抗原性または免疫原性物質を含み、該変異型抗体はFc RIIIBに対してより高い親和性を有するものである。特定の作用機構にとらわれることを意図するものではないが、そのような組成物はFc RIIIBを介した阻害経路を活性化することにより、耐性を誘発するのに有効である。

10

## 【0302】

## 5.6 組成物および投与の方法

本発明は、変異型Fc領域を含む本発明の分子（すなわち抗体、ポリペプチド）を含む方法および医薬組成物を提供する。本発明はまた、疾患、障害または感染に関連する1以上の症状を治療、予防、および改善する方法であって、被験体に有効な量の本発明の融合タンパク質もしくは複合分子、または本発明の融合タンパク質もしくは複合分子を含む医薬組成物を投与することによる上記方法も提供する。好ましい態様では、抗体、融合タンパク質、または複合分子は、実質的に精製されている（すなわち、その効果を限定するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。具体的な実施形態では、被験体は動物、好ましくは哺乳類動物、例えば非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）および霊長類（例えば、サル、例えばカニクイザルおよびヒト）である。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。また別の好ましい実施形態では、本発明の抗体は被験体と同じ種に由来するものである。

20

## 【0303】

様々な送達系が公知であり、変異型Fc領域を含む本発明の分子（すなわち抗体、ポリペプチド）を含む組成物を投与するために利用することができ、例えばリポソーム、微粒子、マイクロカプセル中の封入、抗体または融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体を介するエンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などがある。本発明の分子を投与する方法は、限定されるものでないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外、および粘膜（例えば、鼻腔内および口腔経路）を含む。具体的な実施形態では、本発明の分子を筋肉内、静脈内、または皮下に投与する。組成物をいずれの都合のよい経路により、例えば、注入またはボラス注射により、上皮または皮膚粘膜上皮（例えば、口腔粘膜、直腸および腸管粘膜など）を介する吸収により投与してもよく、かつ他の生物学的活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身に対してでもまたは局所に対してであってもよい。さらに、例えば、吸入器または噴霧器の使用により、およびエアロゾル化剤を用いる製剤化により肺投与を採用することもできる。例えば、米国特許第6,019,968；5,985,320；5,985,309；5,934,272；5,874,064；5,855,913；5,290,540；および4,880,078号；ならびにPCT公開WO 92/19244；WO 97/32572；WO 97/44013；WO 98/31346；およびWO 99/66903を参照（これらそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れる）。

30

40

## 【0304】

本発明はまた、変異型Fc領域を含む本発明の分子（すなわち抗体、ポリペプチド）を、密閉容器、例えば、アンプルまたは小袋中にパッケージし、抗体の量を表示して提供する。一実施形態では、本発明の抗体を、乾燥した無菌凍結乾燥粉末または無水濃縮物として密閉容器に入れて供給し、そして例えば水または生理食塩水を用いて被験体に投与するために適当な濃度に再構築してもよい。好ましくは、本発明の分子を、乾燥した無菌凍結乾

50

燥粉末または無水濃縮物として密閉容器に入れて少なくとも5mg、さらに好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位用量にて供給する。凍結乾燥した本発明の分子はその元来の容器中で2~8の間で貯蔵しなければならない。かつ該分子は、再構築後12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内、または1時間以内に投与しなければならない。代替りの実施形態では、本発明の分子を、液剤形で、密閉容器に入れて、分子、融合タンパク質、または複合分子の量および濃度を表示して供給する。好ましくは、本発明の分子の液剤形を、密閉容器に入れて、少なくとも1mg/ml、さらに好ましくは少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも100mg/ml、少なくとも10 50mg/ml、少なくとも200mg/mlにて供給する。

#### 【0305】

障害に関連する1以上の症状の治療、予防または改善するために有効でありうる本発明の組成物の量は、標準的な臨床技術により決定することができる。製剤化において用いるべき正確な用量はまた、投与経路、および病状の重篤度にも依存しうるものであり、医師の判断およびそれぞれの患者の環境によって決定しなければならない。有効な用量を *in vitro* または動物モデル試験系から誘導した用量-応答曲線から推定することができる。

#### 【0306】

本発明に包含される抗体について患者に投与される投与量は、典型的には、0.0001mg/kg ~ 100mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される用量は、0.0001mg/kg ~ 20mg/kg、0.0001mg/kg ~ 10mg/kg、0.0001mg/kg ~ 5mg/kg、0.0001 ~ 2mg/kg、0.0001 ~ 1mg/kg、0.0001mg/kg ~ 0.75mg/kg、0.0001mg/kg ~ 0.5mg/kg、0.0001mg/kg ~ 0.25mg/kg、0.0001 ~ 0.15mg/kg、0.0001 ~ 0.10mg/kg、0.001 ~ 0.5mg/kg、0.01 ~ 0.25mg/kgまたは0.01 ~ 0.10mg/kg患者体重である。一般的に、外来ポリペプチドに対する免疫応答のために、ヒト抗体はヒト体内において他種由来の抗体より長い半減期を有する。従って、ヒト抗体は投与量の低減および投与頻度の低減がしばしば可能である。さらに、例えば、脂質化などの修飾により抗体の取込みおよび組織浸透を増強することにより、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与の量と頻度を低減することができる。

#### 【0307】

一実施形態では、患者に投与される本発明の分子の投与量は、単一薬治療として用いるとき、0.01mg ~ 1000mg/日である。他の実施形態では、本発明の分子を他の治療組成物と一緒に用い、患者に投与される投与量は上記分子を単一薬治療法として用いるときより低い。

#### 【0308】

具体的な実施形態では、本発明の医薬組成物を治療の必要な領域に局所投与することが所望されうる；これは、例えば、限定されるものでないが、局所注入により、注射により、またはシラスチック (sialastic) メンブランなどのメンブランまたは繊維を含む多孔質、非孔質、またはゼラチン状材料からなる移植片を用いて達成することができる。好ましくは、本発明の分子を投与するとき、該分子を吸収しない材料を使うように注意しなければならない。

#### 【0309】

他の実施形態では、組成物を小胞、特にリポソームに入れて送達することができる (Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treatら, in 「感染症と癌の治療法におけるリポソーム (Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」, Lopez-Berestein and Fidler (編), Liss, New York, pp.353-365 (1989); Lopez-Berestein, 前掲, pp.3 17-327 を参照；一般的には前掲を参照)。

#### 【0310】

さらに他の実施形態では、組成物を制御放出または持続放出系で送達することができる。本発明の1以上の分子を含む持続放出製剤を作るために、当業者に公知のいずれの技術を用いてもよい。例えば、米国特許第4,526,938号；PCT公開WO 91/05548；PCT公開WO 96/ 50

20698 ; Ningら, 1996, 「持続放出ゲルを用いたヒト大腸癌異種移植片の腫瘍内放射免疫治療 (Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)」 *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Songら, 1995, 「長循環エマルジョンの抗体を介する肺ターゲティング (Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)」 *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397 ; Cleekら, 1997, 「心血管応用のためのbFGF抗体に対する生物分解性ポリマー担体 (Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)」 *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854 ; およびLamら, 1997, 「局所送達のための、組換えヒト化モノクローナル抗体のマイクロカプセル化 (Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)」 *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照、これらはそれぞれ参照により本明細書にその全文が組み入れられる。一実施形態では、ポンプを制御放出系に用いる (Langer, 前掲 ; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20 ; Buchwaldら, 1980, *Surgery* 88:507 ; およびSaudekら, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574を参照)。他の実施形態では、ポリマー材料を用いて抗体の制御放出を達成することができる (例えば「制御放出の医療応用 (Medical Applications of Controlled Release)」, LangerおよびWise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) ; 「制御放出薬生物学的活性、医薬品設計と性能 (Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)」, Smolen およびBall (編), Wiley, New York (1984) ; RangerおよびPeppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 ; (またLevyら, 1985, *Science* 228:190 ; Duringら, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351 ; Howardら, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105も参照) ; 米国特許第5,679,377号 ; 米国特許第5,916,597号 ; 米国特許第5,912,015号 ; 米国特許第5,989,463号 ; 米国特許第5,128,326号 ; PCT公開WO 99/15154 ; およびPCT公開WO 99/20253を参照)。持続放出製剤に使用されるポリマーの例としては、限定されるものでないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド (PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられる。さらに他の実施形態では、制御放出系を治療標的 (例えば、肺) の近位に配置して、その結果、全身用量の一部分しか必要としないようにすることができる (例えば、Godson, in 「制御放出の医療応用 (Medical Applications of Controlled Release)」, 前掲, vol. 2, pp.115-138 (1984)を参照)。他の実施形態では、制御放出移植片として有用なポリマー組成物が、Dunnら (米国特許第5,945,155を参照) に従い用いられる。この特定の方法は、ポリマー系からの生物活性物質のin situ制御放出の治療効果に基づく。移植は一般的に、治療処置を必要とする患者体内のいずれの場所において行われてもよい。他の実施形態では非ポリマー持続送達系を使用し、この場合、被験体体内の非ポリマー移植片を薬物送達系として利用する。体内に移植すると、移植片の有機溶媒は周囲組織液中に散逸、分散または浸出して非ポリマー材料が徐々に凝集または沈降し、固体のマイクロ多孔質マトリックスを形成する (米国特許第5,888,533号を参照)。

#### 【 0 3 1 1 】

制御放出系は、Langer (1990, *Science* 249:1527-1533) による総説において論じられている。本発明の1以上の治療薬を含む持続放出製剤を作るために、当業者に公知のいずれの技術を用いてもよい。例えば、米国特許第4,526,938号 ; 国際公開WO 91/05548およびWO 96/20698 ; Ningら, 1996, *RadioTherapy & Oncology* 39:179-189 ; Songら, 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397 ; Cleekら, 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854 ; およびLamら, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照、これらはそれぞれ参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

#### 【 0 3 1 2 】

具体的な実施形態では、本発明の組成物が抗体をコードする核酸である場合、核酸を *in vivo* 投与してそのコードされた抗体の発現を促進することができる；それを適当な核酸発現ベクターの部分として構築しかつそれを細胞内に取込まれるように投与することにより、例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照）、または直接インジェクションにより、または微粒子ボンバードメントの使用により（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬を用いてコーティングすることにより細胞内に取り込まれ、または核に進入することが知られるホメオボックス様ペプチドと連結して投与すること（例えば、Joliotら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照）などにより、発現を促すことができる。あるいは、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞DNAに組込んで相同的組換えにより発現させてもよい。

10

#### 【0313】

抗体について、被験体に投与される治療上または予防上有効な投与量は、典型的には、0.1mg/kg～200mg/kg被験体体重である。好ましくは、被験体に投与される投与量は、0.1mg/kg～20mg/kg被験体体重、そしてさらに好ましくは1mg/kg～10mg/kg被験体体重である。本発明の抗体の投与の用量と頻度はまた、例えば脂質化などの修飾による抗体または融合タンパク質の取込みおよび組織浸透（例えば、肺中への）の増強によって低減することもできる。

#### 【0314】

本発明の分子の治療上または予防上有効な量を用いる被験体の治療は、単回治療を含むことができ、または、好ましくは、一連の治療を含んでもよい。好ましい例においては、約0.1～30mg/kg体重の本発明の分子を用いて、毎週1回、約1～10週間にわたって、好ましくは約2～8週間にわたって、さらに好ましくは約3～7週間にわたって、そしてなおさらに好ましくは約4、5、または6週間にわたって、被験体を治療する。他の実施形態では、本発明の医薬組成物を1日1回、1日2回、または1日3回投与する。他の実施形態では、医薬組成物を毎週1回、毎週2回、毎2週1回、毎月1回、毎6週1回、毎2月1回、毎年2回または毎年1回投与する。治療に使用する分子の有効な投与量は、特定の治療のコースにわたって増加または減少することもまた適当であろう。

20

#### 【0315】

##### 5.6.1 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用であるバルク薬組成物（例えば、不純なまたは非滅菌の組成物）および単位投与剤形の調製に利用することができる医薬組成物（すなわち、被験体または患者に投与するのに好適である組成物）を含む。そのような組成物は、本明細書中に開示した予防および/または治療薬の予防上または治療上有効な量またはそれらの薬剤と製薬上許容される担体の組合せを含む。好ましくは本発明の組成物は、予防上または治療上有効な量の1以上の本発明の分子および製薬上許容される担体を含む。

30

#### 【0316】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、変異型Fc領域を含む1以上の本発明の分子を治療上有効な量含み、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aおよび/またはFc R11Aと結合するのよりも大きな親和性をもってFc R111Aおよび/またはFc R11Aと結合し、かつ/または該変異型Fc領域は野生型Fc領域を含む対応する分子よりも少なくとも2倍効果的なエフェクター機能を仲介し、かつ該医薬組成物は製薬上許容される担体を含む。他の実施形態では、医薬組成物は変異型Fc領域を含む1以上の本発明の分子を治療上有効な量含み、該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R111Aと結合するのよりも大きな親和性をもってFc R111Aと結合し、かつ該変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む対応する分子がFc R11Bと結合するのよりも小さな親和性をもってFc R11Bと結合し、かつ/または該変異型Fc領域は野生型Fc領域を含む対応する分子よりも少なくとも2倍効果的なエフェクター機能を仲介し、かつ該医薬組成物は製薬上許容される担体を含む。他の実施形態では、前記医薬組成物は1種以上の抗癌薬をさらに

40

50

含む。

【0317】

本発明はまた、治療用抗体（例えば腫瘍特異的モノクローナル抗体）を含む医薬組成物を包含し、該抗体は特定の癌抗原に特異的であり、本発明により規定されるFc領域における1以上のアミノ酸改変を有し、かつ該医薬組成物は製薬上許容される担体を含む。

【0318】

具体的な実施形態では、「製薬上許容される」との用語は、動物、特にヒトにおける使用について、連邦または州政府の規制当局により認可された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められた薬局方に掲げられたことを意味する。「担体」との用語は、治療薬がそれらとともに投与される、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全および不完全）、賦形剤、またはビヒクルを意味する。このような製薬担体は、水および油などの無菌液であってもよく、石油、動物、植物または合成起源の、例えばピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などの無菌液を含む。医薬組成物を静脈内投与するとき、水は好ましい担体である。生理食塩水および水性デキストロスおよびグリセロール水溶液を液状担体、特に注射溶液として利用することができる。好適な製薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。所望であれば、組成物はまた、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有してもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳化液、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、持続放出製剤などの剤形をとりうる。

【0319】

一般的に、本発明の組成物の成分は、別々にまたは一緒に混合して単位投与剤形で、例えば、乾燥した凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、密閉容器、例えばアンプルまたは小袋に入れ、活性薬の量を表示して供給される。組成物を注入により投与する場合、無菌製薬品質の水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて調剤してもよい。組成物を注射により投与する場合、無菌の注射用水または生理食塩水のアンプルを提供して、その成分が投与前に混合されるようにすることができる。

【0320】

本発明の組成物を、中性または塩形態として製剤してもよい。製薬上許容される塩としては、限定されるものでないが、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるアニオンと形成した塩、およびカチオン、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されたカチオンと形成した塩を含む。

【0321】

### 5.6.2 遺伝子治療

具体的な実施形態では、本発明の分子をコードする配列を含む核酸を投与して、遺伝子治療法の方法により、疾患、障害、または感染に関連する1以上の症状を治療、予防、または改善する。遺伝子治療法は、発現されたまたは発現されうる核酸の被験体への投与により実施する治療法を意味する。本発明のこの実施形態では、核酸はそのコードした抗体または融合タンパク質を産生して治療または予防効果を媒介する。

【0322】

当技術分野で利用しうるいずれの遺伝子治療法の方法も本発明に従って使用することができる。方法の例を以下に記載する。

【0323】

遺伝子治療法の方法の一般的総括については、Goldspielら、1993、Clinical Pharmacy 12:488-505；WuおよびWu、1991、Biotherapy 3:87-95；Tolstoshev、1993、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan、Science 260:926-932（1993）；およびMorgan and Anderson、1993、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217；May、1993、TIBTECH 11（5）：

10

20

30

40

50

155-215を参照。利用することができる組換えDNA技術の技術分野で公知の方法は、Ausubelら（編）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；およびKriegler, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。

【0324】

好ましい態様では、本発明の組成物は抗体をコードする核酸を含み、上記核酸は好適な宿主中において抗体を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、抗体コード領域と機能しうる形で連結されたプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導可能な、構成的な、かつ場合によっては、組織特異的なものである。他の特定の実施形態では、抗体コード配列および他のいずれか所望の配列がゲノム内の所望の部位における相同的組換えを促進する領域に連結され、その結果、抗体をコードする核酸の染色体内発現を可能にするような核酸分子が使用される（KollerおよびSmithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；ならびにZijlstraら, 1989, Nature 342:435-438）。

10

【0325】

他の好ましい態様では、本発明の組成物は融合タンパク質をコードする核酸を含み、上記核酸は好適な宿主において融合タンパク質を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、融合タンパク質のコード領域と機能しうる形で連結されたプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導可能な、構成的な、かつ場合によっては、組織特異的なものである。他の特定の実施形態では、融合タンパク質のコード配列および他のいずれか所望の配列がゲノム内の所望の部位における相同的組換えを促進する領域と連結し、その結果、融合タンパク質をコードする核酸の染色体内発現を可能にするような核酸分子が使用される。

20

【0326】

核酸の被験体への送達は、直接的（この場合には被験体を核酸または核酸を運ぶベクターに直接曝す）または間接的（この場合には細胞を最初に核酸にin vitroで形質転換し、次いで被験体中に移植する）のいずれであってもよい。これらの2つの手法は、それぞれ、in vivoまたはex vivo遺伝子治療法として公知である。

【0327】

具体的な実施形態では、核酸配列を直接in vivoに投与し、そこで発現してコードされた産物を産生する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれかにより、実施することができる；例えば、それを適当な核酸発現ベクターの部分として構築しかつそれを細胞内に取込まれるように投与することにより、例えば、欠陥または弱毒化レトロウイルスまたは他のベクターを使った感染により（米国特許第4,980,286号を参照）、または裸のDNAの直接インジェクションにより、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）により、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬を用いたコーティング、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル内への封入により細胞内に取り込まれ、またはそれらを核に進入することが知られるペプチドと連結して投与すること、受容体を介するエンドサイトーシスを受けるリガンドと連結して投与すること（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）（この方法は受容体の特異的に発現する細胞型を標的とするために用いることができる）などにより、実施することができる。別の実施形態では、核酸-リガンド複合体（このリガンドはエンドソームを破壊する融合性ウイルスペプチドを含む）を形成させて、核酸のリソソームでの分解を回避させることができる。さらに別の実施形態では、核酸は、特異的受容体を標的とすることにより、in vivoでの細胞特異的取込みと発現に向かわせられることができる（例えば、PCT公開WO 92/06180；WO 92/22635；W092/20316；W093/14188；WO 93/20221を参照）。あるいは、核酸を細胞内に導入し、そして相同的組換えによって発現のために宿主細胞DNA内に組込ませることができる（Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；およびZijlstraら, 1989, Nature 342:435-438）。

30

40

50

## 【0328】

具体的な実施形態では、本発明の分子（例えば抗体または融合タンパク質）をコードする核酸配列を含有するウイルスベクターが用いられる。例えば、レトロウイルスベクターを利用することができる（Millerら、1993、Meth. Enzymol. 217:581-599を参照）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージングおよび宿主細胞DNA中への組み込みのために必要な成分を含有する。遺伝子治療法に利用する抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列は1以上のベクター中にクローニングされ、これによりヌクレオチド配列の被験体中への送達を容易にする。レトロウイルスベクターについてのさらなる詳細は、Boesenら、（1994、Biotherapy 6:291-302）に見出すことができ、これは、化学治療にさらに耐性のある幹細胞を作る目的でmdr 1遺伝子を造血性幹細胞へ送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子治療法におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献には以下のものがある：Clowesら、1994、J. Clin. Invest. 93:644-651；Kleinら、1994、Blood 83:1467-1473；SalmonsおよびGonzberg, 1993、Human Gene Therapy 4:129-141；ならびにGrossmanおよびWilson, 1993、Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114。

10

## 【0329】

アデノウイルスは、遺伝子治療に利用しうる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、遺伝子を呼吸器上皮に送達する媒体として特に興味をそそる。アデノウイルスは元来、呼吸器上皮に感染して軽度の疾患を引き起す。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは非分裂細胞に感染することができるので有利である。KozarskyおよびWilson（Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993）はアデノウイルスに基づく遺伝子治療法の総説を報じている。Boutら（Human Gene Therapy, 5:3-10,1994）は、遺伝子をアカゲザルの呼吸器上皮へ導入するためのアデノウイルスベクターの利用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの利用の他の例は、Rosenfeldら、1991、Science 252:431-434；Rosenfeldら、1992、Cell 68 :143-155；Mastrangeliら、1993、J. Clin. Invest. 91:225-234；PCT公開W0 94/12649；ならびにWangら、1995、Gene Therapy 2:775-783に見出すことができる。好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターが用いられる。

20

## 【0330】

アデノ随伴ウイルス（AAV）も遺伝子治療における利用が提案されている（例えば、Walshら、1993、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300および米国特許第5,436,146号を参照）。

30

## 【0331】

遺伝子治療に対する他のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法により、組織培養物中の細胞に遺伝子を導入することを含む。通常、導入の方法は、選択可能なマーカーの細胞への導入を含む。次いで細胞を選択に供し、回収し、かつ導入した遺伝子を発現する細胞を単離する。次いでそれらの細胞は被験体に送達される。

## 【0332】

この実施形態では、核酸を細胞中に導入した後に、得られる組換え細胞をin vivo投与する。このような導入は、当技術分野で公知のいずれかの方法、例えば、限定されるものでないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターを用いる感染、細胞融合、染色体を介した遺伝子導入（chromosome-mediated gene transfer）、微小細胞を介した遺伝子導入（microcell mediated gene transfer）、スフェロプラスト融合などにより実施することができる。外来遺伝子を細胞中に導入するための多数の技術は当技術分野で公知であり（例えば、Loeffler and Behr, 1993、Meth. Enzymol. 217:599-618；Cohenら、1993、Meth. Enzymol. 217:618-644；およびClin. Pharma. Ther. 29:69-92,1985を参照）、受容細胞の必要な発達および生理学的機能が破壊されないことを条件として本発明に従って利用することができる。その技術は核酸の細胞への安定な導入を提供して、そ

40

50

れにより核酸が細胞により発現可能になり、そして好ましくはその細胞子孫に遺伝してかつ発現されうるものでなければならない。

【0333】

得られる組換え細胞は、当技術分野で公知の様々な方法により被験体に送達することができる。組換え血液細胞（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）は、好ましくは、静脈内に投与される。使用のために予測される細胞量は、所望の効果、患者状態などに依存し、当業者が決定することが可能である。

【0334】

遺伝子治療の目的で核酸を導入する相手の細胞は、いずれの所望の、利用しうる細胞型をも包含し、限定されるものでないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞；血液細胞、例えばTリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球；様々な幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞、例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝などから得られるものを含む。

【0335】

好ましい実施形態では、遺伝子治療に使用される細胞は被験体自身に由来するものである。

【0336】

組換え細胞を遺伝子治療に使用する一実施形態では、抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列を細胞中に導入して、その細胞またはその子孫により発現されうるようにし、次いでその組換え細胞を *in vivo* で投与して治療効果を与える。具体的な実施形態では、幹細胞または前駆細胞を用いる。単離して *in vitro* で維持することができるいずれの幹細胞および/または前駆細胞も、潜在的に、本発明のこの実施形態に従って利用することができる（例えば、PCT公開WO 94/08598；StempleおよびAnderson, 1992, Cell 71:973-985；Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A :229；ならびにPittelkowおよびScott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照）。

【0337】

具体的な実施形態では、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域と機能しうる形で連結された誘導可能なプロモーターを含み、それにより適当な転写誘導物質の存在または不在を制御することにより核酸の発現を制御しうる。

【0338】

### 5.6.3 キット

本発明は、本発明の分子（すなわち、変異型Fc領域を含む抗体、ポリペプチド）を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。さらに、疾患の治療に有用な1以上の他の予防または治療薬を、医薬パックまたはキット中に含んでもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットも含む。場合によってはこのような容器に、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府当局が指示した形式であって、ヒト投与用の製造、使用または販売行政当局による認可を反映する注意書きを添付してもよい。

【0339】

本発明は、上記の方法で使用することができるキットを提供する。一実施形態では、キットは1以上の本発明の分子を含む。他の実施形態では、キットはさらに、1以上の容器中に、癌の治療用に有用な1以上の他の予防または治療薬を含む。別の実施形態では、キットはさらに、癌に関連する1以上の癌抗原と結合する1以上の細胞傷害性抗体を含む。ある実施形態では、他の予防または治療薬は化学治療薬である。他の実施形態では、予防または治療薬は生物学的またはホルモン治療薬である。

【0340】

### 5.7 治療上の有用性の特徴付けおよび実証

本発明の医薬組成物、予防または治療薬の複数の態様は、好ましくは、*in vitro*、例えば細胞培養系で、および動物モデル生物で、例えばげっ歯類動物モデル系で所望の治療活性について試験した後に、ヒトに使用する。例えば、特定の医薬組成物の投与が適切なも

10

20

30

40

50

のかどうかを確認するために用いることができるアッセイは、細胞培養アッセイを含み、該アッセイにおいては、患者組織サンプルを培養で増殖し、本発明の医薬組成物に曝すかまたは別の方法で接触させ、そして組織サンプルに対するこのような組成物の効果を観察する。組織サンプルは患者から生検により得ることができる。この試験により、個々の患者に対して治療上最も有効な予防または治療分子を同定することができる。様々な具体的実施形態では、*in vitro*アッセイを、自己免疫性または炎症性障害に関わる細胞型の代表的細胞（例えば、T細胞）を用いて実施し、本発明の医薬組成物がそのような細胞型に対して所望の効果を有するかを確認することができる。

#### 【0341】

予防および/または治療薬の組合せは、ヒトで使用する前に、適当な動物モデル系で試験することができる。このような動物モデル系としては、限定されるものでないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが挙げられる。当技術分野で周知のいずれの動物系を使用してもよい。本発明の具体的な実施形態では、予防および/または治療薬の組合せはマウスモデル系で試験する。このようなモデル系は広く使用されていて、当業者に周知である。予防および/または治療薬は、反復して投与することができる。手順の複数の態様は、多様でありうる。該態様は、予防および/または治療薬の投与の時間的管理、およびこのような薬剤を別々にまたは混合物として投与するかのいずれかを含む。

#### 【0342】

本発明の方法に使用する好ましい動物モデルは、例えば、マウスエフェクター細胞上にFc Rを発現するトランスジェニックマウスであり、例えば、米国特許第5,877,396号（その全体を参照により本明細書に組み入れる）に記載されたいずれかのマウスモデルを本発明に用いることができる。本発明の方法に使用するトランスジェニックマウスとしては、限定されるものでないが、ヒトFc RIIIAを保有するマウス；ヒトFc RIIIAを保有するマウス；ヒトFc RIIBおよびヒトFc RIIIAを保有するマウス；ヒトFc RIIBおよびヒトFc RIIIAを保有するマウスが挙げられる。

#### 【0343】

好ましくは、上記の機能的アッセイにおいて最大レベルの活性を示した変異を、ヒトでの使用に先立って動物モデル研究における使用のためにテストする。本発明の方法を用いて同定され、ADCCアッセイにおいてテストされたFc変異体を有する抗体は、2つの抗Erb-B2抗体ch4D5およびch520C9、および抗TAG72抗体chCC49を含み、それらは既に異種移植マウスモデルにおいて用いられているので、動物モデルにおける使用に好ましい（Hudsiakら、1989, *Mol. Cell Biol.* 9:1165-72；Lewisら、1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-63；Bergmanら、2001 *Clin. Cancer Res.* 7:2050-6；Johnsonら、1995, *Anticancer Res.* 1387-93）。十分量の抗体を、上記の方法を用いて、動物モデルにおける使用のために調整することが可能であり、例えば本明細書において開示され、例示されている哺乳類発現系およびIgG精製法を用いて調製することができる。典型的な実験は、少なくとも約5.4mgの変異型抗体を必要とする。この計算は、8~10匹の30gのマウスを、負荷用量4μg/g、週維持用量2μg/gで10週間保護するのに必要な野生型抗体の平均量に基づくものである。本発明は、異種移植腫瘍の供給源としての腫瘍細胞株、例えば乳腺腺癌の患者に由来するSK-BR-3、BT474およびHT29細胞を包含する。これらの細胞はErb-B2およびプロラクチン受容体の両者をその細胞表面に有する。SK-BR-3細胞は、ADCCおよび異種移植腫瘍モデルの両者において既に用いられ、成功を収めている。他のアッセイにおいては、ヒト卵巣腺癌由来のOVCAR3細胞を用いることができる。これらの細胞は、TAG72抗原を細胞表面に発現しており、chCC49抗体と併せて用いることができる。異なる抗体および複数の腫瘍モデルの使用は、抗体特異的なFc変異体の不適合によるあらゆる特異的変異の取りこぼしを回避するであろう。

#### 【0344】

マウス異種移植モデルは、腫瘍特異的標的に対して作製された抗体の効力を調べるために用いることができ、該効力は抗体分子のCDR領域の親和性および特異性、および免疫反

10

20

30

40

50

応を引き起こす抗体のFc領域の能力に基づいて調べられる (Wuら, 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9)。マウスエフェクター細胞上にヒトFc Rを発現するトランスジェニックマウスは、類のないものであり、ヒトFc-Fc R結合の効力をテストするためにあつらえた動物モデルである。Dr. Jeffrey Ravetchの研究室で作製されたFc RIIIA、Fc RIIBおよびFc RIIAトランスジェニックマウス系統のつがいが利用可能であり (Rockefeller大学およびSloan Kettering Cancer centerとのライセンス契約を介して)、以下の表に挙げられているようなものである。

【表 8】

マウス系統	ヒトFcR
バックグラウンド系統	ヒトFcR
Nude/CD16A KO	なし
Nude/CD16A KO	Fc $\gamma$ RIIIA
Nude/CD16A KO	Fc $\gamma$ RIIA
Nude/CD16A KO	Fc $\gamma$ RIIAおよびIIIA
Nude/CD32B KO	なし
Nude/CD32B KO	Fc $\gamma$ RIIB

10

## 【0345】

好ましくは、Fc RIIIAに対する増大した結合およびFc RIIBに対する減少した結合、A DCCおよび貪食アッセイにおける増大した活性の両者を示すFc変異体が、動物モデル実験においてテストされる。動物モデル実験は、生来の抗体を投与された対照との比較において、Fc RIIIAトランスジェニック、ヌードmCD16AノックアウトマウスにおけるFc変異体を有する抗体の効力の増加を検討する。好ましくは、8~10匹のマウス群が標準的なプロトコルによって調べられる。典型的な動物モデル実験は、以下のステップを含みうる：乳癌モデルにおいて、 $\sim 2 \times 10^6$ 個のSK-BR-3細胞を、マトリゲル (Becton Dickinson) と混合したPBS 0.1mLと共に1日目に皮下注入する。初めに野生型キメラ抗体およびアイソタイプ対照を、見積もり治療量の曲線を設定するために、1日目に初期用量4 $\mu$ g/gの4D5の静脈内注入、続いて週1回の2 $\mu$ g/gの注入により投与する。病気の進行を測定するために、腫瘍容量を6~8週間にわたってモニターする。アイソタイプ対照を注入した動物においては、腫瘍容量は時間に対して直線的に増加するはずである。それに対して、4D5を注入した群では非常にわずかな腫瘍増殖しか起こらないはずである。標準用量試験の結果は、Fc変異体をテストする実験のための上限を設定するのに用いられる。これらの試験はFc変異体を含む抗体を治療量以下用いて行われる。Fc RIIBノックアウトマウスにおいて行われる実験では、異種移植モデルにおいて1/10の用量が用いられ (Clynesら, 2000, Nat. Med. 6: 443-6を参照)、結果として腫瘍細胞の増殖が阻止される。本発明の変異体は好ましくはFc RIIIA活性化の増大およびFc RIIB結合の減少を示すものである。変異体は1/10の治療用量で調べられる。異なる間隔での腫瘍サイズの検査は、より低い用量での抗体の効力を表すものである。t-テストを用いたデータの統計学的解析は、データが顕著かどうかを決める方法を提供する。増大した効力を示すFc変異体は、漸次的に低い用量にしてテストされ、それらの効力の尺度としての最小可能投与量が決められる。

20

30

## 【0346】

本発明の組合せ治療法の抗炎症性活性は、当技術分野で公知の、かつCrofford L. J.およびWilder R. L.「動物の関節炎と自己免疫 (Arthritis and Autoimmunity in Animals)」in「関節炎と近縁症状：リウマチ学の教科書 (Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology)」, McCartyら (編), 第30章 (Lee and Febiger, 1993)に記載の様々な炎症性関節炎の実験動物モデルを利用して決定することができる。炎症性関節炎および自己免疫リウマチ疾患の実験的および自然発生的動物モデルはまた、本発明の組合せ治療法の抗炎症性活性を評価するために利用することもできる。以下は例として掲げたいくつかのアッセイであり、限定されるものではない。

40

## 【0347】

当技術分野で公知の、かつ広く利用される関節炎または炎症性疾患用の主な動物モデル

50

は、以下のものを含む：アジュバント誘導関節炎ラットモデル、コラーゲン誘導関節炎ラットおよびマウスモデル、ならびに、抗原誘導関節炎ラット、ウサギおよびハムスターモデル、これらは全て、Crofford L. J. and Wilder R. L. 「動物の関節炎と自己免疫 (Arthritis and Autoimmunity in Animals)」 in 「関節炎と近縁症状：リウマチ学の教科書 (Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology)」, McCartyら (編), 第30章 (Lee and Febiger), 1993に記載されている (その全体を参照により本明細書に組み入れる)。

【0348】

本発明の組合せ治療法の抗炎症性活性は、カラゲナン誘導関節炎ラットモデルを用いて評価することができる。カラゲナンが誘導する関節炎はまた、慢性関節炎または炎症の研究において、ウサギ、イヌおよびブタにおいても利用されている。定量的な組織形態計測的評価が治療効力の決定に用いられる。このようなカラゲナン誘導関節炎モデルを利用する方法は、Hansra P.ら, 「ラットにおけるカラゲナン誘導関節炎 (Carrageenan-induced Arthritis in the Rat)」, *Inflammation*, 24(2):141-155, (2000)に記載されている。また、ザイモサン誘導炎症動物モデルも一般的に利用され、かつ当技術分野で公知である。

10

【0349】

本発明の組合せ治療法の抗炎症性活性はまた、カラゲナンが誘導するラットの足浮腫 (paw edema) の抑制を、Winter C. A.ら, 「抗炎症薬用アッセイとしての、カラゲナンが誘導するラット後足浮腫 (Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs)」 *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962)に記載の方法の改変法を用いて測定することにより評価することもできる。このアッセイはほとんどのNSAIDの抗炎症性活性に対する一次in vivoスクリーニングとして用いられており、ヒトでの効力を予測すると考えられている。テスト予防薬または治療薬の抗炎症性活性は、ビヒクルを投与した対照グループと比較した試験グループの後足重量増加の抑制パーセントとして表現される。

20

【0350】

さらに、炎症性腸疾患の動物モデルを、本発明の組合せ治療法の効力を評価するのに用いることもできる (Kimら, 1992, *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Suppl):3S-10S)。潰瘍性大腸炎およびクローン病はヒト炎症性腸疾患であり、動物に誘導することができる。硫酸化多糖類 (限定されるものでないが、アミロペクチン、カラゲーン、硫酸アミロペクチンおよび硫酸デキストランを含む) または化学刺激剤 (限定されるものでないが、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) および酢酸を含む) を動物に経口投与して炎症性腸疾患を誘導することができる。

30

【0351】

自己免疫障害用の動物モデルもまた、本発明の組合せ治療法の効力を評価するのに用いることができる。自己免疫障害、例えばI型糖尿病、甲状腺自己免疫、全身性エリテマトーデス、および糸球体腎炎に対する動物モデルが開発されている (Flandersら, 1999, *Autoimmunity* 29:235-246; Kroghら, 1999, *Biochimie* 81:511-515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19:12-24)。

40

【0352】

さらに、当業者に公知のいずれのアッセイを、自己免疫および/または炎症性疾患に対する本発明に開示した組合せ治療法の予防および/または治療効用の評価に用いてもよい。

【0353】

本発明の予防および/または治療プロトコルの毒性および効力は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法により確認することができる。例えば、LD<sub>50</sub> (集団の50%に対する致死用量) およびED<sub>50</sub> (集団の50%における治療上有効な用量) を決定する手法により確認することができる。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表現される。大きな治療指数を示す予防および/または治療薬が好ましい。毒

50

性副作用を表す予防および/または治療薬を使用することはできるが、このような薬物を罹患組織の部位を標的に定める送達系を設計して非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小化し、それにより、副作用を軽減するように注意しなければならない。

#### 【0354】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトに使用する予防および/または治療薬の投与量の範囲を決定するのに利用することができる。このような薬物の投与量は、好ましくは、毒性が低いか全くなく、ED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、採用された投与剤形および利用する投与経路に依存して変わりうる。本発明の方法に使用するいずれの薬物に対しても、治療上有効な用量はまず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、細胞培養で決定したIC<sub>50</sub>（すなわち、症状の半値抑制（half-maximal inhibition）を達成する試験化合物の濃度）を含むような循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて決定してもよい。このような情報を、ヒトにおいて有用な投与量をさらに正確に決定するのに用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィにより測定することができる。

10

#### 【0355】

本発明に従って使用される治療法の抗癌活性はまた、癌研究用の様々な実験動物モデル、例えばSCIDマウスモデルまたはトランスジェニックマウスまたはヒト異種移植片をもつヌードマウス、動物モデル、例えば、ハムスター、ウサギなどを用いることにより決定することもでき、これらは当技術分野で公知であり、かつ「抗癌剤開発用腫瘍モデルの関連性（Relevance of Tumor Models for Anticancer Development）」（1999, 編 FiebigおよびBurger）；「腫瘍学に対する貢献（Contributions to Oncology）」（1999, Karger）；「腫瘍学研究におけるヌードマウス（The Nude Mouse in Oncology Research）」（1991, 編 Boven and Winograd）；およびAnticancer Drug Development Guide（1997 編 Teicher）（これらの全体を参照により本明細書に組み入れる）に記載されている。

20

#### 【0356】

本発明の分子の治療効力を決定するのに好ましい動物モデルは、マウス異種移植モデルである。異種移植腫瘍の供給源として用いることができる腫瘍細胞株は、限定されるものでないが、SKBR3およびMCF7細胞を含み、それらは乳腺腺癌の患者に由来しうる。これらの細胞は、erbB2およびプロラクチン受容体の両者を有する。SKBR3細胞は、ADCCおよび異種移植腫瘍モデルとして、当技術分野において通常用いられている。代わりに、ヒト卵巣腺癌に由来するOVCAR3細胞を、異種移植腫瘍の供給源として用いることができる。

30

#### 【0357】

本発明のプロトコルと組成物は、ヒトで使用する前に、好ましくは、in vitroで、次いでin vivoで、所望の治療または予防活性について試験する。治療薬および治療法は、腫瘍または悪性培養細胞株の細胞を用いてスクリーニングすることができる。当技術分野において標準的な多くのアッセイを、このような生存および/または増殖を評価するのに用いることができる；例えば、細胞増殖は<sup>3</sup>H-チミジン組込みを測定することにより、直接細胞計数より、プロトオンコジーン（例えば、fos、myc）または細胞周期マーカーなどの公知の遺伝子の転写活性の変化を検出することにより評価することができる；細胞生存率はトリパンブルー染色により評価することができ、分化は形態の変化、軟寒天中での増殖および/またはコロニー形成の減少または3次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成などに基づいて視覚的に評価することができる。

40

#### 【0358】

治療に用いる化合物は、ヒトで試験する前に好適な動物モデル系で試験することができる。動物は、限定されるものでないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含み、例えば、上記の動物モデルで試験することができる。化合物はその後、適当な臨床試験に使用することができる。

#### 【0359】

さらに、当業者に公知のいずれかのアッセイを、癌、炎症性障害、または自己免疫疾患の治療または予防について本明細書に開示した組合せ治療法の予防および/または治療効

50

用を評価するのに用いることができる。

【実施例】

【0360】

6. 実施例

酵母ディスプレイシステムを用いて、突然変異体ヒトIgG1重鎖Fc領域を、各種のFc受容体に対する改変された親和性についてスクリーニングした。特に、突然変異体FcライブラリーをエラーブローンPCR(Genemorph, Stratagene)によって作製し、その後、この突然変異体Fcタンパク質をAga2p細胞壁タンパク質に融合させた。これによって、融合タンパク質が細胞外に分泌されて、酵母細胞壁上に提示されるようになった。

【0361】

可溶性形態のヒト受容体(Fc RIIIAおよびFc RIIB)をクローニングした。しかし、酵母細胞表面上でのIgG1 Fcドメインの検出は、Fc Rのそのリガンドに対する低親和性のために、阻止された。この制限を回避するため、AVITAGを使用して、Fc Rテトラマー複合体を形成させた。これは、酵素によってビオチン化し、続いてフィコエリトリンとコンジュゲート化したストレプトアビジン(SA-PE; Molecular Probes)と反応させて、可溶性テトラマーFc R複合体を形成するものである。ELISAアッセイで、モノマーFc Rに比較して、可溶性Fc Rテトラマー複合体がヒトIgG1に対して高い結合性を持つことが確認された。FACS分析での評価によれば、酵母細胞表面上のFc融合タンパク質も可溶性Fc Rテトラマー複合体と結合した。

【0362】

酵母細胞表面上に発現させたFc融合タンパク質類の可溶性テトラマーFc R複合体類との結合性の差異を、FACS分析によってモニターした。こうして、1以上の可溶性テトラマーFc R複合体に対して変更された親和性を持つFc融合タンパク質を同定し、次に完全免疫グロブリン中に組み込み、哺乳動物細胞中で発現させた。哺乳動物が発現した産物をELISAアッセイで使用して、酵母表面ディスプレイシステムで得られた結果を確認した。最後に、突然変異体Fc領域を配列決定して、変更された残基(群)を確認した。

【0363】

6.1 Fc RIIIAのクローニング、発現および精製

材料および方法

可溶性Fc RIIBおよびFc RIIIAを以下のようにしてクローニングした。ヒトFc R遺伝子(Fc RIIBおよびFc RIIIA)のcDNAクローンを得た(Ravetch labより寄贈)。Fc RIIIA遺伝子の可溶性領域(アミノ酸7-203)をPCRによって増幅し(表9)、BamHI/HindIIIで消化し、pET25ベクター(Novagen)中に連結した。このベクターをSalI/NotIで消化し、断片(370)をゲル単離した。ベクター-hu3A(J. Ravetchより寄贈)をBamHI/SalIで消化し、Fc RIIIAのN末端を含有する断片(270)を単離した。両断片をBamHI/NotIで切断したpcDNA3中に同時連結し、pcDNA3-Fc RIIIA(アミノ酸1-203)を作製した。Fc RIIBの可溶性領域(アミノ酸33-180)をPCRによって増幅し(表9)、BgIII/HindIIIで消化し、pET25b(+)(Novagen)中に連結した。このベクターをBamHI/NotIで消化し、断片(140)をゲル単離した。ベクター-huRIIB(J. Ravetchより寄贈)をBamHI/EcoRIで消化し、440 bpのN末端Fc RIIB断片を単離した。両断片をBamHI/NotIで切断したpcDNA3中に同時連結し、pcDNA3-Fc RIIB(アミノ酸1-180)を作製した。組換えクローンを293H細胞中にトランスフェクトし、細胞培養物から上清を回収し、IgGセファロースカラムで可溶性組換えFc R(rFc R)タンパク質を精製した。

【0364】

結果

組換え可溶性Fc RIIIA(rFc RIIIA)および組換え可溶性Fc RIIB(rFc RIIB)の均質になるまで精製した

組換えFc Rタンパク質の発現およびIgGセファロースカラムでの精製に続いて、SDS-PAGEによって、組換え精製可溶性受容体タンパク質の純度および見かけの分子量を決定した。図1に示すように、可溶性rFc RIIIA(図1、レーン1)は予測した見かけの分子量が~35KDaであり、可溶性rFc RIIB(図1、レーン4)は予測した見かけの分子量が~20KDaであった

10

20

30

40

50

。図1に示すように、可溶性rFc RIIIAは拡散性の「ファジー」バンドとして移動するが、これはFc RIIIAに通常見られる高度のグリコシル化に起因している(Jefferisら、1995 Immunol Lett. 44, 111-117)。

【0365】

#### 6.1.1 精製した組換え可溶性Fc RIIIAの特性決定

##### 材料および方法

上記のようにして取得した精製可溶性rFc RIIIAを、ヒトモノマーまたは凝集IgGに対する直接結合性について、ELISAを用いて分析した。プレートを1X PBS中で一晩、可溶性rFc RIIIA 10 ngでコーティングした。コーティング後、プレートを1X PBS/0.1% Tween20で3回洗浄した。ヒトIgG(ビオチン化モノマーIgGまたはビオチン化凝集IgGのいずれか)を、0.03 mg/mL ~ 2 mg/mLの濃度範囲でウェルに添加し、可溶性rFc RIIIAと結合させた。反応を37 °Cで1時間行った。プレートを再度1X PBS/0.1% Tween20で3回洗浄した。ヒトIgGの可溶性rFc RIIIAとの結合を、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを用いて、650nmでの吸光度をモニターすることにより検出した。650nmでの吸光度は結合した凝集IgGに比例する。

10

【0366】

ブロッキングELISA実験で、Fc RIIIAモノクローナル抗体3G8、マウス抗Fc RIIIA抗体(Pharmingen)について、受容体の凝集IgGへの結合をブロックする能力をモニターする。洗浄およびインキュベーション条件は上記と同一とした。ただし、IgG添加の前に、5倍モル過剰の3G8を添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。

20

【0367】

##### 結果

精製組換え可溶性Fc RIIIAは凝集IgGに特異的に結合する。

【0368】

精製組換え可溶性Fc RIIIAの凝集IgGおよびモノマーIgGとの直接結合を、ELISAアッセイを用いて試験した(図2)。2 µg/mlのIgG濃度で、凝集IgGとの強い結合が観察された。しかし、同様の濃度で、モノマーIgGとの結合は検出されなかった。凝集IgGとの結合は、リガンド結合部位をブロックするマウス抗Fc RIIIAモノクローナル抗体である3G8によってブロックされ、このことは、凝集IgGの結合が普通のFc RIIIAリガンド結合部位を介することを示している(図2)。可溶性rFc RIIBも特性決定したところ、可溶性rFc RIIIAと同様の特性でIgGと結合することが示された(データは示していない)。

30

【0369】

#### 6.2 可溶性Fc Rテトラマー複合体の形成

##### 材料および方法

##### AVITAGペプチドに融合させた可溶性Fc RIIIAおよびFc RIIBの発現のためのプラスミドの構築

可溶性Fc Rテトラマー複合体を作製するため、ヒトFcRgIIIA遺伝子の可溶性領域(アミノ酸7-203)をPCRによって増幅し(表9)、BamHI/HindIIIで消化し、pET25b(+)(Novagen)中に連結した。このベクターをSalI/NotIで消化し、アガロースゲル電気泳動によって、370 bpの断片を単離した。ベクター-hu3A(J.Ravetchより寄贈)をBamHI/SalIで消化し、Fc RIIIAのN末端を含有する270bpの断片を単離した。両断片を、BamHI/NotIで消化しておいたpcDNA3.1(Invitrogen)中に同時連結し、pcDNA3-FcRgIIIA(アミノ酸1-203)を作製した。

40

【0370】

Fc RIIBの可溶性領域(アミノ酸33-180)をPCRによって増幅し(表9)、BgIII/HindIIIで消化し、pET25b(+)(Novagen)中に連結した。このベクターをBamHI/NotIで消化し、アガロースゲル電気泳動によって、140bpの断片を単離した。ベクター-huRIIB<sub>1</sub>(J.Ravetchより寄贈)をBamHI/EcoRIで消化し、440bpのFc RIIBのN末端断片を単離した。これらの両断片を、BamHI/NotIで消化しておいたpcDNA3.1(Invitrogen)中に同時連結し、pcDNA3-Fc RIIB(アミノ酸1-180)を作製した。その後、リンカー-AVITAG配列をFc RIIIAおよびFc RIIBの両方のC末端に融合させた。Fc RIIIA-リンカー-avitagおよびFc RIIB-リンカー-avitag

50

構築物を作製するため、pcDNA3.1 Fc RIIIAおよびFc RIIIB構築物をNotIおよびXbaI(両方ともベクター配列中で切断される)で消化し、このベクター中に、5'末端のNotI部位および3'末端のXbaIにより構成される86塩基対の二本鎖オリゴヌクレオチドを連結した。この86bp断片は、NotIおよびXbaIのための制限部位を持つようにあらかじめ設計した、2つの5'リン酸化逆相補オリゴヌクレオチド(表9中に5'および3'リンカー-avitagプライマーとして示した)をアニールすることによって作製した。100ng/ $\mu$ lの等容量の各プライマーを混合し、DNAを90℃で15分間加熱し、室温にて1時間冷却して、アニールさせた。これによって、対応する酵素で消化したpcDNA3.1-Fc RIIIAおよびFc RIIIB構築物に連結する準備ができた二本鎖DNA断片が作製された。従って、pcDNA3.1-FcR IIAA-リンカー-AVITAGおよびpcDNA3.1-FcR IIB-リンカー-AVITAGが構築された。

【表9】

Fc $\gamma$ RおよびIgGベクターの構築に用いたプライマー

オリゴマー	配列
5' linker.avitag (配列番号1)	GGCCGCAGGTGGTGGTGGTTCGGTGGTGGTGGTTCGGTTCIGAACGACATCTT CGAGGCTCAGAAAA TCGAATGGCACGAATGAT
3' linker.avitag (配列番号2)	CTAGATCATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCAG AACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGC
FcRIIA left (配列番号3)	G TTG GAT CCT CCA ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT T
FcRIIA right (配列番号4)	GAA AAG CTT AAA GAA TGA TGA GAT GGT TGA CAC T
FcRIIBright (配列番号5)	GAA GTC GAC AAT GAT CCC CAT TGG TGA AGA G
FcRIIBleft (配列番号6)	G TTA GAT CTT GCT GTG CTA TTC CTG GCT CC
IgG1 right (配列番号7)	ATA GTC GAC CAC TGA TTT ACC CGG AGA
IgG1left (配列番号8)	GGAA TTC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT
mcr025;chl (f) (配列番号9)	AAA GGATCC GCG AGC TCA GCC TCC ACC AAG G
H021 (配列番号10)	GTCTGCTCGAAGCATTAAACC

【0371】

#### BirAによるビオチン化

可溶性Fc受容体(Fc R)であって、pcDNA3.1中にクローニングしたこのタンパク質のC末端に15アミノ酸のAVITAG配列(Avidity, CO)(Schatz P. J., 1993, Biotechnology, 11: 1138-1143)を融合させたものを、リポフェクタミン(Lipofectamine)2000試薬(Invitrogen, CA)を使用して、293H細胞に一時的にトランスフェクトすることによって、作製した。培養物から上清を回収し、この上清をIgGセファロースカラムに通すことによって、可溶性Fc Rタンパク質を精製した。可溶性Fc R-AVITAG融合タンパク質の濃度を280nmでの吸光度によって定量した。可溶性Fc Rタンパク質上に存在するAVITAGを、ビオチンリガーゼ

10

20

30

40

50

の1つであるE.coli BirA酵素で、製造者のプロトコル(Avidity, CO)に従って、ビオチン化した。タンパク質の分解を防止するため、プロテアーゼ阻害剤混合物(Sigma catalog # P8849)の1:100最終希釈物および最終濃度1mg/mlのロイペプチン(Leupeptin)(Sigma L-8511)を混合物に添加した。このBirA反応物を室温で一晩インキュベートし、その後Biomax 1 OK-超遠心分離機(Millipore)を使用し、4℃、3500rpmでの遠心分離によって、溶液を濃縮した。タンパク質をTris-HCl(20mM, pH 8.0)、50mM NaCl中で、FPLC Superdex 200 HR 10/30カラム(Pharmacia Biotech)に付加して、標識した可溶性Fc Rを遊離のビオチンから分離した。

【0372】

#### ストレプトアビジンシフトアッセイによるビオチン化の程度の測定

約80~85%のタンパク質がBirA酵素(Avidity, CO)によってビオチン化された。ストレプトアビジンシフトアッセイを用いて、タンパク質のビオチン化の程度を測定した。ビオチン化タンパク質を各種の比率でストレプトアビジン(MW 60,000ダルトン)とともにインキュベートした。ビオチン化の程度を測定するため、非ビオチン化タンパク質単独およびストレプトアビジン単独を対照として含ませた。インキュベーションは氷上、4℃で2時間または一晩、行った。サンプルを、4-12% SDS-PAGE Bis-Tris(Invitrogen, CA)を用いて、還元剤あり、サンプルの沸騰なしで分析した。ストレプトアビジンと結合したビオチン化タンパク質は高分子量バンドとして移動する。ビオチン化の程度を、サンプル中に残ったモノマータンパク質の量によって評価した。モノマー低分子量体の不在およびストレプトアビジン単独よりも大きい分子量の複合体の存在が、高度のビオチン化を示す。

【0373】

#### Fc Rテトラマー複合体の形成

Fc Rテトラマー複合体の形成を、MHCクラスIテトラマー類についてすでに確立されている方法論に従って実施した(Busch, D. H.ら、1998 Immunity 8: 353-362; Altman, J. D.ら、1996, Science 274: 94-96、参照)。ビオチン化モノマーFc Rの濃度を、280nmでの吸光度に基づいて算出した。1分子のストレプトアビジン-フィコエリトリン(SA-PE)(Molecular Probes, OR)は、4分子のビオチンと結合する能力を持っている。SA-PEに対してモノマービオチン化Fc Rを5:1のモル比(5Xモノマービオチン化Fc R: 1X SA-PE)を使用して、過剰のビオチン化タンパク質となることを確実にした。SA-PEの算出分子量は300,000ダルトンであり、従って、1mg/mLストレプトアビジン-PE溶液303mLは1ナノモルのSA-PEを含有し、これを5ナノモルのタンパク質に添加した。テトラマータンパク質の効率的な形成には、SA-PEの段階的増加が必要である。4℃、暗所で、SA-PEの半量を最初に添加し、残りのSA-PEを20~30分毎に少量ずつ添加した。残りのSA-PEの添加の間隔は適宜とする。SA-PEの添加が完了した後、溶液を濃縮し、リン酸緩衝生理食塩液中、pH 7.4で、上記のように、FPLCサイズ除外カラムに付加した。SA-PE単独よりも大きい分子量の空隙容量中に溶出した画分を回収した。タンパク質の分解を防止するため、プロテアーゼ阻害剤を補充した。溶液を濃縮し、保存のため、最終複合体にさらにプロテアーゼ阻害剤を添加した。可溶性Fc Rテトラマー複合体の最終濃度を、ビオチン化モノマータンパク質の出発濃度に基づいて算出した。例えば、500μgのビオチン化タンパク質を使用してテトラマー複合体を形成させ、最終濃縮されたテトラマーが500μLの容量である場合、濃度は約1mg/mLであると見積もられる(濃縮中に生じる損失は考慮に入れていない。なぜならば、テトラマー形成の各ステップでどれだけの損失となるかを正確に判定するのは困難だからである。また、PEからの妨害があるので、濃度を測定するために280nmでの吸光度を採用することも不可能である)。長期保存のため、可溶性Fc Rテトラマー複合体をプロテアーゼ阻害剤とともに-80℃で、少量アリコートに分割した。これらの調製物にアジ化ナトリウムは添加しなかった。なぜならば、このテトラマーを酵母ディスプレイライブラリーのスクリーニングのために使用するからである。1アリコートを融解後、テトラマーを1週間までは4℃で保存した。

【0374】

#### テトラマーFc R複合体を特性決定するためのELISAアッセイ

ELISAを用いて、テトラマーFc R複合体を特性決定した。Maxisorb F96ウェルプレート(Nunc)をPBSバッファ中のヒトIgG 25ngでコーティングし、4 で一晩インキュベートした。プレートをPBS/0.5% BSA/0.1% Tween 20(洗浄および希釈バッファ)で洗浄した後、Fc RIIIAテトラマーおよび試験抗体の混合物を添加して、以下に記載するように、3G8、マウス抗ヒトFc RIIIA抗体、によるブロッキングを判定した。ブロッキングステップは以下のように実施した：最終濃度0.5 mg/mlに固定した可溶性Fc RIIIAテトラマーを、バッファ、PBS/0.5% BSA/0.1% Tween 20中、抗体とともに室温で1時間、予備インキュベートした。抗体の最終濃度を60mg/mL ~ 0.25mg/mLの範囲とした。3G8はマウス抗ヒトFc RIIIA抗体の1つであり、この実験の目的のためには、キメラ体、すなわち抗体の可変部がマウス抗ヒトFc RIIIAであり、重鎖および軽鎖の不変部がIgG1ヒト領域からのもを使用した。キメラ体4.4.20.D265Aもこの実験で使用した。これは、抗フルオレセイン抗体であって、そのFc領域の位置265に突然変異を含み、ここでアスパラギン酸がヒトIgG1中のアラニンで置換されているもので、その結果、Fc Rとの結合性が低下するようにしたものである。この抗体はすでに特性決定されている(Clynesら、2000, Nat. Med. 6: 443-446; Shieldsら、2001, J. Biol. Chem., 276: 6591-6604、参照)。この抗体を陰性アイソタイプ対照として使用した。

#### 【0375】

抗体を、Fc RIIIAテトラマーと、室温で1時間、予備インキュベートすることによって、結合させた。次に洗浄したプレート上のIgGに混合物を添加し、室温でさらに1時間インキュベートした。プレートをバッファで洗浄し、DJ130c(マウス抗ヒトFc RIIIA抗体、DAKO, Denmarkより入手可能；このエピトープは3G8抗体のものとは識別される)を、1:5000の希釈率で添加し、結合したFc RIIIAテトラマーを検出するために、室温で1時間インキュベートした。結合しない抗体をバッファで洗浄除去し、ヤギ抗マウスペルオキシダーゼ(Jackson laboratories)によって、DJ130cを検出した。この試薬がヒトFcを検出することはない。結合しないペルオキシダーゼコンジュゲート化抗体を洗浄除去した後、基質、TMB試薬(BioFfx)を添加して、アイソタイプ対照に対する3G8のブロッキングの程度を検出し、発色を650nmで読み取った。

#### 【0376】

ELISAによる可溶性テトラマーFc RIIIAのIgGへの直接結合のため、上記のように、maxisorbプレートをIgG 25ngでコーティングした。可溶性テトラマーFc RIIIAを20mg/mL ~ 0.1mg/mL添加し、ビオチン化モノマー可溶性Fc RIIIAは20mg/mL ~ 0.16mg/mLの範囲の濃度で添加した。検出は上記のDJ130cの場合と同様とし、ヤギ抗マウスペルオキシダーゼ抗体を添加した。TMB試薬で発色させ、プレートを650nmで読み取った。

#### 【0377】

### 結果

可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体は、モノマーヒトIgGに、その正常リガンド結合部位を介して結合する

可溶性Fc RIIIA-AVITAG融合タンパク質を、材料および方法のセクションに記載したように、ELISAアッセイを用いて、作製、単離、および分析し、AVITAGを含まない可溶性Fc RIIIAタンパク質と同様の性質を持つことが示された(データは示していない)。この融合タンパク質を上記のようにビオチン化し、そのテトラマー複合体を作製した。

#### 【0378】

次に、この可溶性Fc Rテトラマー複合体を、ELISAアッセイを使用して、そのリガンド、モノマーヒトIgGとの結合について評価した。ELISAによる分析で、可溶性テトラマーFc R複合体がモノマーヒトIgGと特異的に結合することが示された。図3Aに示すように、650nmでの吸光度によってモニターすると、可溶性テトラマーFc RIIIAのモノマーヒトIgGとの結合は、マウス抗ヒトFc RIIIAモノクローナル抗体である3G8によってブロックされる。一方、D265A突然変異を保有する4-4-20モノクローナル抗体は、可溶性テトラマーFc RIIIAのモノマーヒトIgGとの結合をブロックすることができなかった(図3A)。こうして、この実験で、可溶性テトラマーFc RIIIA複合体の結合は天然のリガンド結合部位を介

して起こることが確認された。

【0379】

可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体は、モノマー可溶性Fc RIIIAよりも大きい結合活性でモノマーヒトIgGに結合する

ELISAアッセイを用いて、可溶性テトラマーFc RIIIAの凝集ヒトIgGへの直接の結合を評価し、可溶性モノマーFc RIIIAのモノマーヒトIgGへの結合と比較した。図3Bに示すように、450nmでの吸光度によってモニターすると、可溶性Fc RIIIAテトラマーは、可溶性モノマー受容体よりも大きい結合活性(8~10倍)でヒトIgGに結合する。

【0380】

また、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体の結合を、IgG1から精製したFc断片でコーティングした磁性ビーズを用いてアッセイした(図4)。可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体は、モノマーの結合が検出されない条件下で、IgG1Fcコーティングビーズに結合する。この受容体複合体と、Fc結合をブロックする抗Fc RIIIAモノクローナル抗体LNK16とをプレインキュベートすることによって、結合の特異性が示された。このアッセイではさらに、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体が、モノマーヒトIgGにその正常リガンド結合部位を介して結合すること、およびこの受容体の結合活性は、複合体内の複数の結合部位のために増大すること、が確認された。

【0381】

### 6.3 突然変異型IgG1 Fcドメインの提示のための酵母菌株の構築

#### 材料および方法

pYDIベクター(Invitrogen)を酵母複製ベクターであるpCT302(Shustaら、2000 Nat. Biotechnol. 18: 754-759)から直接誘導した。これは、T細胞受容体および多数のscFVの提示に使用されて、成功しているものである。このプラスミドはセントロメア性であり、TRP1遺伝子を保有し、trp1酵母菌株中で、1細胞について1~2のプラスミドの比較的一定の数のコピーを可能にする。ポリリンカー内への特異的クローニングによって、目的の遺伝子をGAL1プロモーターの制御下およびAGA2のフレーム内に置いた。IgG Fcドメインの酵母Aga2pとの融合の結果、Aga2-Fc融合タンパク質の細胞外分泌がもたらされ、それによって内在性細胞壁タンパク質である酵母Aga1pタンパク質とのジスルフィド結合を介して、細胞壁上のFcタンパク質の提示をもたらす。

【0382】

提示レベルを最適化するため、IgG1重鎖に由来する各種の断片をPCRによって増幅し、pYDI中にクローニングした。具体的には、IgG1重鎖(アロタイプIG1m(a);アミノ酸206-447)のFc領域を、IMAGEクローン 182740からのPCRによって増幅し(表9)、EcoRI/SaIIで消化し、pYDIベクター(Invitrogen)中に連結した。IMAGEからの当初のクローンは、319位に1個のヌクレオチドの欠損を有していたので、これをin vitro部位特異的突然変異誘発によって補正して、pYD-GIF206を構築した(Quickchange, Stratagene)。

【0383】

5'オリゴ(mcr025; ch1(f))および3'オリゴ(H021)を使用して、pCINE0ベクター中のMAb B6.2の重鎖クローンから、CH1-CH3断片(アミノ酸118-447)を増幅した(表9参照)。断片をBamHI/NotIで消化し、pYDIベクター中に連結して、pYD-CHIを構築した。

【0384】

図5はこの構築物の模式図を示す。CH1-CH3構築物は、重鎖のヒンジ-CH2-CH3ドメインに加えてCH1ドメインを含有し、GIF206はヒンジの上流に6アミノ酸残基を含有し、GIF227はヒンジ領域内の内在性タンパク質切断部位で開始する(Jendebergら、1997 J. Immunol. Meth. 201: 25-34)。

【0385】

### 6.4 酵母細胞壁上のFcドメインの免疫学的局在化および特性決定

#### 材料および方法

標準的な酢酸リチウム酵母形質転換プロトコル(Gietzら、1992 Nucleic Acids Res. 20: 1425)を用いて、Aga2p-Fc融合タンパク質を含有する構築物、およびどのインサートも

10

20

30

40

50

欠如している対照ベクター、pYDIを、以下の酵母菌株中に形質転換した：EBY100 (Invitrogen)、MATa ura3-52 trp1 leu2 1 his3 200 pep4::HIS3 prb1 1.6R can1 GAL::GAL-AGA1。その後、所定の培地で、トリプトファン原栄養体を選択した。グルコース中で増殖後、主要炭素源としてガラクトースを含有する培地中、20℃で、24~48時間の培養によって、独立した細胞集団の増幅ならびにAga1pおよびAga2p-Fc融合タンパク質の誘導を行った。ガラクトース中での増殖はGAL1プロモーターを介したAga2-Fc融合タンパク質の発現を誘導し、その後このFc融合タンパク質の酵母細胞表面上の提示をもたらす。

【0386】

#### 結果

#### Fc融合タンパク質のFACS分析

酵母細胞表面上のFc融合タンパク質の発現を、PE-コンジュゲート化ポリクローナルF(ab)<sub>2</sub>ヤギ抗ヒトFc RおよびHP6017(Sigma)抗体(Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.)を用いる免疫染色によって分析した。蛍光顕微鏡観察で、3つのFc融合タンパク質について周辺染色が示された。ベクターのみを保有する対照菌株は、ほとんどまたは全く染色されなかった(データは示していない)。FACS分析を使用して、染色を定量化した(図6)。CH1-CH3融合物を含有する酵母菌株は、両抗体で染色された細胞の割合が最高であることを証明した(図6BおよびF)。GIF227構築物は最大の平均蛍光強度を示した(図6、パネルCおよびG)。

【0387】

#### 酵母細胞表面で発現させたFc融合タンパク質の結合の特性決定

FcおよびFc Rタンパク質の自然な状況では、この受容体は細胞表面上にあり、Fcは可溶性リガンドである。しかし、酵母Fcの表面提示は自然の相互作用の幾何学構造を逆転させる。酵母細胞壁の表面上のIgG1 Fcタンパク質の検出は、Fc Rのそのリガンドに対する低親和性と、このディスプレイシステムに固有の逆幾何学構造の両方によって、複雑化する。後者は変更することができないが、リガンドの結合活性は、上に説明したように、可溶性Fc Rテトラマー複合体を形成させることによって改良された。これは、酵母細胞壁の表面に発現したFc融合タンパク質へのFc Rの結合の検出を可能にする。

【0388】

可溶性テトラマーFc R複合体の表面提示Fc融合タンパク質への結合を特性決定するため、多様なFc構築物を発現する酵母細胞を、可溶性rFc RIIIAテトラマー複合体とともにインキュベートし、FACSによって分析した。FACS分析が示すように、pYD-CHIを保有し、野生型CH1-CH3構築物を提示する酵母細胞に、可溶性rFc RIIIAテトラマー複合体が結合した。しかし、FACS分析によれば、GIF206およびGIF227菌株は、可溶性rFc RIIIAテトラマー複合体との結合をほとんどまたは全く示さなかった(データは示していない)。

【0389】

Fc Rとの結合をブロックする、Fc領域中の突然変異型が同定されている(Shieldsら、2001; J Biol. Chem. 276: 6591-6604)。これらの突然変異型の1つであるD265Aを、pYD-CHI1中に組み込み、この突然変異体を酵母細胞表面上で発現させた。これらの細胞を、高濃度のリガンドを使用して、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体とともにインキュベートした(Fc 0.15 mM、D265A 7.5 mM)。FACS分析は、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体は野生型Fcと結合した(図7A)が、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体はD265A-Fc突然変異体と結合しなかったことを示し、これは、Fc Rが下流側ヒンジ-CH2領域中の正常Fc R結合部位と相互作用することを示している(図7B)。

【0390】

FACSによって分析したところ、Fc RIIIAリガンド結合部位に対する抗体は、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体が酵母細胞表面壁に提示された野生型Fcタンパク質と結合するのをブロックした(図8)。可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体の結合は、3G8抗体、同様にLNK16抗体(別の抗Fc RIIIAモノクローナル抗体(Advanced Immunologicals)(Tamら、1996 J. Immunol. 157:, 1576-1581))によってブロックされたが、無関係なアイソタイプ対照によってはブロックされなかった。従って、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体の酵母

10

20

30

40

50

細胞表面上に提示されたFcタンパク質への結合は、正常リガンド結合部位を介して起こる。このFc RIIIAテトラマー複合体の限定的な結合は、細胞の1亜集団が、Fc Rに接近可能なように適正に折りたたまれたFcを持つことを意味している。なぜ細胞の1亜集団のみがリガンドと結合できるかという理由は多数あるが、例えば、これらは異なる細胞周期の段階であるか、または融合タンパク質が外に輸送されないのかもかもしれない。

#### 【0391】

Fc RIIIA-テトラマーの酵母細胞表面上のFc融合タンパク質との結合の解離定数を測定するため、FACSを使用して、ある範囲のFc RIIIAテトラマー複合体の結合を分析した。Fc RIIIAテトラマー複合体を $1.4 \mu\text{M} \sim 0.0006 \mu\text{M}$ の濃度で、力価測定した。結合親和性の尺度として平均蛍光強度と非線形回帰分析を使用して、 $K_D$ を $0.006 \mu\text{M} (+/-0.001)$ と決定した(データは示していない)。

10

#### 【0392】

### 6.5 Fc突然変異体ライブラリーの構築

Fc-CH1構築物中のFc断片に隣接するプライマーおよびエラープローンPCR(Genemorph, Stratagene)を使用して、突然変異体Fcライブラリーを構築した。ベクターpYD-CHI中のCH1-CH3インサートを、突然変異誘発PCR(Genemorph, Stratagene)を使用して増幅した。pYD-上流およびpYD-下流プライマー(Invitrogen)を使用して、5反応を実施した。生成した増幅断片をXhoI/BamHIで消化し、pYDI中に連結した。次に、連結反応物をXL10ウルトラコンピテントセル(Stratagene)中に形質転換し、その結果、 $\sim 1 \times 10^6$ 形質転換体が得られ、その形質転換体の80%がインサートを含有していた。

20

#### 【0393】

ライブラリーからの28の任意のプラスミドの配列分析から、突然変異頻度が $\sim 2$ ないし3突然変異/kbであり、その保存ヌクレオチドの40%が機能停止し、突然変異の60%がアミノ酸変化をもたらしたことが示された。

#### 【0394】

ライブラリーを、30の独立した形質転換反応で、 $\sim 3.3 \times 10^5$ 形質転換物/ $\mu\text{g}$ の高効率で、酵母菌株EBY100、MAT ura3-52 trp1 leu2 l his3 200 pep4::HIS3 prb1 1.6R can I GAL::GAL-AGA 1::URA3中に形質転換して、合計 $\sim 10^7$ 酵母形質転換物を作製した(Gietzら、1992, Nucleic acids Res. 20: 1425)。このライブラリーを集めて、グルコース中での増殖によって、増幅させた。

30

#### 【0395】

### 6.6 Fc突然変異体の選択および分析

#### 材料および方法

#### Fc突然変異体のスクリーニングのためのELISAアッセイ

ELISAプレート(Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate)を、4で、50ml/ウェルの炭酸塩バッファー中の $0.5\text{mg/ml}$  BSA-FITCでコーティングし、一晚インキュベートした。プレートを1X PBS/0.1% Tween 20(PBST)で3回洗浄した。200ml/ウェルのPBST/0.5% BSAを添加し、プレートを室温で30分間インキュベートした。プレートをPBSTでさらに3回洗浄した。PBST/0.5% BSA中の馴化培地からの、野生型またはFc突然変異体を含有する4-4-20抗体(約 $3\text{mg/ml}$ 、最終濃度 $0.7 \sim 0.8\text{mg/ウェル}$ )の1:4希釈物を、50ml/ウェルで添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄した。精製し、ビオチン化したモノマーFc RIIIA  $3\text{mg/ml}$ (PBST/0.5% BSA中)をプレートに添加し( $50 \mu\text{l/ウェル}$ )、室温で1.5時間インキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄した。PBST/0.5% BSA中のストレプトアビジン-HRP(Pharmacia, RPN 123v)の1:5000希釈物を、50ml/ウェルで添加し、プレートを室温で30分間インキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄した。次に80ml/ウェルのTMB試薬(BioFX)をプレートに添加し、室温で10~15分、暗所でインキュベートした。40ml/ウェルの停止溶液( $0.18\text{M}$ 硫酸)の添加によって、反応を最終的に停止させた。次に、プレートを450nmでの吸光度についてモニターした。この1次スクリーニング後、興味ある候補を、免疫複合体による結合性ELISAで、4-4-20-Fc突然変異体の一連の力価測定によって、さらに確認した。このELISA中、2~3の改変を行った。プレートのコーティングのため、 $2\text{mg}$

40

50

/ml BSA-FITCを使用した。IgG定量結果に基づいて、PBST-/0.5% BSA中で希釈した、馴化培地からの4-4-20Fc(野生型または突然変異体)を、1、0.5、0.25、0.125、0.063、および0mg/mlの最終濃度で添加した。

【0396】

#### 細胞表面提示Fcタンパク質についてのFACSスクリーニング

細胞を、グルコースを含む少なくとも10mlのHSM-Trp-Ura pH 5.5中で、16~24時間、またはOD<sub>600</sub>が2.0を超えるまで、増殖させた。細胞を~2000 rpmで5分間、遠心沈殿させた。細胞を、ガラクトースを含む等容量のHSM-Trp-Ura、pH 7.0中に再懸濁した。125mlフラスコ中で、ガラクトース培地36mlを添加し、培養物9mlを接種し、振盪しながら20で24~48時間、インキュベートした。8~16時間間隔でOD<sub>600</sub>を測定することによって、増殖をモニターした。2Krpm、5分間の遠心沈殿で細胞を回収し、等容量の1XPBS、pH 7.4中に再懸濁させた。

10

【0397】

#### 平衡スクリーニング：

適切な量の細胞を、過剰のリガンドを維持しながら、インキュベートした。例えば、ライブラリーの10倍の割合を確実にするために必要な数の細胞で開始するのが好ましい。10<sup>7</sup>形質転換物を含むライブラリーについての1次選別のためには、10<sup>8</sup>細胞を使用すべきである。実際には、染色プロトコル中の損失を補填するため、10<sup>9</sup>細胞で開始するのが最良である。

【0398】

インキュベーションを、典型的にはローテーター上、4、暗所で1時間、1.5mL試験管中20~100mlの容量で実施した(インキュベーションバッファー：1XPBS pH7.4；1mg/ml BSA)。細胞をインキュベーションバッファー500mlで1回洗浄し、4Krpmで2.5分間、遠心沈殿させた。細胞をインキュベーションバッファー10 ml中に再懸濁させ、2次染色試薬とともにインキュベートした。Fc-CH1については、F(ab)<sub>2</sub>ヤギ抗hFc F(ab)<sub>2</sub>-FITC抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)を使用して、CH1発現について染色することができる。染色は1mLで30分間実施した。細胞をインキュベーションバッファー500mLでさらに洗浄し、4Krpmで2.5分間、遠心沈殿させ、1mL 1X PBS、1mg/mL BSAに再懸濁させ、FACSによって分析した。

20

【0399】

典型的な平衡スクリーニング選別ゲートおよび回収した細胞の数を表10に示す。

30

【表10】

選別ゲートおよび選別された細胞数

選別	ゲート	スクリーニングした細胞総計	回収細胞
1 <sup>st</sup>	5%	10 <sup>8</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>
2 <sup>nd</sup>	1%	10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
3 <sup>rd</sup>	0.2%	10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>
4 <sup>th</sup>	0.2%	10 <sup>7</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>

40

【0400】

3次および4次選別後、細胞を直接-trp-uraプレートに入れ、個々の突然変異体を同定した。これによって典型的には~200-400コロニー/プレートが再生した。回収後、細胞を50 mL円錐管中のグルコース培地10mLに入れ、30で増殖させた。全操作を反復した。

【0401】

#### 結果

#### Fc突然変異体のFACS分析

50

ガラクトース培地での誘導後、細胞を回収し、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体-PE標識物およびマウス抗ヒトFcのF(ab<sub>2</sub>)-FITC標識物とともに同時染色した(Jackson Immuno research Laboratories, Inc.)。細胞をFACSによって分析し、選別ゲートを使用して、細胞表面上のFc発現の量に比較して、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体に対して最高の親和性を示す細胞を選択した(図9)。例えば、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体により良好に結合する突然変異体Fcを含有する細胞でも、酵母細胞表面上ではFc融合タンパク質をわずかしが発現しないかも知れず、その細胞は選別ゲートの下方左側の隅に置かれることになる。

#### 【0402】

可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体に対して最高の親和性を示す突然変異体を富化するため、4回の連続的選別を実施した。各逐次選別のゲートを5.5%、1%、0.2%および0.1%とした。最後の選別後、細胞を選択培地にプレーティングし、個々のコロニーを単離した。個々のコロニーのそれぞれが、Aga2-Fc融合タンパク質内に単一のFc突然変異体を保有する細胞のクローン集団に相当した。最初に、32の独立したコロニーを取り出し、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体との結合性について、FACSによって試験した(図10)。可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体に結合した細胞のパーセンテージおよび結合した細胞の平均蛍光強度によって測定して、18の突然変異体が結合強度の増加を示した。

10

#### 【0403】

Fc RIIIAとの結合性の増加を示す突然変異を、可溶性Fc RIIBテトラマー複合体との結合性についても試験した(図10)。可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体との結合性の増加につながる突然変異の大部分はまた、Fc RIIBテトラマー複合体染色の検出をもたらした(図10)。既存の物理的および遺伝学的データに基づいて、Fc RIIIAとの結合性を増加させる突然変異のいくつかは、Fc RIIBとの結合性も増加させることが予想される(Shieldsら、2001, J Biol. Chem. 276: 6591-6604 ; Sondermannら、2000, Nature 406: 267-273)。

20

#### 【0404】

##### ヒト細胞系中で産生させた4-4-20 Mab中の突然変異体の分析

酵母系中での突然変異体の単離および分析によって、新規突然変異体対立遺伝子の迅速な同定が可能になる。突然変異体を単離するための異種系の使用は、誤った折りたたみをもたらす改変、または酵母に特異的なグリコシル化の改変によって、結合性を増大させる突然変異の同定をもたらさう。ヒト細胞中で産生される免疫グロブリン分子中のFc突然変異を分析するため、突然変異体を、抗フルオレセインモノクローナル抗体、4-4-20の重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター中にサブクローニングした(Kranzら、1982 J. Biol. Chem, 257(12): 6987-6995)。突然変異体4-4-20重鎖をヒト腎細胞系統(293H)中で一時的に軽鎖クローンと同時発現させ、上清を回収して、ELISAによって分析した(図11)。

30

#### 【0405】

ELISAアッセイによれば、2次FACS分析で、可溶性モノマーFc RIIIA複合体に対して強化された親和性を持つとして同定された突然変異体の大多数は、ヒト細胞系中で産生された4-4-20モノクローナル抗体のFc領域に存在する場合には、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体との結合性の増加をも示した(図11)。しかし、2つの突然変異体、16番および19番は、可溶性Fc RIIIAモノマー複合体との結合性の減少を示した。

40

#### 【0406】

表11は、酵母ディスプレイに基づくアッセイおよびELISAの両方によって判定して同定された突然変異、ならびにFc RIIIAおよびFc RIIBに対するそれぞれの結合特性をまとめたものである。表11中、記号は以下を表す：野生型Fc領域を含む対照の分子に比較して、・親和性の1倍増加；+ 親和性の50%増加；- 親和性の1倍減少； 親和性の変化なし。

【表 1 1】

同定された突然変異および結合特性

クローン #	突然変異部位	ドメイン	IIIA 結合性	IIB 結合性
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
7	Aga2p-T43I	注意:これは 提示を強化する Aga2P 中の 突然変異である		Aga2p- T43I
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1,hinge,CH2, CH3	変化無し	-
12	K290E, L142P	CH1,CH2	+	試験せず
16	A141V, H268L, K288E, P291S	CH1,CH2	-	試験せず
19	L133M, P150Y, K205E, S383N, N384K	CH1,CH2,CH3	-	試験せず

10

20

【 0 4 0 7 】

クローン #	突然変異部位	ドメイン	IIIA 結合性	IIIB 結合性
21	P396L	CH3	•	•+
25	P396H	CH3	•••	••
6	K392R	CH3	変化無し	変化無し
15	R301C, M252L, S192T	CH1,CH2	-	試験せず
17	N315I	CH2	変化無し	試験せず
18	S132I	CH1	変化無し	試験せず
26	A162V	CH1	変化無し	試験せず
27	V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T	CH1,Ch2	+	+
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	試験せず
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1,CH2,CH3	+	変化無し
31	K409R, S166N	CH1,CH3	変化無し	試験せず
20	S408I, V215I, V125I	CH1,hinge,CH3	+	変化無し
24	G385E, P247H	CH2, CH3	•••	+
16	V379M	CH3	••	変化無し
17	S219Y	Hinge	•	-
18	V282M	CH2	•	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	変化無し
35	D401V	CH3	+	変化無し
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	Hinge	•	変化無し
41	K246T, Y319F	CH2	•	変化無し
42	F243I, V379L	CH2,CH3	•+	-
43	K334E	CH2	•+	-
44	K246T, P396H	CH2,CH3	•	••+
45	H268D, E318D	CH2	•+	•••••

10

20

30

40

クローン #	突然変異部位	ドメイン	IIIA 結合性	IIB 結合性
49	K288N, A330S, P396L	CH2,CH3	*****	***
50	F243L, R255L, E318K	CH2	•	-
53	K334E, T359N, T366S	CH2,CH3	•	変化無し
54	I377F	CH3	•+	+
57	K334I	CH2	•	変化無し
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2,CH3	•+	•+
59	K334E, T359N, T366S (独立して単離された)	CH2,CH3	•+	変化無し
61	I377F (独立して単離された)	CH3	***	***+
62	P247L	CH2	**	**+
64	P217S, A378V, S408R	Hinge, CH3	**	*****+
65	P247L, I253N, K334N	CH2	***	**+
66	K288M, K334E	CH2	***	-
67	K334E, E380D	CH2,CH3	•+	-
68	P247L (独立して単離された)	CH2	+	*****
69	T256S, V305I, K334E, N390S	CH2,CH3	•+	変化無し
70	K326E	CH2	•+	***+
71	F372Y	CH3	+	*****+
72	K326E (独立して単離された)	CH2	+	**
74	K334E, T359N, T366S (独立して単離された)	CH2,CH3	**	変化無し
75	K334E (独立して単離された)	CH2	***+	変化無し
76	P396L (独立して単離された)	CH3	•+	変化無し
78	K326E (独立して単離された)	CH2	**	***+
79	K246I, K334N	CH2	•	****
80	K334E (独立して単離された)	CH2	•	変化無し
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L	CH2,CH3	•	変化無し
82	K320E, K326E	CH2	•	•

10

20

30

40

クローン #	突然変異部位	ドメイン	IIIA 結合性	IIB 結合性
84	H224L	Hinge	•	•••••
87	S375C, P396L	CH3	•+	••••+
89	E233D, K334E	CH2	•+	変化無し
91	K334E (独立して単離された)	CH2	•	変化無し
92	K334E (独立して単離された)	CH2	•	変化無し
94	K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	•	変化無し

10

## 【0410】

可溶性Fc RIIBテトラマー複合体の結合性の分析で、可溶性Fc RIIIAテトラマー複合体との結合の増加を示した8突然変異体のうち7つが、可溶性Fc RIIBテトラマー複合体についても増加した結合性を持つことが示された(図12)。1突然変異体、8番は、可溶性Fc RIIBテトラマー複合体との結合性の減少を示した。突然変異体のうちの3つが可溶性Fc R

20

## 【0411】

## 6.7 Fc突然変異体のADCCアッセイ

## エフェクター細胞の調製:

正常ヒト末梢血(Biowhittaker/Poietics, 1W-406)から、Ficoll-Paque(Pharmacia, 17-1440-02)Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によって、末梢血単核細胞(PBMC)を精製した。血液を同日に環境温度で移送し、PBSおよびグルコース(1g/1L)中で1:1に希釈し、15mL円錐管(3mL Ficoll; 4mL PBS/血液)または50mL円錐管(15mL:Ficoll; 20mL PBS/血液)中のFicoll IIに重層した。1500rpm(400rcf)で、室温で40分間、遠心分離した。PBMC層を取り出し(50 mL 円錐管から約4~6mL)、50mL円錐管中でPBS(Ca<sup>2+</sup>もMg<sup>2+</sup>も含有しない)中1:10に希釈し、さらに室温で10分間、1200rpm(250rcf)で遠心沈殿させた。上清を除去し、ペレットをPBS(Ca<sup>2+</sup>もMg<sup>2+</sup>も含有しない)10~12mLに再懸濁させ、15mL円錐管に移し、さらに室温で10分間、1200rpmで遠心沈殿させた。上清を除去し、ペレットを最少容量(1~2mL)の培地(Isocove培地(IMDM) + 10%ウシ胎仔血清(FBS), 4mM Glu, ペニシリン/ストレプトマイシン(P/S))に再懸濁させた。再懸濁させたPBMCをADCCアッセイのために適切な容量に希釈した; 2倍希釈物についてELISA 96ウェルプレート(Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate)中で実施した。PBMCの収量は全血40~50mLについて約3~5x10<sup>7</sup>細胞だった。

30

## 【0412】

## 標的細胞の調製:

このアッセイで使用した標的細胞は以下のものであり: SK-BR-3(ATCC受託番号 HTB-30; Trempeら、1976, Cancer Res. 33-41)、Raji(ATCC受託番号 CCL-86; Epsteinら、1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-40)、またはDaudi細胞(ATCC受託番号 CCL-213; Kleinら、1968, Cancer Res. 28: 1300-10)(IMDM培地0.5mL中に再懸濁させる)、これらをユーロピウムキレートビス(アセトキシメチル)2,2',2''':6',2''':テルピリジン6,6'ジカルボキシラート(BATDA試薬; Perkin Elmer DELFIA試薬; C136-100)で標識した。K562細胞(ATCC受託番号CCL-243)をNK活性についての対照細胞として使用した。DaudiおよびRaji細胞を遠心沈殿させた。SK-BR-3細胞を、37、5% CO<sub>2</sub>中で、2~5分間、トリプシン処理し、培地を中和した後、200~350Gで遠心沈殿させた。このアッセイで使用した標的細胞の数は約4~5x10<sup>6</sup>細胞であり、5x10<sup>6</sup>を超えることはなかった。なぜならば、標識効率は2x10<sup>6</sup>細

40

50

胞の少数で最善であったからである。細胞を遠心沈殿させた後、培地を15mL Falcon管中で0.5mLまで吸引除去した。BATDA試薬2.5  $\mu$ lを添加し、混合物を37、5%CO<sub>2</sub>中で30分間インキュベートした。細胞を10mLのPBSおよび0.125mMスルフィンピラゾール(“SP” ; SIGMA S-9509)で2回、そしてアッセイ培地(細胞培地 + 0.125 mMスルフィンピラゾール)10mLで2回、洗浄した。細胞をアッセイ培地1mLに再懸濁させ、計数して、希釈した。

#### 【0413】

最初のPBS/SP洗浄後に標的細胞としてSK-BR-3細胞を使用する場合は、PBS/SPを吸引除去し、SP、Gln、およびP/Sを含有するIMDM培地中のFITC 500  $\mu$ g/mL(PIERCE 461110)を添加し、37、5%CO<sub>2</sub>中で30分間インキュベートした。細胞をアッセイ培地で2回洗浄し、アッセイ培地1mLに再懸濁させ、計数して、希釈した。

10

#### 【0414】

##### 抗体によるオプソニン化:

標的細胞を上記のように調製した後、これを適切な抗体によってオプソニン化した。Fc変異型の場合、50  $\mu$ Lの $1 \times 10^5$ 細胞/mLを、2x濃度のFc変異型保有抗体に添加した。最終濃度は以下の通りである: Ch-4-4-20の最終濃度は0.5 ~ 1  $\mu$ g/mL; およびCh4D5の最終濃度は30ng/mL ~ 1ng/mL。

#### 【0415】

Fc変異型を持つ4-4-20抗体の場合、オプソニン化した標的細胞をエフェクター細胞に、エフェクター: 標的の比率が75:1となるように、添加した。Fc変異型を持つCh4D5抗体の場合は、エフェクター: 標的の比率を50:1または75:1とした。このアッセイについて有効なPBMC勾配は100:1から1:1の範囲である。自発的放出(SR)を、アッセイ培地100  $\mu$ Lを細胞に添加することによって、測定した。最大放出(MR)は、4% TX-100の添加によって、測定した。細胞を、Beckman遠心分離機中、57G、室温で1分間、200rpmで遠心沈殿させた。細胞を37、5%CO<sub>2</sub>中で、3~3.5時間、インキュベートした。インキュベーション後、Beckman遠心分離機(約220xg)中、10で5分間、1000rpmで、細胞を遠心分離した。上清20  $\mu$ lを回収し、Eu溶液200  $\mu$ Lを添加し、混合物をロータリー振盪機で、室温で15分間、120rpmで振盪した。時間分解蛍光測定機(Victor 1420, Perkin Elmer)で、蛍光を定量した。

20

#### 【0416】

##### 結果

上記のようにして、変異型Fc領域を、抗フルオレセインモノクローナル抗体、4-4-20の重鎖を含有する哺乳動物発現ベクター(Kranzら、1982 J. Biol. Chem. 257 (12): 6987-6995)中にサブクローニングした。ヒト腎細胞系統(293H)中で、変異型4-4-20重鎖を軽鎖クローンとともに一時的共発現させた。上清を回収し、ADCCアッセイを使用して分析した。図13は、突然変異体のADCC活性が濃度依存性であることを示している。表12に総括したように、5種の変異型Fc領域を持つ免疫グロブリンが、野生型ch 4-4-20に比較して、増大したADCC活性を持っていた。その5種の突然変異体は以下のものである: MGFc-27(G316D, A378V, D399E); MGFc-31(P247L, N421K); MGFc-10(K288N, A330S, P396L); MGFc-28(N315I, V379M, T394M); MGFc-29(F243I, V379L, G420V)。

30

#### 【0417】

その他の変異型Fc領域を持つ4-4-20免疫グロブリンを、野生型Fc領域を持つ4-4-20免疫グロブリンに比較したこれらのADCC活性について、アッセイした。その結果を表12にまとめた。

40

#### 【0418】

4-4-20抗体についても、前記と同様のプロトコルを用いて、ADCCアッセイを実施した。ただし、ヒト表皮成長因子受容体2(HER2/neu)に特異的なヒト化抗体(Ab4D5)中に、変異型Fc領域をクローニングした。この場合、変異型Fc領域を保有するHER2/neu抗体でオプソニン化したSK-BR-3細胞を、標的細胞として使用した。HER2/neuはSK-BR-3細胞により内在性に発現されるので、これらの細胞の表面に存在する。図13は、変異型Fc領域を保有するHER2/neu抗体のADCC活性を示す。表13は、HER2/neu抗体に関しての突然変異体のADCC活性の

50



【表 13】

突然変異体のまとめ

Fc 変異型	アミノ酸変化	FcR3A, K <sub>D</sub> /K <sub>off</sub>	FcR2B, K <sub>D</sub> /K <sub>off</sub>	ELISA IIIA 結合性	ELISA IIB 結合性	食作用 (突然変異体/WT)	4-4-20 ADCC (mutant/wt)	抗 HER2 ADCC (mutant/wt)
WT	none	198/0.170	94/0.094	1	1	1	1	1
MGFc 5	V379M	160/0.167	70/0.10	2X	N/C	0.86	2.09	1.77
MGFc 9	P243I, V379L	99.7/0.105	120/0.113	1.5X	減少	?	2.25	2.04
MGFc 10	K288N, A330S, P396L	128/0.115	33.4/0.050	5X	3X	1.2	2.96	2.50
MGFc 11	F243L, R255L	90/0.075	74.7/0.09	1x	減少	0.8	2.38	1.00
MGFc 13	K334E, T359N, T366S	55.2/0.128	72/0.11	1.5X	N/C	1	1.57	3.67
MGFc 14	K288M, K334E	75.4/0.1	95.6/0.089	3X	減少	1	1.74	
MGFc 23	K334E, R292L	70.2/0.105	108/0.107			1	2.09	1.6
MGFc 27	G316D, A378V, D399E	72/0.117	46/0.06	1.5X	14X	1.4	3.60	6.88
MGFc 28	N315I, A379M, D399E			1X	9X	1.37	1.69	1.00
MGFc 29	P243I, V379L, G420V	108/0.082	93.4/0.101	2.5X	7X	0.93	1.17	1.00
MGFc 31	P247L, N421K	62/0.108	66/0.065	3X	N/C	1.35	2.90	1.00
MGFc 37	K248M	154/0.175	100/0.091	1.4X	減少	0.98	3.83	0.67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0.104	50/0.041	4.5X	2.5X	1.4	3.07	2.50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0.198	86/0.074	1.4X	減少	1.5	4.29	0.50
MGFc 40	K248M	180/0.186	110/0.09	1.4X	減少	1.14	4.03	
MGFc 41	H268N, P396L	178/0.159	46.6/0.036	2.2X	4.5X	1.96	2.24	0.67
MGFc 43	Y319F, P352L, P396L	125/0.139	55.7/0.041	3.5X	2X	1.58	1.09	

【 0 4 2 0 】

## 6.8 Fc突然変異体の速度論的パラメーターの分析

Fc突然変異体を保有するch4-4-20抗体のFc RIIIAおよびFc RIIIBへの結合性の速度論的パラメーターを、BIAcoreアッセイ(BIAcore 装置1000, BIAcore Inc., Piscataway, N. J.)を用いて分析した。このアッセイで使用したFc RIIIAは、上記セクション6.2に記載した、リンカー-AVITAG配列に連結させたFc RIIIAの細胞外領域である、可溶性モノマータンパク質である。このアッセイで使用したFc RIIIBは、以下に記載された方法論に従って調製した、可溶性ダイマータンパク質である：米国仮出願 No. 60/439,709(2003年1月1

10

20

30

40

50

3日出願、参照により本明細書中に組み入れる)。簡単に述べると、使用したFc RIIBはヒトIgG2のヒンジ-CH2-CH3ドメインに融合させたFc RIIBの細胞外ドメインである。

#### 【0421】

BSA-FITC(10mM酢酸バッファー、pH 5.0中、36  $\mu$ g/mL)を、センサーチップ表面の4種のフローセルの1つ(フローセル2)に、アミンカップリング化学結合を介して(NHS/EDCの混合物によるカルボキシルメチル基の修飾によって)固定化し、約5000応答単位(RU)のBSA-FITCが表面に固定化されるようにした。その後、1M Et-NH<sub>2</sub>の注入によって、未反応の活性エステルを「キャップオフ(capped off)」した。好適な表面を調製した後、Fc突然変異を保有するch 4-4-20抗体を、流速5  $\mu$ L/mLで、溶液20  $\mu$ g/mLを1分間で注入することにより、表面を通過させた。表面に結合したch-4-4-20抗体のレベルは400から700RUの範囲だった。次に、HBS-Pバッファー(10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Surfactant P20、3mM EDTA、pH 7.4)中の受容体(Fc RIIIAおよびFc RIIB-Fc融合タンパク質)の一連の希釈物を、表面に100  $\mu$ L/分で注入した。各種受容体希釈物間での抗体の再生を、100mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9.4 ; 3M NaClの1回の5秒間注入によって、実施した。

10

#### 【0422】

アッセイの最初および最後に、対照注入として、ch-4-4-20抗体を全く含まないBSA-FITC表面上に、受容体の同率希釈物を注入した。

#### 【0423】

全データセットを採取した後、製造者のBIAcore, Inc.(Piscataway, NJ)が提供するコンピュータアルゴリズムを使用して、生成した結合曲線をだまかにフィットさせた。これらのアルゴリズムで $K_{on}$ および $K_{off}$ の両方が算出され、これから見かけの平衡結合定数、 $K_D$ が、2つの速度定数の比(すなわち、 $K_{off}/K_{on}$ )として演繹される。個々の速度定数をどのようにして導くかのさらに詳細な処理法は、BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)から得られる。

20

#### 【0424】

2種の濃度(Fc RIIIAで200nMおよび800nM、ならびにFc RIIB融合タンパク質で200nMおよび400nM)についての結合曲線をアラインして、応答を同一レベルの捕捉抗体に揃え、さらに実験曲線から対照曲線を差し引いた。会合および解離相は別々にフィッティングした。解離速度定数は解離相の32~34秒の間隔において得られ；会合相のフィットは1:1 Langmuirモデルによって取得し、基底フィットは $R_{max}$  および $\chi^2$ 指標を基準にして選択した。

30

#### 【0425】

### 結果

図14は、BSA-FITC-固定化したセンサーチップ上の、突然変異体Fc領域を持つch 4-4-20抗体の捕捉を示す。BSA-FITC表面上に、濃度約20  $\mu$ g/mLの抗体6  $\mu$ Lを、5  $\mu$ L/分で注入した。図15は、変異型Fc領域を保有するch-4-4-20抗体へのFc RIIIAのリアルタイム結合のセンソグラム(sensogram)である。Fc RIIIAの結合について200nMの濃度で分析し、共鳴シグナル応答を、野生型ch-4-4-20抗体について取得した応答のレベルで標準化した。Fc RIIIAのch-4-4-20抗体への結合についての速度論的パラメーターを、2種のFc RIIIA濃度、200および800nMで取得したデータにフィットさせることにより取得した(図16)。実線は、解離曲線について32~34秒の間隔において算出した $K_{off}$ 値に基づいて取得した、会合フィットを表す。 $K_D$ および $K_{off}$ は、使用した2種のFc RIIIA濃度から算出した。図17は、変異型Fc領域を保有するch-4-4-20抗体へのFc RIIB-Fc融合タンパク質のリアルタイム結合のセンソグラムである。Fc RIIB-Fc融合タンパク質の結合を200nMの濃度で分析し、共鳴シグナル応答を、野生型ch-4-4-20抗体について取得した応答のレベルで標準化した。Fc RIIB-Fc融合タンパク質のch-4-4-20抗体への結合についての速度論的パラメーターを、2種のFc RIIB-Fc融合タンパク質濃度、200および400nMで取得したデータにフィットさせることによって、取得した(図18)。実線は、解離曲線について32~34秒の間隔において算出した $K_{off}$ 値に基づいて取得した、会合フィットを表す。 $K_D$ および $K_{off}$ は、使用した2種のFc RIIB-Fc融合タンパク質濃度から算出した。

40

50

## 【0426】

分析から決定した速度論的パラメーター( $K_{on}$ および $K_{off}$ )は、ELISAアッセイによって判定したその突然変異体の結合特性およびADCCアッセイで判定したその突然変異体の機能性活性と相関があった。具体的には、表14に見られるように、野生型タンパク質に比較して強化されたADCC活性を持ち、かつELISAアッセイで判定してFc RIIIAに対する強化された結合性を持つ突然変異体は、Fc RIIIAについて改善された $K_{off}$ (すなわち、より低い $K_{off}$ )を有していた。従って、ある突然変異体Fcタンパク質について、野生型タンパク質に比較してより低いFc RIIIAに対する $K_{off}$ 値であるものは、強化されたADCC機能を有するものと見られる。反対に、表15に見られるように、野生型タンパク質に比較して強化されたADCC活性を持ち、かつELISAアッセイで判定してFc RIIIB-Fc融合タンパク質に対して低下した結合性を持つ突然変異体は、Fc RIIIB-Fc融合タンパク質について高い $K_{off}$ を有していた。

こうして、Fc RIIIAおよびFc RIIIBについての $K_{off}$ 値を、ある突然変異体がADCCなどの機能アッセイでどのように挙動するかの予測的尺度として用いることができる。実際に、野生型タンパク質に対するその突然変異体のFc RIIIAおよびFc RIIIB-Fc融合タンパク質についての $K_{off}$ 値の比率をADCCデータに対してプロットした(図19)。具体的には、Fc RIIIAについての $K_{off}$ 値の場合、比率  $K_{off}$ (野生型)/ $K_{off}$ (突然変異体)をADCCデータに対してプロットし、Fc RIIIBについての $K_{off}$ 値の場合は、比率  $K_{off}$ (突然変異体)/ $K_{off}$ (野生型)をADCCデータに対してプロットした。1より高い数は、野生型に比較して、Fc RIIIAについての減少した解離速度およびFc RIIIB-Fcについての増加した解離速度を示す。指し示されたボックス内に入る突然変異体は、Fc RIIIA結合についてのより低い消失速度とFc RIIIB-Fc結合についてのより高い消失速度を持ち、そして増大したADCC機能を有する。

## 【表14】

200nM および 800nM 結合曲線の“独立フィッティング”により得られた ch4-4-20Ab に対する FcRIIIa の結合性の速度論的パラメータ

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	$K_{on}$ 1/Ms	$K_{off}$ , 1/s	ELISA,OD	ADCC, %
Wt(0225)	319	$6.0 \times 10^5$	0.170	0.5	17.5
Mut11(0225)	90	$8.22 \times 10^5$	0.075	0.37	32
Mut5(0225)	214	$8.2 \times 10^5$	0.172	0.75	26
Mut6(0225)	264	$6.67 \times 10^5$	0.175	0.6	23
Mut8(0225)	234	$8.3 \times 10^5$	0.196	0.5	22
Mut10(0225)	128	$9.04 \times 10^5$	0.115	1.0	41
Mut12(0225)	111	$1.04 \times 10^6$	0.115	1.0	37
Mut15(0225)	67.9	$1.97 \times 10^6$	0.133	1.0	15
Mut16(0225)	84.8	$1.60 \times 10^6$	0.133	1.0	15
Mut18(0225)	92	$1.23 \times 10^6$	0.112	1.0	28
Mut25(0225)	48.6	$2.05 \times 10^6$	0.1	1.0	41
Mut14(0225)	75.4	$1.37 \times 10^6$	0.1	1.1	28
Mut17(0225)	70.5	$1.42 \times 10^6$	0.1	1.25	30
Mut19(0225)	100	$1.20 \times 10^6$	0.120	0.75	11
Mut20(0225)	71.5	$1.75 \times 10^6$	0.126	0.5	10
Mut23(0225)	70.2	$1.43 \times 10^6$	0.105	1.25	25

## 【 0 4 2 7 】

ハイライトを付けた突然変異体はELISAまたはADCCデータによる群にフィットしない。

## 【表 1 5】

200nM および 800nM 結合曲線の“独立フィッティング”により得られた野生型および変異体 ch4-4-20Ab に対する FcRIIB-Fc の結合性の速度論的パラメータ

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	$K_{on}$ 1/Ms	$K_{off}$ , 1/s	ELISA,OD	ADCC, %
Wt(0225)	61.4		0.085	0.4	17.5
Mut11(0225)	82.3		0.1	0.08	32
Mut5(0225)	50		0.057	0.6	26
Mut6(0225)	66.5		0.060	0.35	23
Mut8(0225)	44.2		0.068	0.25	22
Mut10(0225)	41.3		0.05	1.2	41
Mut12(0225)	40.1		0.051	0.4	37
Mut15(0225)	37.8		0.040	1.55	15
Mut16(0225)	40		0.043	1.55	15
Mut18(0225)	51.7		0.043	1.25	28
Mut25(0225)			0.112	0.08	41
Mut14(0225)	95.6		0.089	0.13	28
Mut17(0225)	55.3		0.056	0.38	30
Mut19(0225)	45.3		0.046	1.0	11
Mut20(0225)	24.1		0.028	0.8	10
Mut23(0225)	108		0.107	0.1	25

## 【 0 4 2 8 】

### 6.9 固相アッセイを用いた複数ラウンドの富化による、Fc突然変異体についてのスクリーニング

以下の突然変異体スクリーニングは、Fc RIIBに対して改善された結合性およびFc RIIIAに対して低下した結合性を示す、別のセットの突然変異体の同定を目指したものである。選択されたFc変異型の第2次スクリーニングをELISAによって実施した後、4-4-20系統中でADCCについて試験した。突然変異体を、標的としてフルオレセインでコーティングしたSK-BR3細胞およびエフェクター細胞集団としてヒトドナーから単離したPBMCを使用して、主として4-4-20を経由してADCCを媒介するその能力に基づいて選択した。次に、ADCCで相対的増強、例えば2つのうちの1つの因子の強化を示したFc突然変異体を抗HER2/neuまたは抗CD20chAb中にクローニングし、標的として適切な腫瘍細胞を使用するADCCアッセイで試験した。この突然変異体をBIAcoreによって分析して、その相対的 $K_{off}$ を測定した。

## 【 0 4 2 9 】

### スクリーニング1: Fc RIIBでコーティングした磁気ビーズを用いた順次固相減損および選択後の、Fc RIIIAでコーティングした磁気ビーズによる選択

このスクリーニングの目的は、Fc RIIBと結合しなくなったか、Fc RIIBに対して低下した結合性を示すFc突然変異体の同定である。10倍過剰の天然ライブラリー(~ $10^7$ 細胞)をFc RIIBでコーティングした磁気ビーズ("My One", Dynal)とともにインキュベートした。混合物を含有する試験管を磁場に置くことによって、ビーズに結合した酵母を非結合画分から分離した。ビーズと結合しなかった酵母細胞を取り出し、新鮮な培地に入れた。

これを次に、Fc RIIIAでコーティングしたビーズと結合させた。混合物を含有する試験管を磁場に置くことによって、ビーズに結合した酵母を非結合画分から分離した。ビーズと結合しなかった酵母細胞を除去し、ビーズに結合した酵母を激しいボルテックスによって取り出した。回収した細胞をグルコース含有培地で再増殖させ、ガラクトースを含有する選択培地で再誘導した。この選択工程を反復した。その後、最終培養物を使用して、DNAを回収した。Fcドメインを含有するインサートをPCRによって増幅し、4-4-20中にクローニングした。4-4-20 ELISAおよびADCCアッセイによって、約90のFc突然変異体をスクリーニングした。得られた陽性突然変異体を表16に示す。

【表16】

Fc $\gamma$ RIIBでコートされた磁気ビーズを用いた  
順次固相減損および選択と、引き続きFc $\gamma$ RIIAでコートされた  
磁気ビーズを用いた選択により選ばれた突然変異体

突然変異体	アミノ酸変化
MgFc37	K248M
MgFc38	K392T, P396L
MgFc39	E293V, Q295E, A327T
MgFc41	H268N, P396LN
MgFc43	Y319F, P352L, P396L D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,
MgFc42	G402D

10

20

【0430】

スクリーニング2および3: FACS、平衡スクリーニングおよび速度論的スクリーニングによって選択した突然変異体:

一次ライブラリースクリーニングで、396位での、プロリンからロイシンへのアミノ酸の変化がある突然変異(P396L)が同定された。このFc変異型はFc RIIIAおよびFc RIIBの両方に対して増大した結合性を示した。基準としてP396Lを使用し、第2のライブラリーを構築した。PCR突然変異誘発を使用し、それぞれがP396L突然変異を含有し、かつその他のヌクレオチド変化を持つ $\sim 10^7$ の突然変異体を作製した。2セットの条件を使用して、P396Lライブラリーをスクリーニングした。

30

【0431】

既述の方法を用い、モノマーとしてビオチン化Fc RIIIA-リンカー-avitagを使用して、平衡スクリーニングを実施した。約10倍過剰のライブラリー( $10^8$ 細胞)を、約7nMのFc RIIIA 0.5mLとともに1時間インキュベートした。結合体の上位1.2%を選択するFACSによって、混合物を選別した。選択した酵母細胞を、グルコース含有選択培地で増殖させ、ガラクトース含有選択培地で再誘導した。平衡スクリーニングをもう一度繰り返し、結合体の上位0.2%を回収するように、選別ゲートを設定した。次に、選択した酵母細胞をグルコース中の選択条件下で増殖させた。その後、この培養物を用いてDNAを回収した。Fcドメインを含有するインサートをPCRによって増幅し、既述の方法を用いて、4-4-20可変ドメインをコードするヌクレオチド配列中にクローニングした。4-4-20 ELISAおよびADCCアッセイによって、約90のFc突然変異体をスクリーニングした。得られた陽性突然変異体を表17に示す。

40

## 【表17】

約7nMのFcRIIIA濃度での平衡スクリーニングを用いた  
FACSにより選択された突然変異体

突然変異体	アミノ酸変化
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L
MgFc44	K334N, P396L
MgFc46	P217S, P396L
MgFc47	K210M, P396L
MgFc48	V379M, P396L
MgFc49	K261N, K210M, P396L
MgFc60	P217S, P396L

10

## 【0432】

Fc RIIIAとの結合について改善された $K_{off}$ を持つ突然変異体を同定するために、速度論的スクリーニングも実施した。酵母表面に提示されたP396L Fc変異型を持つ菌株を用いて、P396Lライブラリーをスクリーニングするための条件を確立した。簡単に述べると、誘導条件下で増殖させた細胞を、 $0.1\mu\text{M}$ ビオチン化Fc RIIIA-リンカー-avitagモノマーとともに1時間、インキュベートした。細胞を洗浄して、標識したリガンドを除去した。次に、標識した細胞を $0.1\mu\text{M}$ 非標識Fc RIIIA-リンカー-avitagモノマーとともにさらに時間をとってインキュベートし、洗浄し、その後FACS分析のためにSA:PEで染色した(図20)。細胞をやぎ抗ヒトFcでも染色して、Fc提示がこの実験中維持されることを示した。

20

## 【0433】

競合実験に基づき、1分間のインキュベーションの結果、約50%の細胞染色の損失となることが決定された。P396Lライブラリーを使用する速度論的スクリーニングのために、この時点を選定した。約10倍過剰のライブラリー( $10^8$ 細胞)を $0.1\mu\text{M}$ ビオチン化Fc RIIIA-リンカー-avitagモノマーとともに $0.5\text{mL}$ 容量中でインキュベートした。細胞を洗浄して、その後非標識リガンドとともに1時間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、SA:PEで標識した。混合物を結合体の上位0.3%を選択するFACSによって選別した。選択した酵母細胞を、グルコース含有選択培地で増殖させ、ガラクトース含有選択培地で再誘導した。速度論的スクリーニングをもう一度繰り返し、結合体の上位0.2%を回収するように、選別ゲートを設定した。FACSでの改善された結合について、選択されなかったP396Lライブラリーを選択された酵母細胞と比較した(図21)。ヒストグラムは、Fc RIIIA/PEおよびやぎ抗ヒトFc/FITCの両方でとも染色された細胞のパーセンテージを示す(上部右側)。

30

## 【0434】

次に、第2次選別で選択された酵母細胞を、グルコース中、選択条件下で増殖させた。次にこの培養物を使用して、DNAを回収した。Fcドメインを含有するインサートをPCRによって増幅し、上記の方法を使用して、4-4-20可変ドメインをコードするヌクレオチド配列中にクローン化した。4-4-20 ELISAおよびADCCによって、約90のFc突然変異体をスクリーニングした。得られた陽性突然変異体を表18に示す。

## 【表18】

1分間の非標識CD16Aの等モル量を使用した  
速度論的スクリーニングを用いたFACSにより選択された突然変異体

突然変異体	アミノ酸変化
MgFc50	P247S, P396L
MgFc51	Q419H, P396L
MgFc52	V240A, P396L
MgFc53	L410H, P396L
MgFc54	F243L, V305L, A378D, F404S, P396L
MgFc55	R255I, P396L
MgFc57	L242F, P396L
MgFc59	K370E, P396L

10

## 【0435】

スクリーニング4および5: Fc RIIIA 158V対立遺伝子を用いた、固相Fc RIIB減損ステップとFACS選別によるFc RIIIA選択の連携

スクリーニング1により得られたFc変異型の分析で、第2次スクリーニングで選択された突然変異体がFc RIIIAおよびFc RIIBの両方に対して改善された結合性を持つことが示された。従って、そのデータから、確立された条件下での磁気ビーズ(固相)を用いた順次減損および選択は、Fc RIIIAおよびFc RIIBに対する差異がある結合について、効果的な選択ではないことが示唆された。従って、Fc RIIIAと結合する一方でFc RIIBとは結合性が低下するかまたは結合しない突然変異体についてより効果的にスクリーニングするために、固相Fc RIIB減損ステップをFACS選別によるFc RIIIA選択と連携させた。この連携で、野生型Fcより大きいか同等の親和性でFc RIIIAに結合するFc変異型が同定された。

20

## 【0436】

10倍過剰の天然ライブラリー(~10<sup>7</sup>細胞)をFc RIIBでコーティングした磁気ビーズとともにインキュベートした。混合物を含有する試験管を磁場に置くことによって、ビーズに結合した酵母を非結合画分から分離した。ビーズと結合しなかった酵母細胞を取り出し、新たな培地に入れ、その後ガラクトースを含有する選択培地で再誘導した。この磁気ビーズによるFc RIIB減損を5回反復した。得られた酵母集団を分析して、50%を超える細胞がヤギ抗ヒトFcで染色され、ごくわずかなパーセンテージの細胞がFc RIIIAで染色されることを示すことがわかった。次にこれらの細胞を、0.1 μMビオチン化Fc RIIIAリンカー-avitagを用いたFACS選別によって2回選択した(データは示していない)。そのFc RIIIAは158Vアロタイプである。各選別後、Fc RIIIAおよびFc RIIB結合性の両方について酵母細胞を分析し、野生型Fcドメインによる結合性と比較した(図22)。

30

## 【0437】

次に、第2次選別で選択された酵母細胞を、グルコース中、選択条件下で増殖させた。次にこの培養物を用いてDNAを回収した。Fcドメインを含有するインサートをPCRによって増幅し、4-4-20可変ドメインをコードするヌクレオチド配列中にクローニングした。4-4-20 ELISAおよびADCCによって、約90のFc突然変異体をスクリーニングした。得られた陽性突然変異体を表19に示す(突然変異体61~66)。

40

## 【表19】

CD32B でコートされたビーズを用いた磁気ビーズ減損、  
 および Fc $\gamma$ RIIIA 158 バリンもしくは 158 フェニルアラニンを用いた  
 FACS による最終選択により選ばれた突然変異体

突然変異体	アミノ酸変化
MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N361D
MgFc64	E233G
MgFc65	N276Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T

10

## 【0438】

Fc RIIIAの158F対立遺伝子を用いたFc突然変異体スクリーニング:

IgG1 Fcドメインについて異なる結合親和性を持つ、2種のFc RIIIA受容体の対立遺伝子が存在する(Koeneら、1997, Blood 90: 1109-1114; Wuら、1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70)。158F対立遺伝子は158V対立遺伝子よりも5~10倍低い結合定数でFcドメインと結合する。以前には、酵母ディスプレイを使用するFcスクリーニングはすべて、この高結合性158V対立遺伝子をリガンドとして使用して行われた。この実験では、ビオチン化Fc RIIIA158F-リンカー-avitagモノマーをリガンドとして使用して、Fc RIIIB減損酵母集団からFc突然変異体を選択した。上位0.25パーセントFc RIIIA 158F結合体を選択するように、選別ゲートを設定した。得られた富化集団をFACSによって分析した(図23A)。次に個々のクローンを単離し、別種のFc RIIIAに対するその結合性をFACSによって分析した(図23B)。この集団からの個々のクローンの分析の結果、5突然変異を保有する1個の突然変異体、MgFc67(V284M, S298N, K334E, R355W, R416S)が同定された。これらはFc RIIIAに対して強化された結合性とFc RIIIBに対して低下した結合性を有していた。

20

## 【0439】

スクリーニング1、2、および3のための、ADCCアッセイによる突然変異体の2次スクリーニング:

上記のスクリーニングで選択された突然変異体を、次に、標準的ADCCアッセイを用いて分析して、Fc突然変異体を保有するch4-4-20が介在する溶解の比率を判定した。上記の方法を使用して、Fc変異型を保有するch4-4-20抗体を構築した。標的としてSK-BR3細胞を使用し、そしてエフェクター細胞は上記(セクション6.7)のようにFicoll勾配を使用してドナーから単離したPBMCとした。この突然変異体のADCC活性の結果を表20に総括する。

30

## 【0440】

表20からわかるように、Fc RIIIB減損およびFc RIIIA選択に基づいて上記の1次および2次スクリーニングを使用して単離した突然変異体は、野生型に比較して強化されたADCC活性を示した。

【表 20】

フルオレセインでコートされた SKBR3 細胞上の  
4-4-20 抗フルオレセイン抗体を介した ADCC の解析

突然変異体	アミノ酸変化	相対溶解率	
MgFc37	K248M	3.83	
MgFc38	K392T, P396L	3.07	
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4.29	
MgFc41	H268N, P396LN	2.24	10
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.09	
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	3.17	
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	3.3	
MgFc44	K334N, P396L	2.43	
MgFc46	P217S, P396L	2.04	
MgFc47	K210M, P396L	2.02	
MgFc48	V379M, P396L	2.01	20
MgFc49	K261N, K210M, P396L	2.06	
MgFc50	P247S, P396L	2.1	
MgFc51	Q419H, P396L	2.24	
MgFc52	V240A, P396L	2.35	
MgFc53	L410H, P396L	2	
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	3.59	
MgFc55	R255I, P396L	2.79	
MgFc57	L242F, P396L	2.4	
MgFc59	K370E, P396L	2.47	
MgFc60	P217S, P396L	1.44	30

## 【0441】

0.5 µg/mL ch4-4-20を使用して、突然変異体、37、38、39、41、43を分析した。その他のすべての抗体は、1 µg/mLで試験した。すべての比率を野生型ch4-4-20(IgG1)に対して標準化した。

## 【0442】

突然変異体をさらに、抗腫瘍モノクローナル抗体 4D5(抗HER2/neu)および抗CD20モノクローナル抗体2H7の重鎖中に、これらのモノクローナル抗体のFcドメインと置き換えることによりクローニングした。293H細胞中への一時的トランスフェクションとタンパク質Gカラム上での精製による標準的方法を使用して、これらのキメラモノクローナル抗体を発現させ、精製して、ADCCアッセイにより試験した。キメラ4D5抗体は標的としてSK-BR3細胞を用いてADCCアッセイで試験し(図24)、一方キメラ2H7抗体は標的としてDaudi細胞を用いてADCCアッセイで試験した(図25)。

## 【0443】

BIAcoreによる突然変異体の2次スクリーニング:

上記のスクリーニングで選択した突然変異体をBIAcoreによって分析し、Fc R111A(158V)およびFc R11Bへの結合についての速度論的パラメーターを決定した。使用した方法は上記セクション6.8に開示したものと同様である。

## 【0444】

提示したデータは、ch4-4-20モノクローナル抗体中でFc突然変異体を使用する実験から

50

測定した、野生型の消失速度に相対させた $K_{off}$ 値である。1より大きい相対数字は $K_{off}$ 率の低下を示す。1より小さい数字は消失速度の増加を示す。

## 【 0 4 4 5 】

Fc RIIIAについて消失速度の低下を示した突然変異体は以下のものである： MgFc38(K392, P396L)、MgFc43(Y319F, P352L, P396L)、MgFc42(D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D)、MgFc43b(K288R, T307A, K344E, P396L)、MgFc44(K334N, P396L)、MgFc46(P217S, P396L)、MgFc49(K261N, K210M, P396L)。Fc RIIIBについて消失速度の低下を示した突然変異体は以下のものである： MgFc38(K392, P396L)、MgFc39(E293V, Q295E, A327T)、MgFc43(K288R, T307A, K344E, P396L)、MgFc44(K334N, P396L)。BIAcoreデータを表21にまとめた。

## 【表 2 1】

BIAcore データ

Fc 突然変異体	AA 残基	FcγRIIIA158V (K <sub>off</sub> WT/ Mut)	FcγRIIB (K <sub>off</sub> WT/ Mut)
MgFc37	K248M	0.977	1.03
MgFc38	K392T, P396L	1.64	2.3
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	0.86	1.3
MgFc41	H268N, P396LN	0.92	1.04
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.23	2.29
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,		
MgFc42	G402D	1.38	
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	1.27	0.89
MgFc44	K334N, P396L	1.27	1.33
MgFc46	P217S, P396L	1.17	0.95
MgFc47	K210M, P396L		
MgFc48	V379M, P396L		
MgFc49	K261N, K210M, P396L	1.29	0.85
MgFc50	P247S, P396L		
MgFc51	Q419H, P396L		
MgFc52	V240A, P396L		
MgFc53	L410H, P396L		
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L		
MgFc55	R255I, P396L		
MgFc57	L242F, P396L		
MgFc59	K370E, P396L		
MgFc60	P217S, P396L		
MgFc61	A330V	1	0.61
MgFc62	R292G	1	0.67
MgFc63	S298N, K360R, N361D	1	0.67
MgFc64	E233G	1	0.54
MgFc65	N276Y	1	0.64
MgFc66	A330V, G427M,	1	0.62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416S		

## 【 0 4 4 6 】

本明細書および特許請求の範囲に記載した本発明は、本明細書に開示した特定の実施形態によって範囲を限定されるものではない。なぜならば、これらの実施形態は本発明のいくつかの態様を説明することを意図しているからである。あらゆる等価な実施形態が本発明の範囲内であることを想定している。実際、当業者には、前記の説明から、本明細書に示し、かつ記載したものに加えて、多様な本発明の改変が明らかであろう。こうした改変もまた、添付する特許請求の範囲内に入ることを想定している。

## 【 0 4 4 7 】

10

20

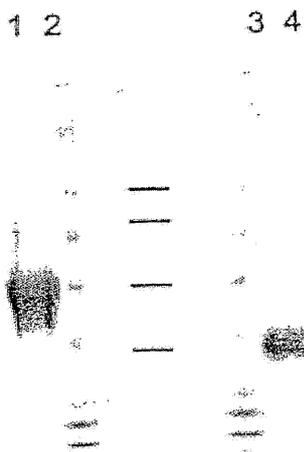
30

40

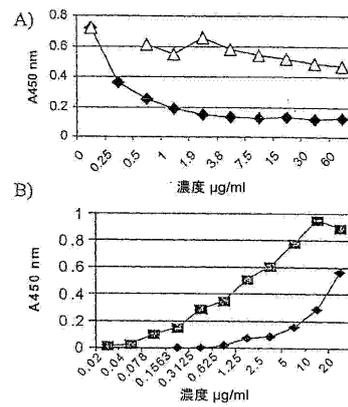
50

この出願中で、各種の刊行物を引用している。これらの内容の全体をすべての目的のために、参照により、本出願中に組み入れるものとする。

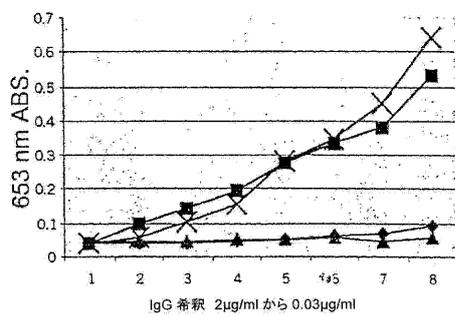
【図1】



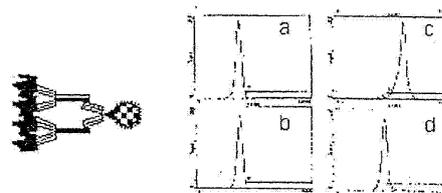
【図3】



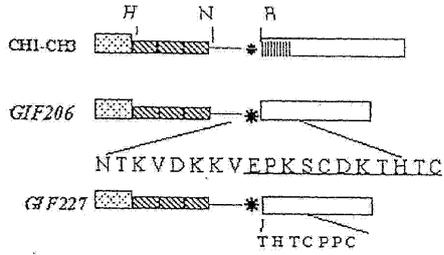
【図2】



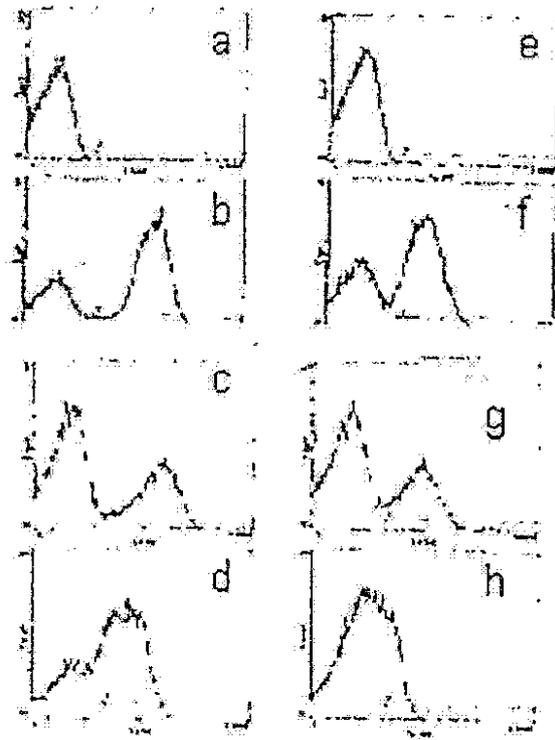
【図4】



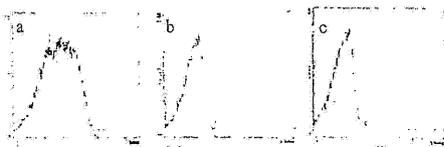
【 図 5 】



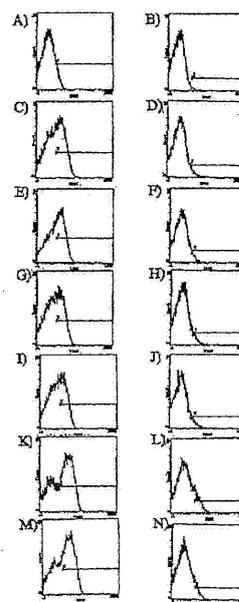
【 図 6 】



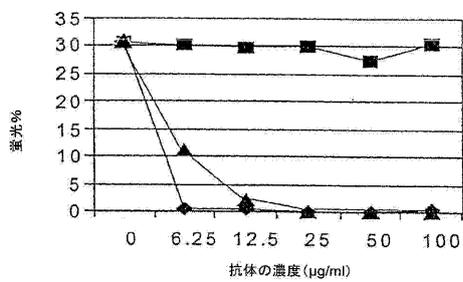
【 図 7 】



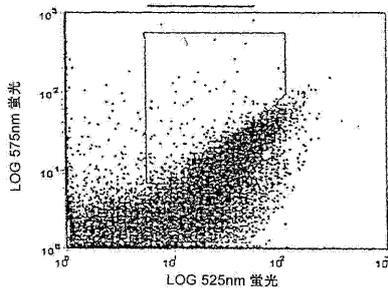
【 図 10 】



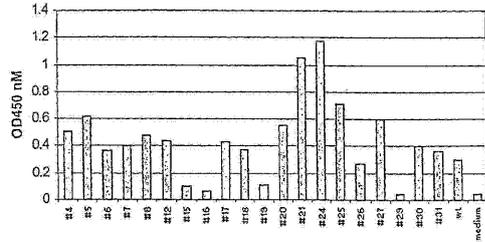
【 図 8 】



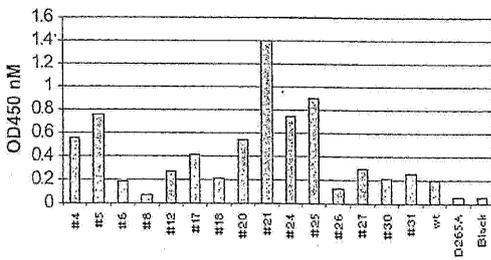
【 図 9 】



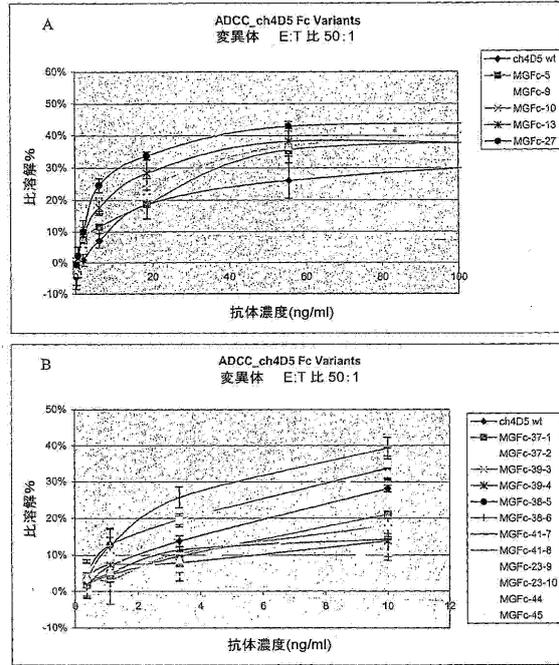
【 図 1 1 】



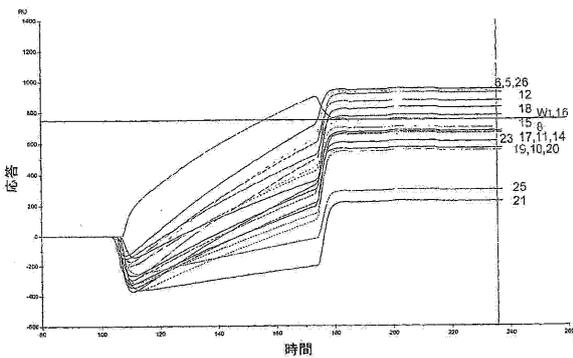
【 図 1 2 】



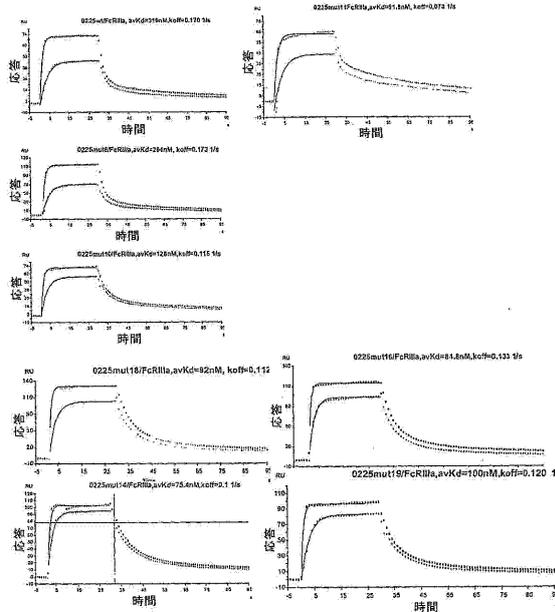
【 図 1 3 】



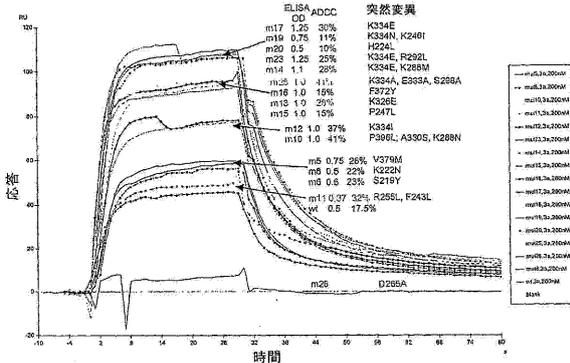
【 図 1 4 】



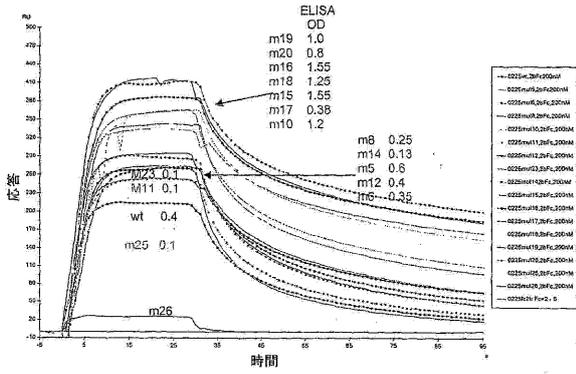
【 図 1 6 】



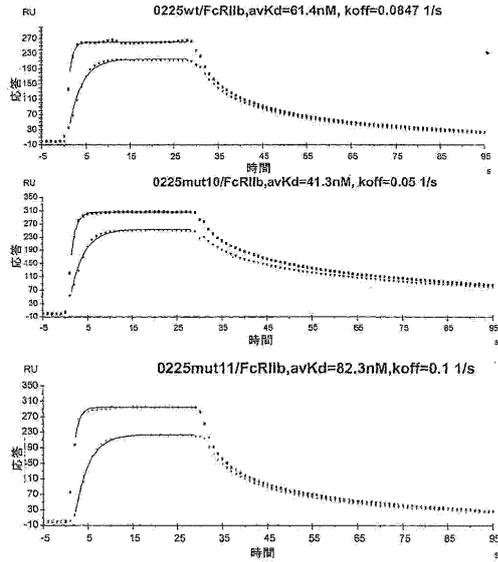
【 図 1 5 】



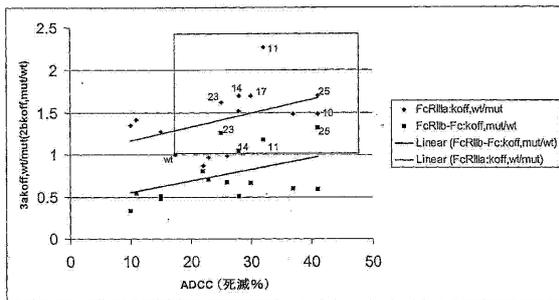
【 図 17 】



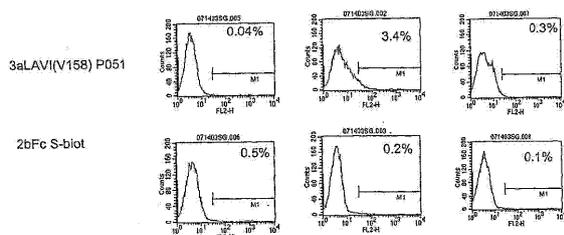
【 図 18 】



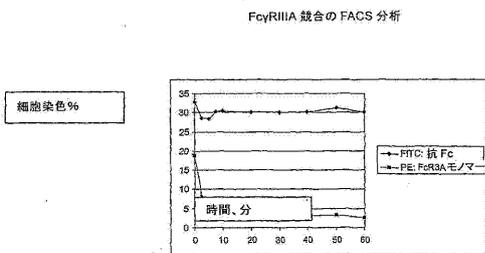
【 図 19 】



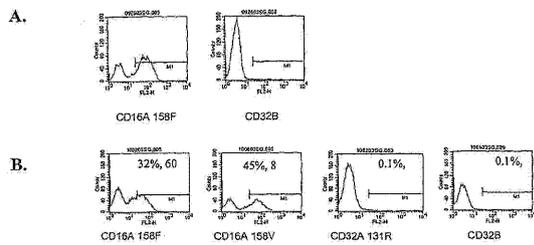
【 図 22 】



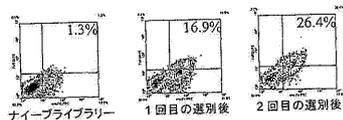
【 図 20 】



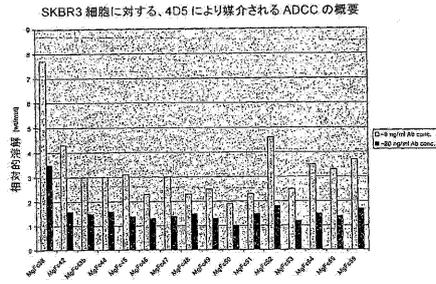
【 図 23 】



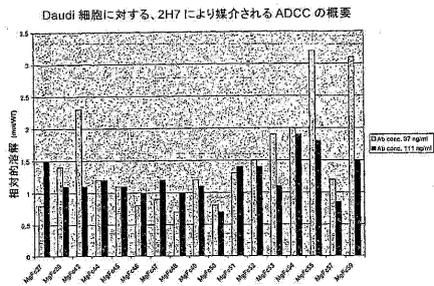
【 図 21 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 配列表 】

0006389093000001.app

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/514,549

(32)優先日 平成15年10月23日(2003.10.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ヴィー, スジャータ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 , メリーランド州, ゲイサースバーグ, オーチャード リッジ ドラ  
イブ 9 1 2 1 0 0

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 山中 隆幸

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2006-524039(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00