明 細 書

発明の名称 ： FcγRIIb特異的Fc領域改変体

技術分野

[0001] 本発明は、抗体のFc領域にアミノ酸改変を導入することで、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、及び／又は、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体、該Fc領域改変体を含むポリペプチド及び該ポリペプチドを含有する医薬組成物に関する。

背景技術

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

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

[0004] Fc領域とFcγRとの結合については、抗体のヒンジ領域及びCH2ドメイン内のいくつかのアミノ酸残基およびCH2ドメインに結合しているEUナンバリング297番目のAsnに付加される糖鎖が重要であることが示されている（非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6）。これらの箇所へ変異を導入した抗体を中

心に、これまでに様々なFcγR結合特性を持つ変異体が研究され、活性型Fcγ Rに対するより高い結合活性を有するFc領域変異体が得られている（特許文献 1、特許文献2、特許文献３、特許文献４）。

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

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

[0007] また、FcγRIIbは樹状細胞、マクロファージ、活性化された好中球、マスト細胞、好塩基球でも発現している。これらの細胞においても、FcγRIIbはphagocytosisや炎症性サイトカインの放出等の活性型FcγRの機能を阻害し、炎症性免疫反応を抑制する（非特許文献8）。

[0008] FcγRIIbの免疫抑制的な機能の重要性については、これまでにFcγRIIbノ

ックアウトマウスを用いた研究により明らかにされてきた。FcγRIIbノックアウトマウスでは、液性免疫が適切に制御されず（非特許文献17）、コラーゲン誘導関節炎（CIA）に対する感受性が増加することや（非特許文献18）、ループス（lupus）様の症状を呈すること、グッドパスチャー（Goodpasture）シンドローム様の症状を呈する（非特許文献19）ことが報告されている。

[0009] また、FcγRIIbの調節不全はヒトの自己免疫疾患との関連も報告されている。例えば、FcγRIIbのプロモーター領域や細胞膜貫通領域における遺伝子多型と、全身性エリテマトーデス（SLE）の発症頻度との関連（非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22、非特許文献23、非特許文献24）や、SLE患者のB細胞表面におけるFcγRIIbの発現低下が報告されている（非特許文献25、非特許文献26）。

[0010] このようにマウスモデルおよび臨床上の知見から、FcγRIIbは、特にB細胞との関与を通じて、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御する役割を果たしていると考えられ、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御するための有望な標的分子である。

[0011] 市販の抗体医薬として主に用いられているIgG1はFcγRIIbだけでなく、活性型FcγRにも強く結合することが知られている（非特許文献27）。FcγRIIbに対する結合を増強した、あるいは活性型FcγRと比較してFcγRIIbへの結合の選択性を向上させたFc領域を利用することで、IgG1と比べて免疫抑制的な性質を有した抗体医薬の開発が可能である。例えば、BCRに結合する可変領域と、FcγRIIbに対する結合を増強したFcを有する抗体を利用することで、B細胞の活性化を阻害できる可能性が示唆されている（非特許文献28）。B細胞上のFcγRIIbとB-cell receptorに結合したIgEとが架橋されることで、B細胞のプラズマ細胞への分化、その結果として起こるIgE産生が抑制され、ヒトPBMCを移植したマウスにおいてヒトIgGやIgM濃度は維持されているが、ヒトIgE濃度は減少することが報告されている（非特許文献29）。IgEだけではなく、B-cell receptorの複合体の構成分子であるCD79bとFcγRIIBとを抗体で架橋した場合には、in vitroにおいてB細胞の増殖が抑制されたこと、コラーゲン関

節炎モデルにおいてはその症状が緩和されたことが報告されている（非特許文献30)。

B細胞以外にも、IgEの受容体であるFcεRIと結合するIgEのFc部分とFcγRIIbに対する結合を増強したIgGのFc部分とを融合させた分子を使って、マスト細胞上のFcεRIとFcγRIIbとを架橋することで、FcγRIIbのリン酸化を引き起こし、FcεRI依存的なカルシウムの流入を抑制することが報告されており、これはFcγRIIbに対する結合を増強することでFcγRIIbの刺激を介した脱顆粒の阻害が可能であることを示唆している（非特許文献31)。

これらのことから、FcγRIIbに対する結合活性を向上させたFcを持つ抗体が自己免疫疾患等の炎症性疾患の治療薬として有望であることが示唆される。

[0012] また、抗体と抗原の免疫複合体存在下では、LPS刺激によるToll-like receptor 4を介した樹状細胞、マクロファージの活性化を抑制することが報告されており、この効果も免疫複合体のFcγRIIbを介した作用であることが示唆されている（非特許文献３２,３３）。このことから、FcγRIIbに対する結合を増強した抗体を用いることで、TLRを介した活性化シグナルを抑制する作用を増強することが可能であると期待され、自己免疫疾患などの炎症性疾患の治療薬として有望であることが示唆される。

[0013] また、FcγRIIbに対する結合を増強した変異体は、自己免疫疾患等の炎症性疾患の治療薬に加えてがん治療薬としても有望であることが示唆されている。これまでに、FcγRIIbは 抗TNFレセプタースーパーファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性において重要な役割を果たすことが明らかにされている。具体的にはTNFレセプターファミリーに含まれるCD40、DR4、DR5、CD30、CD137に対する抗体のアゴニスト活性にはFcγRIIbとの相互作用が必要であることが示唆されている（非特許文献３４，３５，３６，３７，３８，３９，４０）。非特許文献３４においては、FcγRIIbに対する結合を増強した抗体を用いることで、抗CD40抗体の抗腫瘍効果が増強することが示されている。このことから、FcγRIIbに対する結合を増強した抗体は抗TNFレセ

プタースーパーファミリーに対する抗体を始めとするアゴニスト抗体のアゴニスト作用を増強する効果があると期待される。

加えて、Receptor Tyrosine kinase（RTK）の一つであるKitを認識する抗体を使って、Kitを発現する細胞上でKitとFcγRIIbとを架橋することで、細胞の増殖が抑制されることが示されている。このKitが恒常的に活性化し、癌化を促すような変異を有していた場合であっても同様の効果が報告されている（非特許文献４１）。このことから、FcγRIIbに対する結合を増強した抗体を用いることで、恒常的に活性化した変異を有するRTKを発現した細胞に対する抑制作用を増強することが可能であると期待される。

[0014] これまでにFcγRIIbに対する結合活性を向上させたFcを持つ抗体について報告がされている（非特許文献28）。この文献中では、抗体のFc領域にS267E/L328F、G236D/S267E、S239D/S267E等の改変を加えることで、FcγRIIbに対する結合活性を向上させていた。この中で、S267E/L328Fの変異を導入した抗体が最も強くFcγRIIbに対して結合し、FcγRIaおよびFcγRIIaの131番目の残基がHisであるFcγRIIa H型に対する結合は天然型IgG1と同程度に維持していた。しかし、別の報告によると、この改変はFcγRIIaの131番目の残基がHisであるFcγRIIa R型に対する結合がFcγRIIbに対する結合と同程度に数百倍増強しており、FcγRIIa R型と比較した場合、FcγRIIbに対する結合の選択性が向上していない（特許文献5）。

[0015] FcγRIIbを発現せずFcγRIIaを発現している血小板のような細胞（非特許文献8）に関しては、FcγRIIbに対する結合の増強ではなく、FcγRIIaに対する結合の増強の効果のみが影響すると考えられる。例えば、VEGFに対する抗体であるbevacizumabを投与された患者群では血栓塞栓症のリスクが上昇することが知られている（非特許文献４２）。また、CD40 ligandに対する抗体の臨床開発試験においても同様に血栓塞栓症が観察され、臨床試験が中止された（非特許文献４３）。これらのいずれの抗体の場合も、動物モデルなどを使ったその後の研究により、投与した抗体が血小板上のFcγRIIaに対する結合を介して血小板を凝集し、血栓を形成することが示唆されている（非特許

文献４４，非特許文献45）。自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデスにおいてはFcγRIIa依存的な機構によって血小板が活性化し、血小板の活性化が重症度と相関するという報告がある（非特許文献４６）。このような血栓塞栓症を発症するリスクが元々高い患者に対して、FcγRIIaに対する結合を増強させた抗体を投与することは、血栓塞栓症の発症リスクを一層高めることになり、極めて危険である。

[0016] また、FcγRIIaに対する結合を増強させた抗体はマクロファージを介した抗体依存的貪食活性（ADCP)が増強することが報告されている（非特許文献４７）。その抗体が結合する抗原がマクロファージによって貪食されると同時に、その抗体自身も貪食されると考えられる。抗体を医薬品として投与した場合、投与した抗体由来のペプチド断片も抗原提示されやすくなることが想定され、その抗体医薬品に対する抗体（抗医薬品抗体）の産生リスクを上昇させると考えられる。すなわち、FcγRIIaに対する結合を増強すると、抗医薬品抗体の産生リスクを高め、医薬品としての価値を著しく減じてしまう。また、樹状細胞上のFcγRIIbは抗原と抗体から成る免疫複合体による樹状細胞の活性化抑制、あるいは活性型Fcγレセプターを介したT細胞への抗原提示を抑制することで、末梢性トレランスに寄与していることが示唆されている（非特許文献４８）。樹状細胞上にはFcγRIIaも発現しているため、FcγRIIbに対して選択的に結合を増強したFcを持つ抗体を医薬品として用いる場合、FcγRIIbに対して選択的に結合が増強しているため、樹状細胞等に抗原提示されにくく、抗医薬品抗体産生のリスクも相対的に減弱でき、その点でも有用であると考えられる。

すなわち、FcγRIIaに対する結合を増強すると、血小板凝集を介した血栓形成のリスクを上昇させてしまう点、免疫原性が高くなり、抗医薬品抗体産生のリスクを高めてしまうという点で、医薬品としての価値を著しく減じてしまう。

[0017] このような観点から先のFcγRIIbに対する結合を増強したFc改変体についてみると、FcγRIIa R型に対する結合は天然型IgG1と比較して著しく増強さ

れているため、FcγRIIa R型を保有する患者への医薬品としては価値を著しく減じている。FcγRIIaのH型とR型とはCaucasianやAfrican-Americanでほぼ同程度の頻度で観察される（非特許文献４９、非特許文献 ５０）。このことから、このFc改変体を自己免疫疾患の治療に用いる場合に、医薬品としての効果を享受しつつ、安全に利用できる患者の数は限定的である。

[0018] また、FcγRIIbを欠損した樹状細胞、あるいは抗FcγRIIb抗体によりFcγRIIbと抗体のFc部分との相互作用が阻害された樹状細胞においては、樹状細胞の成熟が起こることが報告されている（非特許文献５１，非特許文献５２）。この報告から、FcγRIIbは炎症などが生じていない活性化していない定常状態において、樹状細胞の成熟を抑制していることが示唆される。樹状細胞表面にはFcγRIIbに加えて、FcγRIIaも発現していることから、例え抑制型のFcγRIIbに対する結合を増強したとしても、活性型のFcγRIIa等に対する結合も増強されていれば、結果として樹状細胞の成熟を促してしまうと考えられる。すなわち、FcγRIIbに対する結合活性だけではなく、FcγRIIaに対する結合活性に対してFcγRIIbに対する結合活性の比率を改善することが、抗体に免疫抑制的な作用をもたらす上では重要であると考えられる。

このことから、FcγRIIbの結合を介した免疫抑制的な作用を利用した医薬品の創出を考えた場合、FcγRIIbに対する結合活性を増強するのみならず、FcγRIIa H型、R型いずれの遺伝子多型に対しても結合を天然型IgG1と同程度に維持するか、それ以下に減弱したFc改変体が求められている。

[0019] これに対して、これまでにFc領域にアミノ酸改変を導入することで、FcγRIIbに対する結合の選択性を上昇させた例が報告されている（非特許文献５３）。しかし、この文献中で報告されているFcγRIIbに対する選択性が改善したとされるいずれの変異体においても、天然型IgG1と比べてFcγRIIbに対する結合が減少していた。そのため、これらの変異体が実際にFcγRIIbを介した免疫抑制的な反応をIgG1以上に引き起こすことは困難であると考えられる。

[0020] また先に述べたアゴニスト抗体においてもFcγRIIbは重要な役割を果たし

ているため、その結合活性の増強をすることで、アゴニスト活性の増強も期待される。しかしながら、FcγRIIaに対する結合も同様にして増強してしまうと、目的としないADCC活性やADCP活性などを発揮してしまい、副作用が出てしまう恐れがある。そのような観点からも、FcγRIIbに対して選択的に結合活性を増強できることが好ましい。

[0021] これらの結果から、FcγRIIbを利用した自己免疫疾患治療やがんの治療を目的とした抗体医薬を創製するにあたっては、天然型IgGと比較して、FcγRIIaのいずれの遺伝子多型に対しても結合活性が維持あるいは減少し、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強していることが重要である。しかし、FcγRIIbは活性型FcγRの1つであるFcγRIIaと、細胞外領域の配列が93%一致し、極めて構造が類似し、さらにFcγRIIaには遺伝子多型として131番目のアミノ酸がHisであるH type（H型）とArgであるR type（R型）とが存在し、それぞれで抗体との相互作用が異なる（非特許文献５４）。そのため、FcγRIIaとFcγRIIbの極めて類似する配列を区別しながら、FcγRIIaの両遺伝子多型と比較してFcγRIIbに対して選択的に結合を増強するFc領域改変体を創製することは、困難な課題であると考えられ、事実これまでにFcγRIIbに対する十分な結合活性と選択性を有する変異体は得られてこなかった。特許文献５には、FcγRIIbに対する結合活性が増強した変異体も報告されているが、その程度は弱く、上記のような性質を持つ変異体の開発が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0022] 特許文献1：WO 2000/42072

特許文献2：WO 2006/019447

特許文献3：WO 2004/99249

特許文献4：WO 2004/29207

特許文献5：US2009/0136485

非特許文献

[0023] 非特許文献1：Nat Biotechnol, 23, 1073-1078, 2005

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

非特許文献3：Chem Immunol, 65, 88-110, 1997

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

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

非特許文献6：Immunology, 86, 319-324, 1995

非特許文献7：Immunol Lett, 82, 57-65, 2002

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

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

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

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

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

非特許文献13：Science, 256, 1808-1812, 1992

非特許文献14：Nature, 368, 70-73, 1994

非特許文献15：Science, 290, 84-89, 2000

非特許文献16：J Imunol, 181, 5350-5359, 2008

非特許文献17：J Immunol, 163, 618-622, 1999

非特許文献18：J Exp Med, 189, 187-194, 1999

非特許文献19：J Exp Med, 191, 899-906, 2000

非特許文献20：Hum, Genet, 117, 220-227, 2005

非特許文献21：J Biol Chem, 282, 1738-1746, 2007

非特許文献22：Arthritis Rheum, 54, 3908-3917, 2006

非特許文献23：Nat Med, 11, 1056-1058, 2005

非特許文献24：J Immunol, 176, 5321-5328, 2006

非特許文献25：J Exp Med, 203, 2157-2164, 2006

非特許文献26：J Immunol. 178, 3272-3280, 2007

非特許文献27：Blood, 113, 3716-3725, 2009

非特許文献28：Mol Immunol, 45, 3926-3933, 2008

非特許文献29：J Allergy Clin Immunol, 2012, 129: 1102-1115

非特許文献30：Arthritis Rheum, 62, 1933-1943, 2010

非特許文献31：Immunol let, doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.008)

非特許文献32：J. Immunol, 2009, 183: 4509-4520

非特許文献33：J. Immunol, 2009, 182: 554-562

非特許文献34：Science, 333, 1030-1034, 2011

非特許文献35：Cancer Cell 19, 101-113, 2011

非特許文献36：J Clin Invest, 122 (3), 1066-1075, 2012

非特許文献37：J Immunol 171, 562-, 2003

非特許文献38：Blood, 108, 705-, 2006

非特許文献39：J Immunol 166, 4891, 2001

非特許文献40：doi: 10.1073/pnas.1208698109

非特許文献41：Immunol let, 2002, 143: 28-33

非特許文献42：J Natl Cancer Inst, 99, 1232-1239, 2007

非特許文献43：Arthritis Rheum, 48, 719-727, 2003

非特許文献44：J Thromb Haemost, 7, 171-181, 2008,

非特許文献45：J Immunol, 185, 1577-1583, 2010

非特許文献46：Sci Transl Med, vol 2, issue 47, 47-63, 2010

非特許文献47：Mol Cancer Ther 7, 2517-2527, 2008

非特許文献48：J. Immunol, 2007, 178: 6217-6226

非特許文献49：J Clin Invest, 97, 1348-1354, 1996

非特許文献50：Arthritis Rheum, 41, 1181-1189, 1998

非特許文献51：J Clin Invest 115, 2914-2923, 2005

非特許文献52：Proc Natl Acad Sci USA, 102, 2910-2915, 2005

非特許文献53：Mol Immunol, 40, 585-593, 2003

非特許文献54：J Exp Med, 172, 19-25, 1990

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0024] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、抗体

のFc領域にアミノ酸改変を導入することで、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、及び／又はFcγRIIa(R型)と比較した、FcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体、該Fc領域改変体を含むポリペプチド及び該ポリペプチドを含有する医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0025] 本発明者らは、Fc領域にアミノ酸改変を導入することで、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合が増強し、かつ、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体、当該Fc領域改変体を含むポリペプチドについて鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸が改変されているFc領域改変体に、他のアミノ酸改変を組み合わせることで、FcγRIIbに対する結合活性が増強及び／又は、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強することを見出した。

[0026] すなわち本発明は、以下に関する。

〔１〕 EUナンバリング238番目のアミノ酸、並びに、EUナンバリング233番目のアミノ酸、234番目のアミノ酸、235番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、265番目のアミノ酸、266番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、269番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、274番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、326番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、331番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸、334番目のアミノ酸、355番目のアミノ酸、356番目のアミノ酸、358番目のアミノ酸、396番目のアミノ酸、409番目のアミノ酸及び419番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されているFc領域改変体であって、該改変体のFcγレセプターに対する結合活性が〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が15.0以上となるFc領域改変体。

〔２〕　EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸が他のアミノ酸に改変され、更に、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されている、〔１〕に記載のFc領域改変体。

〔３〕　EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、並びに、233番目のアミノ酸がAsp、234番目のアミノ酸がTyr、235番目のアミノ酸がPhe、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、265番目のアミノ酸がGlu、266番目のアミノ酸がPhe、Leu又はMet、267番目のアミノ酸がAla、Glu、Gly又はGln、268番目のアミノ酸がAsp、Gln又はGlu、269番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro又はGln、274番目のアミノ酸がGln、296番目のアミノ酸がAsp又はPhe、326番目のアミノ酸がAla又はAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がLys、Arg又はSer、331番目のアミノ酸がSer、332番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、333番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、334番目のアミノ酸がArg、Ser又はThr、355番目のアミノ酸がAla、Gln、356番目のアミノ酸がGlu、358番目のアミノ酸がMet、396番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp又はTyr、409番目のアミノ酸がArg及び419番目のアミノ酸がGluであるアミノ酸群から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有しているFc領域改変体であって、該改変体のFcγレセプターに対する結合活性が〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が15.0以上となるFc領域改変体。

〔４〕　EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、及び、271番目のアミノ酸がGlyであって、更に、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のア

ミノ酸がAla又はGly、272番目のアミノ酸がAsp又はPro、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg、332番目のアミノ酸がThr、及び、396番目のアミノ酸がLeu又はMetであるアミノ酸群から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有している、〔３〕に記載のFc領域改変体。

〔５〕　〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が50.0以上である、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載のFc領域改変体。

〔６〕　〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が100.0以上である、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載のFc領域改変体。

〔７〕　〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa(R型)に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が10.0以上である、〔１〕から〔６〕のいずれかに記載のFc領域改変体。

〔８〕　〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa(R型)に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が20.0以上である、〔１〕から〔６〕のいずれかに記載のFc領域改変体。

〔９〕　前記Fc領域改変体が下記の（a)～(x）のいずれかに記載のアミノ酸改変が含まれる、〔１〕から〔８〕いずれかに記載のFc領域改変体。

(a)　Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(b)　Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(c)　Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(d)　Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番

目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、327番目及び330番目のアミノ酸改変

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、327番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び330番目のアミノ酸改変

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

〔１０〕 前記Fc領域改変体が、下記の (a)～(x) のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する、〔１〕から〔８〕いずれかに記載のFc領域改変体。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸

がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がGly又はAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目Arg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla又はGly、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMetであるアミノ酸配列

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸

がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がGly、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

〔１１〕 配列番号43～68、配列番号70、配列番号71および配列番号75～77から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるFc領域改変体。

〔１２〕　〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の少なくとも２つのFc領域改変体を含むポリペプチドであって、当該２つのFc領域改変体が会合しているポリペプチド。

〔１３〕　前記ポリペプチドに含まれる会合している２つのFc領域改変体が同一のアミノ酸配列である、〔１２〕に記載のポリペプチド。

〔１４〕　前記ポリペプチドに含まれる会合している２つのFc領域改変体が異なるアミノ酸配列である、〔１２〕に記載のポリペプチド。

〔１５〕　前記会合している２つのFc領域改変体のアミノ酸配列が、Fc領域改変体のEUナンバリング235番目のアミノ酸、236番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び239番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が異なるアミノ酸である、〔１４〕に記載のポリペプチド。

〔１６〕　会合している2つのFc領域改変体のいずれか一方のアミノ酸配列が、EUナンバリング235番目のアミノ酸がAsp、Gln、Glu又はThr、236番目のアミノ酸がAsn、237番目のアミノ酸がPhe又はTrp、238番目のアミノ酸がGlu、Gly又はAsn及び239番目のアミノ酸がAsp又はGluから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有しているアミノ酸配列である、〔１５〕に記載のポリペプチド。

〔１７〕　前記Fc領域改変体を含むポリペプチドがIgG抗体である、〔１２〕から〔１６〕のいずれかに記載のポリペプチド。

〔１８〕　前記Fc領域改変体を含むポリペプチドがFc融合タンパク質分子である、〔１２〕から〔１６〕のいずれかに記載のポリペプチド。

〔１９〕　〔１２〕から〔１８〕のいずれかに記載のポリペプチドを含有する医薬組成物。

[0027]　また本発明は、本発明のFc領域のアミノ酸改変を導入することによる、該Fc領域のFcγRIIbに対する結合活性を増強し、かつ、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性を増強する方法に関する。また、本発明のFc領域のアミノ酸改変を導入することによる、該Fc領域を含むポリペプチドに

対する抗体の産生を抑制する方法に関する。

[0028] また、本発明は、本発明のポリペプチドを含む免疫炎症性疾患の治療又は予防剤に関する。また、本発明のポリペプチドを対象へ投与する工程を含む、免疫炎症性疾患の治療方法または予防方法に関する。また本発明は、本発明のポリペプチドを含む、本発明の免疫炎症性疾患の治療方法または予防方法に用いるためのキットに関する。また本発明は、本発明のポリペプチドの、免疫炎症性疾患の治療剤または予防剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明の免疫炎症性疾患の治療方法または予防方法に使用するための、本発明のポリペプチドに関する。

[0029] また、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化抑制剤に関する。また、本発明のポリペプチドを対象へ投与する工程を含む、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化抑制方法に関する。また本発明は、本発明のポリペプチドを含む、本発明のB細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化抑制方法に用いるためのキットに関する。また本発明は、本発明のポリペプチドの、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化抑制剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明のB細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化抑制方法に使用するための、本発明のポリペプチドに関する。

[0030] また、本発明は、本発明のポリペプチドを含む生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療剤に関する。また、本発明のポリペプチドを対象へ投与する工程を含む、生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療方法に関する。また本発明は、本発明のポリペプチドを含む、本発明の生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療方法に用いるためのキットに関する。また本発明は、本発明のポリペプチドの、生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明の生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療方法に使用するための、本発明のポリペプチドに関する。

[0031] また、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、ウィルスの増殖抑制剤に関する。また、本発明のポリペプチドを対象へ投与する工程を含む、ウィルスの増殖抑制方法に関する。また本発明は、本発明のポリペプチドを含む、本発明のウィルスの増殖抑制方法に用いるためのキットに関する。また本発明は、本発明のポリペプチドの、ウィルスの増殖抑制剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明のウィルスの増殖抑制方法に使用するための、本発明のポリペプチドに関する。

発明の効果

[0032] 本発明によって、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、および/または、FcγRIIa(R型)と比較して、FcγRIIbに対する結合選択性を増強したFc領域改変体が提供された。該Fc領域改変体を含むポリペプチドを用いることにより、FcγRIIbのITIMのリン酸化を介した炎症性免疫反応の抑制性シグナルを増強することが可能となる。また、FcγRIIbに選択的に結合する性質をFc領域に付与することにより、抗医薬品抗体の産生の抑制が可能となる可能性がある。また、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する抗原結合ドメインを有するポリペプチドに本発明のFc領域改変体を利用することによって、血漿中に存在する当該ポリペプチドが結合する抗原の消失を促進させることが可能である。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]FcγRIIaの多型(R/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示すグラフである。

[図2]FcγRIIaの多型(H/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示すグラフである。

[図3]洗浄血小板膜表面のCD62p発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果

を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示す。

[図4]洗浄血小板膜表面の活性型インテグリン発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示す。

[図5]X線結晶構造解析によって決定されたFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の図である。Fc部分CH2ドメイン、CH3ドメインのそれぞれについて、向かって左側をドメインA、右側をドメインBとした。

[図6]X線結晶構造解析によって決定されたFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の構造とFc(WT)/FcγRIIa細胞外領域複合体の構造（PDB code:3RY6）を、Fc部分CH2ドメインAにおいてCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較した図である。図中太線で描画されたものがFc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体であり、細線で描画されたものがFc（WT）/ FcγRIIa細胞外領域複合体の構造である。なお、Fc(WT)/FcγRIIa細胞外領域複合体の構造においては、Fc部分CH2ドメインAのみを描画してある。

[図7]Fc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、FcγRIIbの160番目Tyrと主鎖部分において水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリング237番目Asp付近の構造の詳細を示した図である。

[図8]Fc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、FcγRIIbの160番目のTyrと主鎖部分で水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリング237番目Asp側鎖周囲のアミノ酸残基の構造を示した図である。

[図9]参考例７において示されたFc(P238D)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBにおいてCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、EUナンバリング266番目から271番目のループ周辺で比較した図である。本ループ中、Fc(P208)はFc(P238D)と比較し、EUナンバリング268番目の位置にH268Dの改変を、EUナンバリング271番目の位置にP271Gの改変を持

つ。

[図10]Fc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc部分CH2ドメインBのSer239周辺の構造を、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに示した図である。

[図11]X線結晶構造解析によって決定されたFc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の立体構造とFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造を、Cα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較した図である。

[図12]Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインAのEUナンバリング237番目Asp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図13]Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBのEUナンバリング237番目Asp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図14]G1dとG4dの定常領域の配列を比較した図である。図中、枠で囲んだアミノ酸は、G1dとG4dで異なるアミノ酸残基となっている部位を示す。

[図15]横軸は各改変体のFcgRIIbに対する結合量、縦軸は各改変体のFcgRIIaRに対する結合量の値を示す図である。図中に示した改変G237W, G237F, G236N, P238G, P238N, P238E, P238DはGpH7-B3に導入した改変を指す。またA5/B3はどちらの鎖にも改変を導入していない、GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0を示し、片鎖にのみP238Dを含む改変体とは、GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0を示す。

[図16]横軸は各改変体のFcgRIIbに対するKD値、縦軸は各改変体のFcgRIIaRに対するKD値を示す図である。図中のIL6R-B3/IL6R-LおよびIL6R-G1d/IL6R-Lは各改変体を評価する上で比較対象となる天然型ヒトIgGの配列を有する抗体を示す。またIL6R-BP264/IL6R-Lとは、各改変体を作製するうえで元となった改

変体である。IL6R-BP404/IL6R-Lは、IL6R-BP264/IL6R-Lに対して両鎖にL234Yを導入した改変体であり、改変導入前のIL6R-BP264/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が向上した改変体である。

[図17]FcγRIaとFcγRIIbに対する結合の比較を示す図であり、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した抗体およびEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した抗体の結合をラベルした。「mutation A」とは、EUナンバリングで238番目のProをAspに置換する改変を指し、「mutation B」とはEUナンバリングで328番目のLeuをGluに置換する改変を指す。

[図18]FcγRIIa H型とFcγRIIbに対する結合の比較を示す図であり、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した抗体およびEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した抗体の結合をラベルした。「mutation A」とは、EUナンバリングで238番目のProをAspに置換する改変を指し、「mutation B」とはEUナンバリングで328番目のLeuをGluに置換する改変を指す。

[図19]FcγRIIa R型とFcγRIIbに対する結合の比較を示す図であり、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した抗体およびEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した抗体の結合をラベルした。「mutation A」とは、EUナンバリングで238番目のProをAspに置換する改変を指し、「mutation B」とはEUナンバリングで328番目のLeuをGluに置換する改変を指す。

[図20]FcγRIIIaとFcγRIIbに対する結合の比較を示す図であり、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した抗体およびEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した抗体の結合をラベルした。「mutation A」とは、EUナンバリングで238番目のProをAspに置換する改変を指し、「mutation B」とはEUナンバリングで328番目のLeuをGluに置換する改変を指す。

[図21]IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の定常領域を構成するアミノ酸残基と、EUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係を表す図である。

[図22]横軸は各PD variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各PD variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値を表す図であ

る。各PD variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体であるIL6R-F652/IL6R-L（EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変Fc）の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各PD variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。図中のF652というプロットはIL6R-F652/IL6R-Lの値を示す。

[図23]縦軸は各改変をP238D改変を有さないGpH7-B3に導入した改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、横軸は各改変をP238D改変を有するIL6R-F652に導入した改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値を示す図である。なお、各改変体のFcγRIIbに対する結合量の値を、改変導入前の抗体のFcγRIIbに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を相対的な結合活性の値とした。ここで、P238Dを有さないGpH7-B3に導入した場合、P238Dを有するIL6R-F652に導入した場合共にFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮した改変は領域Aに含まれ、P238Dを有さないGpH7-B3に導入した場合にはFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮するが、P238Dを有するIL6R-F652に導入した場合にはFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮しない改変は領域Bに含まれる。

[図24]Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を表す図である。

[図25]Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、FcγRIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた図である。

[図26]Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造について、Fc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、P238D付近の詳細構造を比較した図である。

[図27]Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインAのEUナンバリング237番目のGlyの主鎖とFcγRIIbの160番目のTyrとの間に水素結合が認められることを示す図である。

[図28]Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2

ドメインBのEUナンバリング270番目のAspとFcγRIIbの131番目のArgとの間に静電的な相互作用が認められることを示す図である。

[図29]横軸は各2B variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各2B variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ示す図である。各2B variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体(EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変Fc)の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各2B variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。

[図30]Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリング233番目のGluとFcγRIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図31]Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリング330番目のAlaとFcγRIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図32]Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体および、Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、Fc Chain BのEUナンバリング271番目のProの構造を示した図である。

[図33]Fv4-IgG1、Fv4-P587が、ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図34]Fv4-IgG1、Fv4-P587が、ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与されたヒトIL-6Rの濃度推移を示す図である。

[図35]既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFcγRに対する結合を増強したイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体の投与により、血漿中から可溶型抗原が消失する非限定の作用メカニズムを表す図である。

[図36]Fv4-IgG1、Fv4-P587、Fv4-P587_LSが、ヒトFcgRIIbおよびヒトFcRnト

ランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図37]Fv4-IgG1、Fv4-P587、Fv4-P587_LSが、ヒトFcgRIIbおよびヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与されたヒトIL-6Rの濃度推移を示す図である。

発明を実施するための形態

[0034] 本発明は、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、および/または、FcγRIIa(R型)と比較した、FcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体、及び、当該Fc領域改変体を含むポリペプチドを提供する。

より具体的には、EUナンバリング238番目のアミノ酸改変と、他の特定のアミノ酸改変が組み合わされているアミノ酸配列を含むFc領域改変体、及び、当該Fc領域改変体を含むポリペプチドを提供する。さらに本発明は、Fc領域に該アミノ酸改変を導入することで、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性を増強させる、および／または、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性を増強させる方法を提供する。また本発明は、Fc領域に該アミノ酸改変を導入することで、生体に投与された場合に、アミノ酸改変が導入されていないFc領域と比較して、Fc領域に対する抗体の産生を抑制する方法を提供する。

[0035] 本発明における「ポリペプチド」とは、通常、10アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。また、通常、生物由来のポリペプチドであるが、特に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。

本発明のポリペプチドの好ましい例として、抗体を挙げることができる。更に好ましい例として、天然型IgG、特に天然型ヒトIgGを挙げることができる。天然型IgGとは、天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を包含し、免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属

するポリペプチドを意味する。例えば天然型ヒトIgGとは天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、天然型ヒトIgG4などを意味する。天然型IgGにはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。

抗体の軽鎖定常領域にはIgK(Kappa、κ鎖)、IgL1、IgL2、IgL3、IgL6、IgL7 (Lambda、λ鎖)タイプの定常領域が存在しているが、いずれの軽鎖定常領域であってもよい。ヒトIgK(Kappa)定常領域とヒトIgL7 (Lambda)定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。さらに、本発明において軽鎖定常領域は、アミノ酸の置換、付加、欠損、挿入および／または修飾などの改変が行われた軽鎖定常領域であってもよい。抗体のFc領域としては、例えばIgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgMタイプのFc領域が存在している。本発明の抗体のFc領域は、例えばヒトIgG抗体のFc領域を用いることができ、好ましくはヒトIgG1抗体のFc領域である。本発明のFc領域として、例えば、天然型IgGの定常領域、具体的には、天然型ヒトIgG1を起源とする定常領域（配列番号：11）、天然型ヒトIgG2を起源とする定常領域（配列番号：12）、天然型ヒトIgG3を起源とする定常領域（配列番号：13）、天然型ヒトIgG4を起源とする定常領域（配列番号：14）由来のFc領域を用いることができる。図21には天然型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4の定常領域の配列を示す。天然型IgGの定常領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体の定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリング３５６－３５８番目のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。

[0036] Fcγ受容体（本明細書ではFcγレセプター、FcγRまたはFcgRと記載することがある）とは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結

合し得る受容体をいい、実質的にFcγ受容体遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131（H型）およびR131（R型）を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。また、ヒトFcγRIIbにはスプライシングバリアントとしてFcγRIIb１とFcγRIIb２とが報告されている。また、それ以外にもFcγRIIb3というスプライシングバリアントも報告されている（J. Exp. Med, 1989, 170: 1369）。ヒトFcγRIIbにはこれのスプライシングバリアント、加えて、NCBIに登録されているNP_001002273.1、NP_001002274.1、NP_001002275.1、NP_001177757.1、NP_003992.3のスプライシングバリアントを全て含む。また、ヒトFcγRIIbには既存の報告されたあらゆる遺伝子多型を含み、FcγRIIb (Arthritis Rheum, 2003, 48: 3242-52, Hum Mol Genet, 2005, 14: 2881-92、Arthritis Rheum. 2002 May;46(5):1242-54.）も含まれ、また今後報告されるあらゆる遺伝子多型も含まれる。

FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来のものが含まれるが、これらに限定されず、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγ受容体の好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIA（CD32）、FcγRIIB（CD32）、FcγRIIIA（CD16）及び／又はFcγRIIIB（CD16）が挙げられる。

[0037] FcγRIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：１（NM_000566.3）及び２（NP_000557.1）に、

FcγRIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：３（BC020823.1）及び４（AAH20823.1）に、
FcγRIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：５（BC146678.1）及び６（AAI46679.1）に、
FcγRIIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：７（BC033678.1）及び８（AAH33678.1）に、及び
FcγRIIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：９（BC128562.1）及び１０（AAI28563.1）に記載されている（カッコ内はRefSeq登録番号を示す）。

[0038] 尚、FcγRIIaには、FcγRIIaの131番目のアミノ酸がヒスチジン（H型）あるいはアルギニン（R型）に置換された2種類の遺伝子多型が存在する（J. Exp. Med, 172, 19-25, 1990）。

[0039] 本明細書で「アミノ酸改変が導入されていないFc領域」とは、本発明のアミノ酸改変が導入される前のFc領域を意味する。本発明における「アミノ酸改変が導入されていないFc領域」は、例えば、天然型IgGのFc領域であってもよく、また天然型IgGに本発明のアミノ酸改変以外の改変が加えられたIgGのFc領域であってもよい。また、本発明において「Fc領域改変体」は、本発明のアミノ酸改変が導入されていないFc領域に、本発明の少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されているFc領域を意味する。ここで「少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されている」ことには、当該アミノ酸改変が導入されたFc領域及びそれと同一のアミノ酸配列からなるFc領域が含まれる。

[0040] 天然型IgGとは天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を包含し、免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。例えば天然型ヒトIgGとは天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、天然型ヒトIgG4などを意味する。天然型IgGにはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。

[0041] 天然型IgGのFc領域とは、天然に見出されるIgGを起源とするFc領域と同一

のアミノ酸配列を包含するFc領域を意味する。天然型IgGの重鎖定常領域は図２１（配列番号：１１～１４）に示しているが、例えば図２１の天然型ヒトIgG1を起源とする重鎖定常領域中のFc領域、天然型ヒトIgG2を起源とする重鎖定常領域中のFc領域、天然型ヒトIgG3を起源とする重鎖定常領域中のFc領域、天然型ヒトIgG4を起源とする重鎖定常領域中のFc領域を意味する。天然型IgGのFc領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。

[0042] 本発明において、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチド又はFc領域改変体が各種FcγRに対する結合活性が増強した、あるいは、結合活性が維持あるいは減少したかどうかは、例えば本実施例に示されるように、表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用した相互作用解析機器であるBIACOREを用いて、抗体をセンサーチップ上に固定化あるいはProteinA、ProteinL、ProteinA/G、ProteinG、抗lamda鎖抗体、抗kappa鎖抗体、抗原ペプチド、抗原タンパク質等でキャプチャーしたセンサーチップに対して各種FcγRをアナライトとして相互作用させたセンサーグラムの解析結果から得られる解離定数（KD）の値が低下した、あるいは増加したかどうかで判断可能である。または、センサーチップ上に固定化したあるいはProteinA、ProteinL、ProteinA/G、ProteinG、抗lamda鎖抗体、抗kappa鎖抗体、抗原ペプチド、抗原タンパク質等でキャプチャーしたセンサーチップ上の抗体に対して、各種FcγRをアナライトとして相互作用させた前後でのセンサーグラム上のレゾナンスユニット（RU）値の変化量を、センサーチップに抗体を固定化又はキャプチャーさせた前後でのレゾナンスユニット（RU）の変化量で割った値が低下した、あるいは増加したかどうかでも判断可能である。また、FcγRをセンサーチップに直接固定化した、あるいは抗タグ抗体などを介して固定化したセンサーチップを使って、評価したい抗体等の試料をアナライトとして相互作用させたセンサーグラムの解析から得られる解離定数（KD）の値が低下した、あるいは増加したかどうかで判断可能である。または、FcγRをセンサーチップに直接固定化した、あるいは抗タグ抗体などを介して固定化したセンサーチップに対して評価したい抗体等の試料をアナライトとして相互作用させた前後でのセンサ

ーグラムの値の変化量が低下した、あるいは増加したかどうかでも判断可能である。

[0043] 具体的には、Fc領域改変体のFcγ受容体に対する結合活性はELISAやFACS（fluorescence activated cell sorting）の他、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって測定することができる（Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010）。

[0044] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0045] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたポリペプチド会合体が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγ受容体が結合される。競合するFc領域改変体を含むポリペプチド会合体の非存在下では、野生型Fc領域を含むポリペプチド会合体とFcγ受容体とは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていない変異Fc領域を含むポリペプチド会合体は、野生型Fc領域を含むポリペプチド会合体とFcγ受容体間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合活性が決定され得る。抗体等のポリペプチド会合体をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fcγ受容体をGSTでタグ化する方法としては、Fcγ受容体をコードする

ポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウエアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0046] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムからセンサーチップ表面に捕捉したリガンドに対するアナライトの結合量が求められる。また、センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd) が、当該定数の比から解離定数（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。

[0047] FcγRに対する結合活性が減少したFc領域又は当該Fc領域を含むポリペプチドとは、アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチド(親Fc領域を含むポリペプチド又は親ポリペプチドともいう)と当該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を含むポリペプチド（Fc領域改変体を含むポリペプチド又は改変ポリペプチドともいう）の量を本質的に同じにしてアッセイを行った時に、親Fc領域を含むポリペプチドよりも本質的により弱い結合活性でFcγRと結合するFc領域改変体又は当該Fc領域改変体を含むポリペプチドをい

う。

[0048] また、FcγRに対する結合活性が増強したFc領域又は当該Fc領域を含むポリペプチドとは、親Fc領域を含むポリペプチドの量とFc領域改変体を含むポリペプチドの量を本質的に同じにしてアッセイを行った時に、親Fc領域を含むポリペプチドよりも本質的により強い結合活性でFcγRと結合するFc領域改変体又は当該Fc領域改変体を含むポリペプチドをいう。

[0049] FcγRに対する結合活性が維持した（維持された）ポリペプチドとは、親Fc領域を有するポリペプチドとFc領域改変体を含むポリペプチドの量を本質的に同じにしてアッセイを行った時に、親ポリペプチドと本質的に変化のない、同等の結合活性でFcγRと結合するものをいう。

[0050] 本発明において、FcγRIIbに対する結合活性が増強したとは、例えば、上記の測定法で測定したKD値において、〔親Fc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕のKD値比が、好ましくは15.0以上、20.0以上、25.0以上、30.0以上、35.0以上、40.0以上、45.0以上、さらに50.0以上、55.0以上、60.0以上、65.0以上、70.0以上、75.0以上、80.0以上、85.0以上、90.0以上、95.0以上、100.0以上となることが好ましい。

[0051] また本発明のFc領域改変体が、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が増強したとは、

(i) FcγRIIbに対する結合活性が増強し、FcγRIIaに対する結合活性は維持又は減少する、

(ii) FcγRIIbに対する結合活性が増強し、FcγRIIaに対する結合活性も増強するが、FcγRIIaに対する結合活性の増強の程度がFcγRIIbに対する結合活性の増強の程度よりも低い、あるいは、

(iii) FcγRIIbに対する結合活性は減少しているが、当該結合活性の減少の程度がFcγRIIaに対する結合活性の減少の程度よりも低い、

ことを意味する。本発明のFc領域改変体が、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が増強したかどうかは、例えば、上記例に従って求めた、本発

明のFc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIaに対するKD値とFcγRIIbに対するKD値との比（FcγRIIaに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値）と親Fc領域を含むポリペプチドのFcγRIIaに対するKD値とFcγRIIbに対するKD値との比（FcγRIIaに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値）を比較することによって判断することが可能である。具体的には、上記のKD値比の値が親Fc領域を含むポリペプチドに比べて本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドで大きくなった場合、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、親Fc領域改変体を含むポリペプチドに比べて、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が増強したと判断することができる。特にFcγRIIa(R型)に対する結合活性は、FcγRIIa(H型)に対するものよりも、FcγRIIbに対する結合活性と相関しやすいため、FcγRIIa(R型)よりもFcγRIIbに対する結合選択性を増強できるアミノ酸改変を見出すことが、FcγRIIb以外の他のFcγRよりもFcγRIIbに対する結合選択性を増強させる上で重要である。

FcγRIIa（R型）とFcγRIIbの間での結合選択性としては、例えば、上記の測定法で測定したKD値において、〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa（R型）に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕のKD値比が、好ましくは10.0以上さらに好ましくは、20.0以上である。

FcγRIIa（H型）とFcγRIIbの間での結合選択性としては、例えば、上記の測定法で測定したKD値において、〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa（H型）に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕のKD値比が、好ましくは100.0以上、200以上、300以上、400以上、500以上、さらに好ましくは、600以上、700以上、800以上、900以上である。

[0052] また本発明のポリペプチドの各種FcγRに対する結合活性が維持、増強、あるいは減少したかどうかは、上記例に従って求めた各種FcγRの本発明のポリペプチドに対する結合量の増減により判断することもできる。ここで、各種FcγRのポリペプチドに対する結合量は、各ポリペプチドに対してアナライト

である各種FcγRを相互作用させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差を、センサーチップにポリペプチドを捕捉させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差で割った値を意味する。

[0053] また本発明のFc領域改変体としては、FcγRIIbに対するKD値（mol/L）に特に制限はないが、例えば9×10^{-7}以下であってよく、好ましくは5×10^{-7}以下、より好ましくは3×10^{-7}以下、より好ましくは1×10^{-7}以下、より好ましくは5×10^{-8}以下である。

[0054] 「Fc領域」は、抗体分子中の、ヒンジ部若しくはその一部、CH2、CH3ドメインからなるフラグメントのことをいう。IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリング（本明細書ではEU INDEXとも呼ばれる）（図２１参照）で、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。

[0055] Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体等をペプシン等の蛋白質分解酵素にて部分消化した後に、プロテインAカラムに吸着された画分を再溶出することによって好適に取得され得る。かかる蛋白分解酵素としてはpH等の酵素の反応条件を適切に設定することにより制限的にFabやF(ab')2を生じるように全長抗体を消化し得るものであれば特段の限定はされず、例えば、ペプシンやパパイン等が例示できる。

[0056] 本発明は、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のFc領域に対して、EUナンバリング238番目のアミノ酸の他のアミノ酸への改変と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、234番目のアミノ酸、235番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、265番目のアミノ酸、266番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、269番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、274番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、326番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、331番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸、334番目のアミノ酸、355番目のアミノ酸、356番目のアミノ酸、358番目のアミノ酸、396番目のアミノ酸、409番目のアミノ酸及び419番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸の

他のアミノ酸への改変とを組み合わせた改変を含むFc領域改変体を提供する。ヒトIgGのFc領域にEUナンバリング238番目のアミノ酸の他のアミノ酸への改変と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、234番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、265番目のアミノ酸、266番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、269番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、274番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、326番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、331番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸、334番目のアミノ酸、355番目のアミノ酸、356番目のアミノ酸、358番目のアミノ酸、396番目のアミノ酸、409番目のアミノ酸及び419番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸の他のアミノ酸への改変とを組み合わせることにより、当該アミノ酸改変の導入されていないFc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、および／または、FcγRIIaと比較して、FcγRIIbに対する結合選択性、特にFcγRIIa(R型)に対する選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドを提供することが可能である。EUナンバリング238番目のアミノ酸改変と組み合わされる他のアミノ酸改変としては、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸が好ましく、特に、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸が好ましい。特に、EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸とを組み合わせた改変が、FcγRIIbに対する

結合活性を増強させる、あるいは、FcγRIIaと比較した場合のFcγRIIbに対する結合選択性を増強させる観点から、好ましいアミノ酸改変の組合せとして挙げられる。

[0057] 改変されるアミノ酸は、改変前と比較してFcγRIIbに対する結合活性が増強、あるいは、FcγRIIaと比較して、FcγRIIbに対する結合選択性が増強するものであれば特に限定されないが、EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、234番目のアミノ酸がTyr、235番目のアミノ酸がPhe、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、265番目のアミノ酸がGlu、266番目のアミノ酸がPhe、Leu又はMet、267番目のアミノ酸がAla、Glu、Gly又はGln、268番目のアミノ酸がAsp、Gln又はGlu、269番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro又はGln、274番目のアミノ酸がGln、296番目のアミノ酸がAsp又はPhe、326番目のアミノ酸がAla又はAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がLys、Arg又はSer、331番目のアミノ酸がSer、332番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、333番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、334番目のアミノ酸がArg、Ser又はThr、355番目のアミノ酸がAla、Gln、356番目のアミノ酸がGlu、358番目のアミノ酸がMet、396番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp又はTyr、409番目のアミノ酸がArg、419番目のアミノ酸がGluであることが好ましい。特に、EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸とを組み合わせる場合は、EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla又はGly、272番目のアミノ酸がAsp又はPro、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly

、330番目のアミノ酸がArg、332番目のアミノ酸がThr、396番目のアミノ酸がLeu又はMetであることが好ましい。

[0058] 本発明は、これらの改変に加えて、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変を加えることが可能である。FcγRIIbに対する結合活性を増強、及び/又は、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性を増強させるものであれば特に限定されない。また、改変は、Fc領域の一部を、アイソタイプの異なる他のFc領域の該当する部位に置き換える改変と組み合わせて行うこともできる。例えば、IgG１由来のFc領域のEUナンバリング118番目のAlaから225番目のThrまでのアミノ酸配列のIgG4由来のFc領域のEUナンバリング118番目のAlaから222番目のProまでのアミノ酸配列への置換と上述のアミノ酸改変を組み合わせることで、FcγRIIbへの結合活性及び/又はFcγRIIbへの結合選択性を増強させることも可能である。具体的には、例えば、実施例7に記載のIL6R-BP478/IL6R-Lのように、IL6R-BP230で導入されているアミノ酸改変と、G1dのEUナンバリング118番目のAlaから225番目のThrまでのアミノ酸配列をG4dのEUナンバリング118番目のAlaから222番目のProまでのアミノ酸配列に置換する改変の組み合わせが挙げられる。

[0059] これらの中でも、よりFcγRIIbに対する結合活性が増強する改変、あるいは、よりFcγRIIa（R型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が増強する改変が好ましい。このような好ましいアミノ酸改変の組み合わせとしては、例えば以下の(a)～(x)の組み合わせが挙げられる。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、327番目及び330番目のアミノ酸改変

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、327番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番

目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び330番目のアミノ酸改変

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

[0060] 更に、これらの改変の組み合わせの中でも以下の(a)～(x)のアミノ酸改変の組み合わせがより好ましい組み合わせとして挙げられる。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミ

ノ酸がGly又はAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目Arg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸

がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla又はGly、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMetであるアミノ酸配列

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミ

ノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がGly、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

[0061] また本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドには他の目的で行われるアミノ酸改変を組み合わせることもできる。例えばFcRnに対する結合活性を向上させるアミノ酸置換（J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56、J Biol Che

m. 2006 Aug 18;281(33):23514-24.、Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69.、Nat Biotechnol. 2010 Feb;28(2):157-9.、WO/2006/019447、WO/2006/053301、WO/2009/086320）、抗体のヘテロジェニティーや安定性を向上させるためのアミノ酸置換（WO/2009/041613）を加えてもよい。あるいは、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドに、WO2011/122011、PCT/JP2011/072550に記載の抗原の消失を促進するための性質を付与したポリペプチドや、WO2009/125825、WO2012/073992、WO2013/047752に記載の複数分子の抗原に繰り返し結合するための性質を付与したポリペプチドも本発明に含まれる。あるいは、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドに、血中滞留性を高める目的で定常領域のpIを低下させるアミノ酸改変（WO/2012/016227）を組み合わせてもよい。あるいは、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドに、使って他の抗原に対する結合能を持たせる目的でCH3にEP1752471、EP1772465に記載のアミノ酸改変を組み合わせてもよい。

[0062] 本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドが、抗体のような抗原結合分子である場合には、抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果を高めるために、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるためのアミノ酸改変を組み合わせることができる。より具体的には、例えば、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるために用いられる改変としては、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法（Nat Biotechnol, 2010 28:157-159.）、434位のAsnをAlaに置換する方法（Drug Metab Dispos. 2010 Apr;38(4):600-5.）、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法（J Biol Chem, 2006, 281:23514-23524）、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法（J Immunol. 2006, 176(1):346-56）、434位のAsnをHisに置換する方法(Clinical Pharmacology & Therapeutics (2011) 89(2):283-290.)、ならびにWO2010106180、WO2010045193、WO2009058492、 WO2008022152、WO2006050166、WO2006053301、WO2006031370、WO2005123780、WO2005047327、WO2005037867、WO2004035752、WO2002060919などにおい

て記載されるような改変を用いることによっても実施が可能であると考えられる。

[0063] また、近年、ヒト化抗CD4抗体に対して、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強し、血漿中滞留性を向上させるために、EUナンバリングで表される434位のAsnをHisに置換した抗体分子が、リウマチ因子（Rheumatiod factor、RF）に対して結合することが報告された(Clin Pharmacol Ther. 2011 Feb;89(2):283-90)。この抗体はヒトIgG1のFc領域を有しているが、FcRnに対する結合部位に位置する434位のAsnをHisに置換することにより、その置換箇所を認識するリウマチ因子が結合することが示されている。

[0064] 上述の通り、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強するための改変として、様々なものが報告されているが、これらの改変をFc領域の中のFcRn結合部位に導入することによって、当該部位を認識するリウマチ因子に対する結合性を増強してしまう可能性がある。

しかしながら、Fc領域の当該部位に、FcRnに対する結合活性を低下させることなく、リウマチ因子に対する結合活性のみを低下させる改変を導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を持たずにpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強させた抗原結合分子を作製することが可能である。

[0065] そのような、リウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変としては、EUナンバリングによって表される248-257, 305-314, 342-352, 380-386, 388, 414-421, 423, 425-437, 439, 441-444位への改変が用いられる。好ましくは、387, 422, 424, 426, 433, 436, 438, 440位への改変が好ましく用いられる。特に好ましくは、422位のValをGluまたはSerに置換する改変、424位のSerをArgに置換する改変、433位のHisをAspに置換する改変、436位のTyrをThrへ置換する改変、438位のGlnをArgまたはLysに置換する改変、440位のSerをGluまたはAspに置換する改変が用いられる。これらの改変は、単独で用いられても良いし、複数箇所を組み合わせて用いても良い。

[0066] あるいは、リウマチ因子に対する結合活性を低下させるために、当該部位

にN型糖鎖の付加配列を導入しても良い。具体的には、N型糖鎖付加配列としてAsn-Xxx-Ser/Thr（XxxはProを除く任意のアミノ酸）が知られているが、この配列をFc領域の当該部位に導入することによりN型糖鎖を付加させ、N型糖鎖の立体障害によってRFとの結合を阻害することが可能である。N型糖鎖を付加するための改変として、好ましくは、248位のLysをAsnに置換する改変、424位のSerをAsnに置換する改変、436位のTyrをAsnに置換し438位のGlnをThrに置換する改変、438位のGlnをAsnに置換する改変が用いられる。特に好ましくは、424位のSerをAsnに置換する改変が用いられる。

[0067] 本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドの好ましい例として、IgG抗体のように、少なくとも２つのFc領域改変体を含むポリペプチドであって、当該２つのFc領域改変体が会合しているポリペプチドを挙げることができる。本発明のポリペプチドとしてIgG抗体を用いる場合、その定常領域の種類は限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのアイソタイプ（サブクラス）のIgGを用いることが可能である。本発明のIgG抗体は、好ましくはヒトIgGであり、さらに好ましくはヒトIgG1、ヒトIgG4であり、ヒトIgG1及びヒトIgG4の重鎖定常領域のアミノ酸配列は公知である。ヒトIgG1定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。

[0068] 前記ポリペプチドに含まれる会合している２つのFc領域改変体は、同一のアミノ酸改変が導入されているFc領域改変体であってもよい（以下、ホモFc領域改変体を含むポリペプチドという）し、それぞれ異なるアミノ酸改変が導入された異なるアミノ酸配列からなるFc領域改変体であってもよく、また、いずれか一方のFc領域にのみアミノ酸改変が導入された異なるアミノ酸配列からなるFc領域改変体であってもよい（以下、ヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドという）。いずれか一方のFc領域にのみ導入されるアミノ酸改変としては、FcγRIIb及びFcγRIIaとの結合に関与しているFc領域の CH2ドメインのEUナンバリング233番目から239番目のループ構造部位が好ましく、

一方のFc領域におけるCH2領域のループ構造をFcγRIIbに対する結合活性が増強、および／または、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強する改変を導入し、もう一方のFc領域におけるCH2領域のループ構造を不安定化させるようなアミノ酸改変を導入することが好ましい。CH2領域のループ構造を不安定化させるようなアミノ酸改変としては、例えば、EUナンバリング235番目のアミノ酸、236番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び239番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することでループ構造を不安定化することが可能である。具体的には、例えば、EUナンバリング235番目のアミノ酸がAsp、Gln、Glu又はThrに改変されている、236番目のアミノ酸がAsnに改変されている、237番目のアミノ酸がPhe又はTrpに改変されている、238番目のアミノ酸がGlu、Gly又はAsnに改変されている、及び、239番目のアミノ酸がAsp又はGluに改変されていることによって、CH2領域のループ構造を不安定化させることが可能である。

[0069] 本発明のヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドを作製するには互いに異なるアミノ酸を有するFc領域改変体同士を会合化させる、あるいは目的のヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドを他のホモFc領域改変体を含むポリペプチドから分離する必要がある。

[0070] 異なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化には、抗体H鎖の第二の定常領域（CH2）又はH鎖の第三の定常領域（CH3）の界面に電荷的な反発を導入して目的としないH鎖同士の会合を抑制する技術を適用することができる（WO2006/106905）。

[0071] CH2又はCH3の界面に電荷的な反発を導入して意図しないH鎖同士の会合を抑制させる技術において、H鎖の他の定常領域の界面で接触するアミノ酸残基としては、例えばCH3領域におけるEUナンバリング356番目の残基、EUナンバリング439番目の残基、EUナンバリング357番目の残基、EUナンバリング370番目の残基、EUナンバリング399番目の残基、EUナンバリング409番目の残基に相対する領域を挙げることができる。

[0072] より具体的には、例えば、２種のH鎖CH3領域を含む抗体においては、第１のH鎖CH3領域における以下の（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組から選択される１組ないし３組のアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体とすることができる；

（１）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング356位および439位のアミノ酸残基、

（２）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング357位および370位のアミノ酸残基、

（３）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング399位および409位のアミノ酸残基。

[0073] 更に、上記第１のH鎖CH3領域とは異なる第２のH鎖CH3領域における前記（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第１のH鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組に対応する１組ないし３組のアミノ酸残基が、前記第１のH鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する抗体とすることができる。

[0074] 上記（１）～（３）に記載のそれぞれのアミノ酸残基は、会合した際に互いに接近している。当業者であれば、所望のH鎖CH3領域またはH鎖定常領域について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、上記（１）～（３）に記載のアミノ酸残基に対応する部位を見出すことができ、適宜、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0075] 上記抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」は、例えば、以下の（X）または（Y）のいずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択されることが好ましい；

（X）グルタミン酸（E）、アスパラギン酸（D）、

（Y）リジン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）。

[0076] 上記抗体において、「同種の電荷を有する」とは、例えば、２つ以上のアミノ酸残基のいずれもが、上記（X）または（Y）のいずれか１の群に含まれ

るアミノ酸残基を有することを意味する。「反対の電荷を有する」とは、例えば、２つ以上のアミノ酸残基のなかの少なくとも１つのアミノ酸残基が、上記（X）または（Y）のいずれか１の群に含まれるアミノ酸残基を有する場合に、残りのアミノ酸残基が異なる群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。

[0077] 好ましい態様において上記抗体は、第１のH鎖CH3領域と第２のH鎖CH3領域がジスルフィド結合により架橋されていてもよい。

[0078] 本発明において改変に供するアミノ酸残基としては、上述した抗体の可変領域または抗体の定常領域のアミノ酸残基に限られない。当業者であれば、ポリペプチド変異体または異種多量体について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、界面を形成するアミノ酸残基を見出すことができ、会合を制御するように、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0079] 本発明のヘテロFc領域改変体の会合化には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖の可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、もう一方のH鎖の相対する可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換することによって、突起が空隙に配置され得るようにすることで効率的にFc領域を有する異なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化を起こすことができる（WO1996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）。

[0080] これに加えて、ヘテロFc領域改変体の会合化には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖のCH3の一部をその部分に対応するIgA由来の配列にし、もう一方のH鎖のCH3の相補的な部分にその部分に対応するIgA由来の配列を導入したstrand-exchange engineered domain CH3を用いることで、異なる配列を有するポリペプチドの会合化をCH3の相補的な会合化によって効率的に引き起こすことができる（Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。この公知技術を使っても効率的にFc領域を有する異

なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化を起こすことができる。

WO2011/028952に記載の抗体のCH1とCLの会合化、VH、VLの会合化を利用したヘテロ二量化抗体作製技術も用いることができる。

WO2008/119353、WO2011/131746に記載の方法のように、二種類のホモ二量化抗体を予め作製し、それらを還元条件下でインキュベーションすることで、非会合化させ、再び会合化させることでヘテロ二量化抗体を作製する技術を用いることもできる。

また、J. Mol. (2012) 420, 204-219に記載の方法のように、IgG1、IgG2のCH3に電荷的に反発するようにLys、Arg、Glu、Aspのように電荷を有する残基を導入して、ヘテロ二量化抗体を作製する技術を用いることもできる。

また、WO2012/058768に記載の方法のように、CH2、CH3領域に改変を加えることで、ヘテロ二量化抗体を作製する技術を用いることもできる。

[0081] また、ヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドを効率的に形成することができない場合であっても、ヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドをホモFc領域改変体を含むポリペプチドと分離、精製することによってもヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドを得ることが可能である。互いに配列の異なる第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドから成るヘテロFc領域改変体を含むポリペプチドを作製する際には、2つの第一のポリペプチドのみからなるホモFc領域を含むポリペプチド、2つの第二のポリペプチドのみからなるホモFc領域を含むポリペプチドが不純物として混入する。これら2種類のホモFc領域を含むポリペプチドを効率的に除去する方法として、公知技術を使うことができる。2種類のH鎖の可変領域にアミノ酸置換を導入し等電点の差を付与することで、2種類のホモ体と目的のヘテロ二量化抗体をイオン交換クロマトグラフィーで精製可能にする方法が報告されている（WO2007114325）。ヘテロ二量化抗体を精製する方法として、これまでに、プロテインAに結合するマウスIgG2aのH鎖とプロテインAに結合しないラットIgG2bのH鎖からなるヘテロ二量化抗体をプロテインAを用いて精製する方法が報告されている(WO98050431, WO95033844)。

[0082] また、IgGとProteinAの結合部位であるEUナンバリング435番目および436番目のアミノ酸残基を、Tyr、HisなどのProteinAへの結合力の異なるアミノ酸に置換したH鎖を用いることで、各H鎖とProtein Aとの相互作用を変化させ、Protein Aカラムを用いることで、ヘテロ二量化抗体のみを効率的に精製することもできる。

[0083] これらの置換、技術を複数、例えば2個以上組合せて用いることができる。またこれらの改変は、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドに適宜別々に加えることができる。なお、本発明のポリペプチドは、上記改変が加えられたものをベースにして作製したものであってもよい。

[0084] 本発明においてアミノ酸の改変とは、置換、欠損、付加、挿入あるいは修飾のいずれか、又はそれらの組み合わせを意味する。本発明においては、アミノ酸の改変はアミノ酸の変異と言い換えることが可能であり、同じ意味で使用される。

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

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

(b) 標的部位における電荷若しくは疎水性、または

(c) 側鎖の大きさ。

[0085] アミノ酸残基は一般の側鎖の特性に基づいて以下のグループに分類される：

(1) 疎水性： ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性親水性： cys、ser、thr、asn、gln；

(3) 酸性： asp、glu；

(4) 塩基性： his、lys、arg；

(5) 鎖の配向に影響する残基： gly、pro；及び

(6) 芳香族性： trp、tyr、phe。

[0086] これらの各グループ内でのアミノ酸残基の置換は保存的置換と呼ばれ、一

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

[0087] アミノ酸配列の改変は、当分野において公知の種々の方法により調製される。これらの方法には、次のものに限定されるわけではないが、部位特異的変異誘導法 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492) 、PCR変異法、カセット変異法等の方法により行うことができる。

[0088] 本発明のアミノ酸の修飾には、翻訳後修飾が含まれる。具体的な翻訳後修飾として、糖鎖の付加あるいは欠損を示すことができる。たとえば、配列番号：１１に記載のアミノ酸配列からなるIgG1定常領域において、EUナンバリングの297番目のアミノ酸残基は、糖鎖で修飾されたものであることができる。修飾される糖鎖構造は限定されない。一般的に、真核細胞で発現される抗体は、定常領域に糖鎖修飾を含む。したがって、以下のような細胞で発現される抗体は、通常、何らかの糖鎖で修飾される。

・哺乳動物の抗体産生細胞

・抗体をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された真核細胞

[0089] ここに示した真核細胞には、酵母や動物細胞が含まれる。たとえばCHO細胞

やHEK293H細胞は、抗体をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換するための代表的な動物細胞である。他方、当該位置に糖鎖修飾が無いものも本発明の定常領域に含まれる。定常領域が糖鎖で修飾されていない抗体は、抗体をコードする遺伝子を大腸菌などの原核細胞で発現させて得ることができる。

[0090] より具体的には、例えばFc領域の糖鎖にシアル酸を付加したものであってもよい（MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):519-27.）。

[0091] さらに、本発明は上述のいずれかに記載のFc領域改変体を含む抗体を提供する。

[0092] 本発明における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、抗体変異体、抗体断片、多特異性抗体（多重特異性抗体）（例えば、二特異性抗体（二重特異性抗体））、キメラ抗体、ヒト化抗体等、如何なる抗体も含まれる。

[0093] 本発明の抗体は、抗原の種類、抗体の由来などは限定されず、いかなる抗体でもよい。抗体の由来としては、特に限定されないが、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体などを挙げることができる。

[0094] 抗体を作製する方法は当業者によく知られているが、例えばモノクローナル抗体の場合ハイブリドーマ法（Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)）、組換え方法（米国特許第4,816,567号）により製造してもよい。また、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい（Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) ; Marks et al., J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991)）。

[0095] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。

[0096] ３つのCDRと４つのFRが連結された抗体可変領域をコードするDNAとヒト抗体定常領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト化抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP 239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0097] 必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。

[0098] ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0099] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388参照）。

[0100] 本発明の抗体を構成する可変領域は、任意の抗原を認識する可変領域であることが出来る。

[0101] 本明細書において抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、リガンド（サイトカイン、ケモカインなど）、受容体、癌抗原、MHC抗原、分化抗原、免疫グロブリンおよび免疫グロブリンを一部に含む免疫複合体が好適に挙げられる。

[0102] サイトカインの例としては、インターロイキン１～１８、コロニー刺激因子（G-ＣＳＦ、M-ＣＳＦ、ＧM-ＣＳＦなど）、インターフェロン（ＩＦＮ-α、ＩＦN-β、ＩＦN-γ、など）、成長因子（ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＩＧＦ、ＮＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ、ＨＧＦなど）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ-α、ＴＮＦ-β）、リンホトキシン、エリスロポエチン、レプチン、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＭＣＡＦ、ＢＭＰを挙げることができる。

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

[0103] 受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては、多数の文献、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. New Comprehesive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II" pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV.、Patthy (Cell (1990) 61 (1), 13-14)、Ullrichら (Cell (1990) 61 (2), 203-212)、Massague (eにはアキュート・アクセント記号が付く) (Cell (1992) 69 (6), 1067-1070)、Miyaji

maら（Annu. Rev. Immunol.（1992）10, 295-331）、Tagaら（FASEB J.（1992）6, 3387-3396）、Fantlら（Annu. Rev. Biochem.（1993）, 62, 453-481）、Smithら（Cell（1994）76（6）959-962）、Flower DR.（Biochim. Biophys. Acta（1999）1422（3）207-234）等に記載されている。

[0104] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン（EPO）受容体（Blood（1990）76（1）, 31-35、Cell（1989）57（2）, 277-285）、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）受容体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.（1990）87（22）, 8702-8706、mG-CSFR、Cell（1990）61（2）, 341-350）、ヒト又はマウストロンボポイエチン（TPO）受容体（Proc Natl Acad Sci U S A.（1992）89（12）, 5640-5644、EMBO J.（1993）12(7), 2645-53）、ヒト又はマウスインスリン受容体（Nature（1985）313（6005）, 756-761）、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.（1994）91（2）, 459-463）、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子（PDGF）受容体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.（1988）85（10）3435-3439）、ヒト又はマウスインターフェロン（IFN）-α、β受容体（Cell（1990）60（2）, 225-234.及びCell（1994）77（3）, 391-400）、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン（GH）受容体、ヒト又はマウスインターロイキン（IL）-10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子（IGF）-I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子（LIF）受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子（CNTF）受容体等が好適に例示される。

[0105] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原であり、癌糖鎖抗原とも呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、上記の受容体としてGPIアンカー型受容体ファミリーに属するが肝癌を初めとする幾つかの癌において発現しているGPC3（Int J Cancer.（2003）103（4）, 455-65）、肺癌を初めとする複数の癌で発現するEpCAM（Proc Natl Acad Sci U S A.（1989）86（1）, 27-31）、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA

-1（SLX）等が好適に挙げられる。

[0106] MHC抗原は、主にMHC class I抗原とMHC class II抗原に分類され、MHC class I抗原には、HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G、-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR、-DQ、-DPが含まれる。

[0107] 分化抗原には、CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15s、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD23、CD25、CD28、CD29、CD30、CD32、CD33、CD34、CD35、CD38、CD40、CD41a、CD41b、CD42a、CD42b、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD64、CD69、CD71、CD73、CD95、CD102、CD106、CD122、CD126、CDw130が含まれ得る。

[0108] 免疫グロブリンにはIgA、IgM、IgD、IgG、IgEが含まれる。また免疫複合体は少なくとも免疫グロブリンのいずれかの成分を含む。

その他の抗原としては下記のような分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファーV/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン（Osteogenin）、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神

経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3（C3）、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原（CEA）、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33（p67タンパク質）、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80（B7-1）、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子（Decay accelerating factor）、des（1-3）-IGF-I（脳IGF-1）、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR（ErbB-1）、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2

、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3（Vgr-2）、GDF-5（BMP-14、CDMP-1）、GDF-6（BMP-13、CDMP-2）、GDF-7（BMP-12、CDMP-3）、GDF-8（ミオスタチン）、GDF-9、GDF-15（MIC-1）、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa（GPIIb/IIIa）、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン（NP-capまたはNIP-cap）、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子（HGF）、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、Her4（ErbB-4）、単純ヘルペスウイルス（HSV） gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ヒト成長ホルモン（HGH）、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン（INF）-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、L

ECT2、レフティ、ルイスーY抗原、ルイスーY関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミュラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニュールツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGFーベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PlGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質ー72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc

、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4) 、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B) 、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID) 、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUNDD) 、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCE R) 、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1) 、TNFRSF12 (TWEAK R FN14) 、TNFRSF13B (TACI) 、TNFRSF13C (BAFF R) 、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2) 、TNFRSF16 (NGFR p75NTR) 、TNFRSF17 (BCMA) 、TNFRSF18 (GITR AITR) 、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE) 、TNFRSF19L (RELT) 、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60) 、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80) 、TNFRSF26 (TNFRH3) 、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R) 、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R) 、TNFRSF5 (CD40 p50) 、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95) 、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6) 、TNFRSF7 (CD27) 、TNFRSF8 (CD30) 、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA) 、TNFRSF21 (DR6) 、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2) 、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1) 、TNFRSF25 (DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1) 、TNFSF10 (TRAIL Apo-2リガンド、TL2) 、TNFSF11 (TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド) 、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド) 、TNFSF13 (APRIL TALL2) 、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20) 、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド、LTg) 、TNFSF15 (TL1A/VEGI) 、TNFSF18 (GITRリガンド AITRリガンド、TL6) 、TNFSF1A (TNF-a コネクチン (Conectin) 、DIF、TNFSF2) 、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1) 、TNFSF3 (LTb TNFC、p33) 、TNFSF4 (OX40リガンド gp34、TXGP1) 、TNFSF5 (CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP) 、TNFSF6 (Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド) 、TNFSF7 (CD27リガンド CD70) 、TNFSF8 (CD30リガンド CD153) 、TNFSF9 (4-1BBリガンド CD137リガンド) 、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEFGR-1 (flt-1) 、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4) 、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン

・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B／13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aβ、CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG、Hsp90, IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL, PCSK9, prekallikrein , RON, TMEM16F、SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B、tau, VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdin、sclerostin、fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 組織因子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, トロンボモデュリン、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pならびにホルモンおよび成長因子のための受容体が例示され得る。

[0109] 可変領域を構成するアミノ酸配列は、その抗原結合活性が維持される限り、１または複数のアミノ酸残基の改変が許容される。可変領域のアミノ酸配列を改変する場合、改変される部位や改変されるアミノ酸の数は特に限定されない。例えば、CDRおよび／またはFRに存在するアミノ酸を適宜、改変することができる。可変領域のアミノ酸を改変する場合、特に限定されないが、結合活性が維持されていることが好ましく、例えば、改変前と比較して50%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは100%以上の結合活性を有していることが好ましい。又、アミノ酸改変により結合活性が上昇していてもよく、例えば結合活性が改変前と比較して2倍、5倍、10倍等になっていてもよい。本発明の抗体において、アミノ酸配列の改変とは、アミノ酸残基の置換、付加、欠損、および修飾の少なくとも１つであることができる。

[0110] 例えば、可変領域のN末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である。したがって、本発明の抗体は、その重鎖のN末端がグルタミンの場合には、それがピログルタミン酸に修飾された可変領域を含む。

[0111] 本発明の抗体の可変領域は、任意の配列であってよく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体、および、これらの非ヒト抗体をヒト化したヒト化抗体、および、ヒト抗体など、どのような由来の抗体の可変領域でもよい。「ヒト化抗体」とは、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR;complementarity determining region）をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である（Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877）。また、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照）。また、これらの抗体の可変領域に対して、抗原への結合、薬物動態、安定性、免疫原性を改善するために、様々なアミノ酸置換を導入したものであってもよい。本発明の抗体の可変領域は抗原に対する結合にpH依存性を有することで、抗原に対して繰り返し結合することができてもよい（WO2009/125825）。

[0112] 抗体の軽鎖定常領域にはκ鎖とλ鎖タイプの定常領域が存在しているが、いずれの軽鎖定常領域であってもよい。さらに、本発明において軽鎖定常領域は、アミノ酸の置換、欠損、付加および／または挿入などの改変が行われた軽鎖定常領域であってもよい。

[0113] 本発明の抗体の重鎖定常領域としては、例えばヒトIgG抗体の重鎖定常領域を用いることができ、好ましくはヒトIgG1抗体、ヒトIgG4抗体の重鎖定常領域である。

[0114] また、本発明のFc領域改変体は、他のタンパク質、生理活性ペプチドなどと結合させてFc融合タンパク質分子とすることが可能である。ここで、融合

タンパク質とは、天然ではそれが自然に連結しない少なくとも２つの異なるポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。他のタンパク質、生理活性ペプチドとしては、例えば受容体、接着分子、リガンド、酵素が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0115] 本発明のFc融合タンパク質分子の好ましい例として、標的に結合するレセプタータンパク質にFc領域を融合したタンパク質が挙げられ、例えば、TNFR-Fc融合タンパク、IL1R-Fc融合タンパク、VEGFR-Fc融合タンパク、CTLA4-Fc融合タンパク等（Nat Med. 2003 Jan;9(1):47-52、BioDrugs. 2006;20(3):151-60.）が挙げられる。また、本発明のポリペプチドに融合させるタンパク質は標的分子に結合する限り如何なる分子であってもよく、例えばscFv分子（WO2005/037989）、単ドメイン抗体分子（WO2004/058821, WO2003/002609）、抗体様分子（Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658、Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10、Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469、Protein Science 2006, 15:14-27）、例えば、DARPins（WO2002/020565）、Affibody（WO1995/001937）、Avimer（WO2004/044011, WO2005/040229）、Adnectin（WO2002/032925）等が挙げられる。また、抗体およびFc融合タンパク質分子は、複数種類の標的分子あるいはエピトープに結合する多重特異性抗体であってもよい。

[0116] また本発明の抗体には、抗体の修飾物も含まれる。抗体の修飾物の例としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）や細胞障害性物質等の各種分子と結合させた抗体を挙げることができる。このような抗体修飾物は、本発明の抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

[0117] さらに、本発明の抗体は二重特異性抗体（bispecific antibody）であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいうが、当該エピトープは異なる分子中に存在していてもよいし、同一の分子中に存在していてもよい。

[0118] 本発明のポリペプチドは当業者に公知の方法により製造することができる

。例えば、抗体は以下の方法で作製することができるが、これに限定されるものではない。

[0119] 抗体の重鎖をコードするDNAであって、Fc領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換された重鎖をコードするDNA、および抗体の軽鎖をコードするDNAを発現させる。Fc領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換された重鎖をコードするDNAは、例えば、天然型の重鎖をコードするDNAのFc領域部分を取得し、該Fc領域中の特定のアミノ酸をコードするコドンが目的の他のアミノ酸をコードするよう、適宜置換を導入することによって得ることが出来る。

[0120] また、あらかじめ、天然型重鎖のFc領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたタンパク質をコードするDNAを設計し、該DNAを化学的に合成することによって、Fc領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換された重鎖をコードするDNAを得ることも可能である。アミノ酸の置換部位、置換の種類としては、特に限定されるものではない。また置換に限られず、欠損、付加、挿入のいずれか、又はそれらの組み合わせであってもよい。

[0121] また、Fc領域中において1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換された重鎖をコードするDNAは、部分DNAに分けて製造することができる。部分DNAの組み合わせとしては、例えば、可変領域をコードするDNAと定常領域をコードするDNA、あるいはFab領域をコードするDNAとFc領域をコードするDNAなどが挙げられるが、これら組み合わせに限定されるものではない。軽鎖をコードするDNAもまた、同様に部分DNAに分けて製造することができる。

[0122] 上記DNAを発現させる方法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、重鎖可変領域をコードするDNAを、重鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込み重鎖発現ベクターを構築する。同様に、軽鎖可変領域をコードするDNAを、軽鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込み軽鎖発現ベクターを構築する。これらの重鎖、軽鎖の遺伝子を単一のベクターに組み込むことも出来る。

[0123] 目的とする抗体をコードするDNAを発現ベクターへ組み込む際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

[0124] ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などを用いることができる。

[0125] 本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、宿主をJM109、DH5α、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら, Nature (1989) 341, 544-546；FASEB J. (1992) 6, 2422-2427、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、araBプロモーター（Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（QIAGEN社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0126] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4397、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えばリポフェクチン法、リン酸カルシウム法、DEAE-Dextran法を用いて行うことができる。

[0127] 大腸菌発現ベクターの他、例えば、本発明のポリペプチドを製造するため

のベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」（GIBCO BRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

[0128] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら, Nature (1979) 277, 108、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、MMTV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター（Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、CAGプロモーター（Gene. (1991) 108, 193、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、形質転換細胞を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0129] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることもで

きる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

[0130] 抗体の回収は、例えば、形質転換した細胞を培養した後、分子形質転換した細胞の細胞内又は培養液より分離することによって行うことが出来る。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、１ｑ、ＦｃＲｎ、プロテインA、プロテインGカラム、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて行うことができる。

[0131] また本発明は、抗体Fc領域改変体を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域改変体に少なくとも一つのアミノ酸改変を加えることを含む、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法を提供する。

例えば以下の工程を含む製造方法を挙げることができる；

（ａ）Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加える工程、

（ｂ）前記工程（ａ）で改変されたポリペプチドの、FcγRIIbに対する結合活性を測定する工程、および

（ｃ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドを選択する工程。

[0132] 好ましい態様としては、Fc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法であって、

（ａ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強するように、当該ポリペプチドをコードする核酸を改変する工程、

（ｂ）宿主細胞に当該核酸を導入し発現するように培養する工程、

（ｃ）宿主細胞培養物から当該ポリペプチドを回収する工程、を含む方法で

ある。

さらに当該製造方法によって製造される抗体及びFc融合タンパク質分子も本発明に含まれる。

[0133] また本発明は、抗体Fc領域改変体を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域改変体に少なくとも一つのアミノ酸改変を加えることを含む、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法を提供する。

例えば、以下の工程を含む製造方法を挙げることができる；

（ａ）Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加える工程、

（ｂ）前記工程（ａ）で改変されたポリペプチドの、FcγRIIaに対する結合活性およびFcγRIIbに対する結合活性を測定する工程、および

（ｃ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドを選択する工程。

[0134] 好ましい態様としては、Fc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法であって、

（ａ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強するように、当該ポリペプチドをコードする核酸を改変する工程、

（ｂ）宿主細胞に当該核酸を導入し発現するように培養する工程、

（ｃ）宿主細胞培養物から当該ポリペプチドを回収する工程、を含む方法である。

さらに当該製造方法によって製造される抗体及びFc融合タンパク質分子も本発明に含まれる。

[0135] さらに本発明は抗体Fc領域改変体を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域改変体に少なくとも一つのアミノ酸改変を加えることを含む、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強され、かつ、F

cγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法を提供する。

例えば以下の工程を含む製造方法を挙げることができる；

（ａ）Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加える工程、

（ｂ）前記工程（ａ）で改変されたポリペプチドの、FcγRIIaに対する結合活性およびFcγRIIbに対する結合活性を測定する工程、および

（ｃ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつ、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドを選択する工程。

[0136] 好ましい態様としては、Fc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法であって、

（ａ）親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつ、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強するように、当該ポリペプチドをコードする核酸を改変する工程、

（ｂ）宿主細胞に当該核酸を導入し発現するように培養する工程、

（ｃ）宿主細胞培養物から当該ポリペプチドを回収する工程、を含む方法である。

さらに当該製造方法によって製造される抗体及びFc融合タンパク質分子も本発明に含まれる。

[0137] また本発明は、Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加えることを含む、生体に投与された場合に、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、該ポリペプチドに対する抗体の産生が抑制されたポリペプチドの製造方法を提供する。

例えば以下の工程を含む製造方法を挙げることができる；

（ａ）Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加える工程、および

（ｂ）前記工程（ａ）で改変されたFc領域を含むポリペプチドが生体に投

与された場合に、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、抗体の産生が抑制されることを確認する工程。

[0138] 該ポリペプチドに対する抗体の産生が抑制されたかどうかは、動物に実際に該ポリペプチドを投与するなどの方法により確認することができる。あるいは、FcγRIIaに対する結合活性およびFcγRIIbに対する結合活性を測定し、FcγRIIaに対するKD値をFcγRIIbに対するKD値で割った値が増加することをもって、抗体の産生が抑制されたと判断することもできる。そのようなポリペプチドは、活性型FcγRを活性化することなく、抗体の産生を抑制することができるため、医薬品として有用であると考えられる。

[0139] 上記製造方法においては、FcγRIIbに対する結合活性を増強させ、かつFcγRIIa（R型）と比較したFcγRIIbに対する結合選択性を増強させるようにすることが好ましい。

上記製造方法における好ましい態様としては、例えばヒトIgGのFc領域において、EUナンバリング238番目のアミノ酸の他のアミノ酸への改変と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、234番目のアミノ酸、235番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、265番目のアミノ酸、266番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、269番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、274番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、326番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、331番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸、334番目のアミノ酸、355番目のアミノ酸、356番目のアミノ酸、358番目のアミノ酸、396番目のアミノ酸、409番目のアミノ酸及び419番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸の他のアミノ酸への改変とが導入されるよう、当該Fc領域を改変する。EUナンバリング238番目のアミノ酸改変と組み合わされる他のアミノ酸改変としては、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸

が好ましく、特に、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸が好ましい。特に、EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸とを組み合わせた改変が、FcγRIIbに対する結合活性を増強させる、あるいは、FcγRIIaと比較した場合のFcγRIIbに対する結合選択性を増強させる観点から、好ましいアミノ酸改変の組合せとして挙げられる。

[0140] 改変されるアミノ酸は、改変前と比較してFcγRIIbに対する結合活性が増強し、あるいは、FcγRIIaと比較して、FcγRIIbに対する結合選択性が増強するものであれば特に限定されないが、EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、234番目のアミノ酸がTyr、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、265番目のアミノ酸がGlu、266番目のアミノ酸がPhe、Leu又はMet、267番目のアミノ酸がAla、Glu、Gly又はGln、268番目のアミノ酸がAsp、Gln又はGlu、269番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro又はGln、274番目のアミノ酸がGln、296番目のアミノ酸がAsp又はPhe、326番目のアミノ酸がAla又はAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がLys、Arg又はSer、331番目のアミノ酸がSer、332番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、333番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、334番目のアミノ酸がArg、Ser又はThr、355番目のアミノ酸がAla、Gln、356番目のアミノ酸がGlu、358番目のアミノ酸がMet、396番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp又はTyr、409番目のアミノ酸がArg、419番目のアミノ酸がGluであることが好ましい。改変されるアミノ酸としては、改変前と比較してFcγRIIbに対する結合活性が増強

し、かつ、FcγRIIaと比較して、FcγRIIbに対する結合選択性が増強するものがより好ましい。特に、EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸と、EUナンバリング233番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸とを組み合わせる場合は、EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla又はGly、272番目のアミノ酸がAsp又はPro、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg、332番目のアミノ酸がThr、396番目のアミノ酸がLeu又はMetであることが好ましい。

[0141] これらの組み合わせの中でも、よりFcγRIIbに対する結合活性が増強する改変、あるいは、よりFcγRIIa（R型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が増強する改変を導入することが好ましい。このような改変として好ましいアミノ酸置換の組み合わせとしては、例えば以下の(a)～(x)の組み合わせが挙げられる。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番

目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、327番目及び330番目のアミノ酸改変

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、327番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び330番目のアミノ酸改変

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

[0142] 更に、これらの改変の組み合わせの中でも以下の(a)～(x)のアミノ酸改変の組み合わせがより好ましい組み合わせとして挙げられる。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がGly又はAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸

がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目Arg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla又はGly、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMetであるアミノ酸配列

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸

がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がGly、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

[0143] さらに本発明は、親Fc領域を含むポリペプチドに比べて、FcγRIIbに対する結合活性が増強、あるいはFcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したポリペプチドを作製するための、ポリペプチドを改変する方法を提供する。また本発明は、親Fc領域を含むポリペプチドに比べて、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつFcγRIIa(R型)と比較した、FcγRIIbに対する結合選択性が増強したポリペプチドを作製するための、ポリペプチ

ドを改変する方法を提供する。

また本発明は、生体に投与された場合に、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、抗体の産生が抑制されたポリペプチドを作製するための、ポリペプチドを改変する方法を提供する。

[0144] 好ましい態様としては、例えば、上述のFcγRIIbに対する結合活性が増強、あるいはFcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法に記載のアミノ酸改変の組み合わせが挙げられる。さらに好ましい態様としては、例えば、上述のFcγRIIbに対する結合活性が増強され、かつ、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法に記載のアミノ酸改変の組み合わせが挙げられる。

[0145] さらに本発明は、Fc領域を含むポリペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が改変され、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強、あるいは、FcγRIIa(R型)に対する結合活性と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。また本発明は、Fc領域を含むポリペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が改変され、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつ、FcγRIIa(R型)に対する結合活性と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。本発明の該核酸はDNA、RNAなど、如何なる形態でもよい。

[0146] さらに本発明は、上記本発明の核酸を含むベクターを提供する。ベクターの種類はベクターが導入される宿主細胞に応じて当業者が適宜選択することができ、例えば上述のベクターを用いることができる。

[0147] さらに本発明は、上記本発明のベクターにより形質転換された宿主細胞に関する。宿主細胞は当業者が適宜選択することができ、例えば上述の宿主細胞を用いることができる。 具体的には例えば、以下のような宿主細胞が挙げられる。

真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

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

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0148] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) などのニコティアナ (Nicotiana) 属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0149] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

－酵母：サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces serevisiae) などのサッカロミセス (Saccharomyces) 属、メタノール資化酵母 (Pichia pastoris) などのPichia属

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

[0150] さらに本発明は、Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸改変を加えることを含む、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性を増強、および/または、FcγRIIa(R型)に対する結合活性と比較したFcγRIIbに対する結合選択性を増強する方法を提供する。

また本発明は、Fc領域を含むポリペプチドにおいて、該Fc領域に少なくと

も一つのアミノ酸改変を加えることを含む、生体に投与された場合に、親Fc領域を含むポリペプチドと比較して、該ポリペプチドに対する抗体の産生を抑制する方法を提供する。

[0151] 好ましい態様としては、例えば、上述のFcγRIIbに対する結合活性が増強、および/または、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体を含むポリペプチドの製造方法に記載のアミノ酸改変の組み合わせが挙げられる。

また、上記のいずれかの方法により製造されたポリペプチドも本発明に含まれる。

[0152] 本発明は、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドを含有する医薬組成物を提供する。

本発明の医薬組成物は、本発明の上記抗体又はFc融合タンパク質分子に加えて医薬的に許容し得る担体を導入し、公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の

製剤実施に従って処方することができる。

[0153] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80（TM）、HCO-50と併用してもよい。

[0154] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

[0155] 投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与剤型などが挙げられる。注射剤型は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

[0156] また本発明の医薬組成物は、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0157] 上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化を抑制する薬剤の有効成分として有用である。本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、活性型FcγRを活性化することなく、FcγRIIbに選択的に作用して、B細胞、マスト細胞、樹状細

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

[0158] 本発明においては、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤の有効成分として有用である。上述のように、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、B細胞、マスト細胞、樹状細胞および／または好塩基球の活性化を抑制することができるので、その結果として、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドを投与することにより、免疫炎症性疾患を治療又は予防することが可能である。「免疫炎症性疾患

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

病、脱髄性疾患、筋萎縮性側索硬化症、副甲状腺機能低下症、ドレスラー症候群、イートン-ランバート症候群、疱疹状皮膚炎、脱毛症、進行性全身性硬化症、CREST症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、強指症および毛細血管拡張症）、サルコイドーシス、リウマチ熱、多形性紅斑、クッシング症候群、輸血反応、ハンセン病、高安動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎、巨細胞動脈炎、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、川崎病、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、フェルティ症候群、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、移植拒絶反応、ムンプス、心筋症、化膿性関節炎、家族性地中海熱、マックル-ウェルズ症候群、高IgD症候群。

[0159] また、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、自己抗原に対する抗体（自己抗体）の産生が疾患の原因と考えられる自己免疫疾患において、その自己抗体の産生を抑制して、当該自己免疫疾患を治療又は予防する薬剤の有効成分として有用である。重症筋無力症の自己抗原であるAchRと抗体のFc部分とを融合した分子を用いることで、AchRを認識するBCRを発現するB細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されている（J Neuroimmunol, 227, 35-43, 2010)。自己抗体が認識する抗原と本発明に記載の抗体Fc領域との融合タンパク質を使うことで、その自己抗原に対するBCRを発現するB細胞のBCRとFcγRIIbとを架橋し、自己抗原に対するBCRを発現するB細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが可能である。このような自己免疫疾患には、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、慢性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎、大動脈炎症候群、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、橋本病、原発性甲状腺機能低下症、特発性アジソン病、インスリン依存性糖尿病、慢性円板状エリテマトーデス、限局性強皮症、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線状IgA水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、尋常性白斑、サットン後天性遠心性白斑、原田

病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、習慣性流産、二型糖尿病、低血糖症、慢性蕁麻疹が含まれるが、これらだけには限定されない。

[0160] また、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、生体に必要なタンパク質を欠損する疾患の治療剤の有効成分として有用である。生体に必要なタンパク質を欠損する疾患に対して、そのタンパク質を薬剤として投与し補充する治療法が用いられるが、患者は元来そのタンパク質を欠損しているため、外部から補充されたそのタンパク質は異物として認識され、そのタンパク質に対する抗体が産生されてしまう。その結果として、そのタンパク質が除去されやすくなってしまい、薬剤としての効果が減弱してしまう。そのようなタンパク質と本発明に記載の抗体Fc領域との融合タンパク質を使うことで、当該タンパク質を認識するB細胞上においてBCRとFcγRIIbとを架橋し、当該タンパク質に対する抗体産生を抑制することが可能である。補充するタンパク質としてはFactor VIII、Factor IX、TPO、EPO、α-iduronidase、iduronate sulfatase、A型heparan N-sulfatase, B型α-N-acetylglucosaminidase, C型acetyl CoA：α-glucosaminidase acetyltransferase, D型N-acetylglucosamine 6-sulfatase、galactose 6-sulfatase、N-acetylgalactosamine 4-sulfatase、β-glucuronidase、α-galactosidase、acidic α-galactosidase、glucocerebrosidaseが含まれる。また、これらのタンパク質を補充する疾患としては、血友病、特発性血小板減少性紫斑病、腎性貧血、ライソソーム病（ムコ多糖症、ファブリー病、ポンペ病、ゴーシェ病）等が含まれる。ただし、これらに限定されない。

[0161] また、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、抗ウィルス剤の有効成分として有用である。ウィルスに対する抗体であって本発明に記載のFc領域を含む抗体は、ウィルスに対する抗体に見られる抗体依存性感染増強（antibody-dependent enhancement）を抑制することが可能である。抗体依存性感染増強とは、ウィルスが、そのウィルスに対する中和抗体を利用して、活性型FcγRを介して貪食されFcγR発現細胞に感染することで、感染を拡大する現象である。デングウィルスに対する中和抗体のFcγRIIbに対する結合

が、抗体依存性感染増強を抑制するのに重要な役割を果たしていることが報告されている(Proc Natl Acad Sci USA, 108, 12479-12484, 2011)。デングウィルスに対する中和抗体が形成するデングウィルスとの免疫複合体がFcγRIIbを架橋することで、FcγRを介した貪食を阻害し、その結果として抗体依存性感染増強を抑制する。ウィルスにはデングウィルス（DENV1、DENV2、DENV4）やHIVが含まれる。ただし、これらだけに限定されない。

[0162] また、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、動脈硬化予防剤または治療剤の有効成分として有用である。動脈硬化の原因である酸化LDLに対する抗体であって、本発明に記載のFc領域を含む抗体はFcγRIIa依存的な炎症性細胞の接着を防ぐことが可能である。抗酸化LDL抗体は酸化LDLとCD36の相互作用を阻害するが、抗酸化LDL抗体が内皮細胞に対して結合し、そのFc部分をモノサイトがFcγRIIaやFcγRI依存的に認識し、接着することが報告されている（Immunol Lett, 108, 52-61, 2007)。このような抗体に、本発明に記載のFc領域を含む抗体を利用することで、FcγRIIa依存的な結合は阻害され、かつFcγRIIbを介した抑制シグナルによってモノサイトの接着を抑制することが考えられる。

[0163] 本発明においては、上記本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドは、癌に対する治療剤又は予防剤の有効成分として有用である。上述のように、FcγRIIbに対する結合を増強することで、アゴニスト抗体のアゴニスト活性が増強され、当該抗体が有する抗腫瘍効果も増強されることが知られている。そのため、本発明に記載のFc領域改変体を用いたアゴニスト抗体は、癌の治療又は予防に有用である。具体的には、本発明に記載のFc領域改変体は、例えば、Aliases、CD120a、CD120b、Lymphotoxin β receptor、CD134、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、CD30、CD137、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、RANK、Osteoprotegerin、TNFRSF12A、TNFRSF13B、TNFRSF13C、TNFRSF14、Nerve growth factor receptor、TNFRSF17、TNFRSF18、TNFRSF19、TNFRSF21、TNFRSF25、Ectodysplasin A2 receptor等のTNF受容体ファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性を増強し、癌の治療又は予防に利用す

ることができる。また、上記以外にも、そのアゴニスト活性にFcγRIIbとの相互作用が必要とされる分子に対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性も増強する。加えて、Receptor Tyrosine kinase（RTK）の一つであるKitのように、FcγRIIbと架橋されることで、細胞の増殖が抑制されるような分子に対して結合活性を有するポリペプチドに、本発明のFc領域改変体を含ませることで、当該分子を発現した細胞に対する抑制作用を増強することが可能となる。癌は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む）、大腸癌、直腸癌、結腸癌、乳癌、肝癌、胃癌、膵癌、腎癌、前立腺癌、卵巣癌、甲状腺癌、胆管癌、腹膜癌、中皮腫、扁平上皮癌、子宮頸癌、子宮体癌、膀胱癌、食道癌、頭頸部癌、鼻咽頭癌、唾液腺腫瘍、胸腺腫、皮膚癌、基底細胞腫、悪性黒色腫、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、ウィルムス腫瘍、急性骨髄性白血病（急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病および急性単球性白血病を含む）、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（バーキットリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、毛様細胞白血病形質細胞腫、末梢性Ｔ細胞リンパ腫および成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫）、ランゲルハンス細胞組織球症、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、脳腫瘍（神経膠腫、星細胞腫、グリア芽細胞腫、髄膜腫および上衣腫を含む）、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、骨肉腫、カポジ肉腫、ユーイング肉腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫。

[0164] また本発明は、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドもしくは本発明の製造方法により製造されたFc領域改変体を含むポリペプチドを対象（患者）へ投与する工程を含む、免疫炎症性疾患の治療方法または予防方法に関する。

[0165] また本発明は、少なくとも本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドもしくは本発明の製造方法により製造されたFc領域改変体を含むポリペプチド、

または本発明の医薬組成物を含む、本発明の治療方法または予防方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。また本発明は、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドもしくは本発明の製造方法により製造されたFc領域改変体を含むポリペプチドの、免疫炎症性疾患の治療剤または予防剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明の治療方法または予防方法に使用するための、本発明のFc領域改変体を含むポリペプチドまたは本発明の製造方法により製造されたFc領域改変体を含むポリペプチドに関する。

[0166] なお本明細書で用いられているアミノ酸の3文字表記と1文字表記の対応は以下の通りである。

アラニン：Ala：A

アルギニン：Arg：R

アスパラギン：Asn：N

アスパラギン酸：Asp：D

システイン：Cys：C

グルタミン：Gln：Q

グルタミン酸：Glu：E

グリシン：Gly：G

ヒスチジン：His：H

イソロイシン：Ile：I

ロイシン：Leu：L

リジン：Lys：K

メチオニン：Met：M

フェニルアラニン：Phe：F

プロリン：Pro：P

セリン：Ser：S

スレオニン：Thr：T

トリプトファン：Trp：W

チロシン：Tyr：Y

バリン：Val：V

[0167] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0168] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

[0169] 〔実施例１〕既存のFcgRIIbに対する結合を増強したFcを有する抗体の血小板凝集能の評価

参考例４の表１６に示されるように、ヒト天然型IgG1のEUナンバリング267番目のSerをGluに、328番目のLeuをPheに置換する改変を導入する既存のFcgRIIb増強技術（非特許文献２８）は、IgG1と比較してFcgRIIbへの結合を408倍増強し、FcgRIIaHに対する結合を0.51倍に減弱する一方で、FcgRIIaRへの結合が522倍増強する。「背景技術」において述べたように、FcgRIIbに対する結合が増強されていたとしても、FcgRIIaのみを発現する血小板のような細胞に関しては、FcgRIIaに対する増強効果のみが影響すると考えられる。つまり、FcgRIIaRに対する結合が増強された既存の技術は、血小板凝集活性が増強され、血栓症を発症するリスクを高める危険がある。これを確認するために、実際に抗体のFcgRIIaに対する結合を増強した場合に、血小板凝集活性が増強されるかどうかを検証した。

[0170] IgEに結合するヒトIgG1抗体の重鎖としてomalizumab_VH-G1d（配列番号：25）、軽鎖としてomalizumab_VL-CK（配列番号：26）を参考例1の方法を用いて作製した。また、omalizumab_VH-G1dに対して、ヒトFcγRIIbに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される267位のSerをGluに、328位のLeuをPheに置換したomalizumab_VH-G1d-v3を作製した。参考例１の方法を用いて、omalizumab_VH-G1d-v3を重鎖として含み、omalizumab_VL-CKを軽鎖として含む、omalizumab-G1d-v3を作製した。この抗体を使って、血小板凝

集能の評価を実施した。

[0171] 血小板凝集は、血小板凝集能測定装置ヘマトレーサー712（株式会社エル・エム・エス）を用いて測定した。まず、約50 mLの全血を、0.5 mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5 mL真空採血管に一定分量ずつ採取した。血液を200 gで15分間、遠心分離し、上清を回収してPlatelet Rich Plasma(PRP)とした。得られたPRPは緩衝液1（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、1.5 U/mL apyrase、0.35 % BSA）を用いて洗浄した後、さらに緩衝液2（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、2 mM $CaCl_2$、0.35 % BSA）に置換して、1 μL当たり約300,000個の洗浄血小板を調整した。血小板凝集能測定装置に、攪拌棒を含む測定用キュベットをセットし、そこに洗浄血小板を156 μL分注した。機器内ではキュベットは37.0℃に維持され、攪拌棒は1000 rpmで血小板を攪拌した。そこにmol比1:1のomalizumab-G1d-v3とIgEの免疫複合体（最終濃度がそれぞれ600 μg/mL及び686 μg/mLとなるように調製）を44 μL加え、5分間反応させた。さらに、2次凝集を起こさない濃度のアデノシン2リン酸（ADP、SIGMA）を加え、凝集が増強されるかを確認した。

[0172] このアッセイで得られた、FcγRIIaの遺伝子多型(H/HまたはR/H)のドナーごとの結果を図１、図２に示す。図１の結果から、FcγRIIaの多型(R/H)では、免疫複合体を添加した場合に血小板凝集を増強させることが示された。一方、図2に示した通り、FcγRIIa多型(H/H)では、血小板凝集を増強しなかった。

[0173] 次に血小板の活性化を活性化マーカーを使って評価した。血小板の活性化は、CD62p(p-selectin)もしくは活性型インテグリンといった活性化マーカーの血小板膜表面における発現増加によって測定することができる。先述の方法により調整した洗浄血小板7.7μLに免疫複合体を2.3μL添加し室温で5分間反応させた後、さらに最終濃度が30μMになるようにADPを添加して活性化を惹起し、免疫複合体によってADPによる活性化が増強されるかを確認した。陰

性対照には免疫複合体の代わりにリン酸緩衝液(pH7.4、Gibco) を添加したサンプルを用いた。反応後の各サンプルはPE標識抗CD62抗体 (BECTON DICKINSON) 、PerCP標識抗CD61抗体、FITC標識PAC-1抗体 (BD bioscience) を用いて染色し、フローサイトメーター (FACS CantoII、 BD bioscience) で各蛍光強度を測定した。

[0174] このアッセイ法で得られたCD62p発現の結果を図３に、活性化インテグリン発現の結果を図4に示す。洗浄血小板はFcγRIIaの多型がR/Hである1名の健常人から得たものを使用した。ADP刺激により血小板膜表面に発現誘導されるCD62p及び活性型インテグリンは、免疫複合体存在下においていずれも増強された。

[0175] これらの結果から、IgG1のFcにEUナンバリングで表される267位のSerをGluに、328位のLeuをPheに置換したFc を有する既存のヒトFcγRIIbに対する結合を増強したFcを有する抗体では、FcγRIIaの遺伝子多型のうち131番目のアミノ酸がRである場合には、131番目のアミノ酸がHである場合と比べて血小板凝集活性が増強することが明らかとなった。すなわち、既存のヒトFcγRIIbに対する結合を増強したFcを有する抗体はFcγRIIa R型を有するヒトにおいては血小板凝集による血栓症発症のリスクを高める危険性が示唆され、この問題点を克服したよりFcγRIIbに対して選択的に結合を増強したFcの有用性が明らかとなった。

[0176] 〔実施例2〕FcgRIIbへの結合を増強した改変体の作製

実施例１で示したように、FcgRIIbへの結合を増強する際には、他の活性型FcgRに対する結合を可能な限り抑制したうえで、FcgRIIbへの結合を増強する必要がある。そこで、FcgRIIbへの結合増強、あるいは選択性を増す効果がある改変同士を組み合わせ、さらにFcgRIIbへの結合あるいは選択性を増強した改変体の作製を検討した。具体的には、FcgRIIbへの結合増強、選択性向上の両方において優れた効果を示すP238D改変をベースとし、参考例６、参考例８、参考例９においてP238Dと組み合わせることで効果が見られた改変同士をさらに組み合わせた。

抗体H鎖可変領域としてWO2009/125825に開示されているヒトインターロイキン６レセプターに対する抗体の可変領域であるIL6R-Hの可変領域(配列番号：18)を、抗体H鎖定常領域としては、ヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dを有するIL6R-G1d(配列番号：19)を作製した。さらに、IL6R-G1dに対してK439Eを導入したIL6R-B3（配列番号：23）を作製した。これに対し、参考例６、参考例８、参考例９においてP238Dと組み合わせて効果が認められた改変である、E233D, L234Y, G237D, S267Q, H268D, P271G, Y296D, K326D, K326A, A330R, A330Kを組み合わせた改変体を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。

[0177] 各改変体の各FcgRに対するKDを表１に示す。なお、表中の改変とはIL6R-B3(配列番号：23)に対して導入した改変を示す。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lについては*として示した。表中の「KD(IIaR)/KD(IIb)」とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。「親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、「親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。なお、表１中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出した値である。

[0178]

[表1]

改変体名	改変	FcgRIa に対する KD(mol/L)	FcgRIIaR に対する KD(mol/L)	FcgRIIaH に対する KD(mol/L)	FcgRIIb に対する KD(mol/L)	FcgRIIIaV に対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	親ポリペプチドの KD(IIb)/ 改変ポリペプチドの KD(IIb)	親ポリペプチドの KD(IIaR)/ 改変ポリペプチドの KD(IIaR)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.2	1.1
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	12.5	2.6	0.1
IL6R-BP215/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.3E-08	1.3E-06	1.4E-05	4.1E-08	6.7E-05	31.7	75.6	0.8
IL6R-BP216/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	6.2E-07	2.9E-06	2.6E-05	1.4E-07	5.3E-05	20.7	22.1	0.4
IL6R-BP217/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.8E-06	3.6E-06	2.8E-05	1.5E-07	6.0E-05	24.0	20.7	0.3
IL6R-BP218/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	3.7E-08	1.5E-06	1.2E-05	7.6E-08	3.8E-05	19.7	40.8	0.7
IL6R-BP219/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	4.6E-08	6.1E-07	2.5E-06	3.4E-08	2.9E-05	17.9	91.2	1.8
IL6R-BP220/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.0E-08	1.1E-06	1.2E-05	3.6E-08	5.8E-05	30.6	86.1	1.0
IL6R-BP221/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	1.3E-07	7.1E-07	2.5E-06	2.8E-08	4.6E-05	25.4	110.7	1.5
IL6R-BP222/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.1E-08	7.1E-07	2.6E-06	3.4E-08	4.7E-05	20.9	91.2	1.5
IL6R-BP223/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	2.7E-08	6.0E-07	2.8E-06	2.5E-08	3.2E-05	24.0	124.0	1.8
IL6R-BP224/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326A/A330R	6.2E-09	4.5E-07	9.5E-06	3.5E-08	4.1E-05	12.9	88.6	2.4
IL6R-BP225/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R	9.5E-08	6.9E-07	2.8E-06	3.5E-08	3.2E-05	19.7	88.6	1.6
IL6R-BP226/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	5.2E-08	5.7E-07	2.4E-06	3.3E-08	3.6E-05	17.3	93.9	1.9
IL6R-BP227/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	2.7E-08	6.2E-07	2.9E-06	3.2E-08	2.6E-05	19.4	96.9	1.8
IL6R-BP228/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R	5.5E-09	4.2E-07	1.1E-05	4.0E-08	3.2E-05	10.5	77.5	2.6
IL6R-BP229/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.6E-08	8.1E-07	3.3E-06	4.2E-08	3.7E-05	19.3	73.8	1.4
IL6R-BP230/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.1	147.6	1.9
IL6R-BP231/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	9.4E-09	7.4E-07	1.1E-05	2.3E-08	4.0E-05	32.2	134.8	1.5
IL6R-BP232/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.6E-08	8.4E-07	3.3E-06	5.6E-08	4.5E-05	15.0	55.4	1.3
IL6R-BP233/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K	7.0E-08	6.9E-07	2.8E-06	3.7E-08	5.1E-05	18.6	83.8	1.6
IL6R-BP234/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	6.5E-09	1.2E-06	2.0E-05	1.2E-07	3.1E-05	10.0	25.8	0.9
IL6R-BP235/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	3.5E-09	6.8E-07	7.5E-06	4.4E-08	2.5E-05	15.5	70.5	1.6
IL6R-BP236/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.7E-09	8.4E-07	1.9E-05	6.5E-08	3.9E-05	12.9	47.7	1.3
IL6R-BP237/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.1E-09	1.1E-06	1.9E-05	1.0E-07	3.5E-05	11.0	31.0	1.0
IL6R-BP238/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	2.4E-09	6.4E-07	7.0E-06	3.6E-08	2.7E-05	17.8	86.1	1.7
IL6R-BP239/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	7.6E-09	8.1E-07	1.7E-05	6.0E-08	4.8E-05	13.5	51.7	1.4
IL6R-BP240/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R	7.6E-09	1.5E-06	2.6E-05	9.5E-08	5.2E-05	15.8	32.6	0.7
IL6R-BP241/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	1.1E-09	6.8E-07	9.0E-06	4.5E-08	3.1E-05	15.1	68.9	1.6
IL6R-BP242/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	1.9E-09	7.5E-07	8.6E-06	5.1E-08	2.9E-05	14.7	60.8	1.5
IL6R-BP243/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	3.0E-09	5.4E-07	6.0E-06	3.6E-08	2.5E-05	15.0	86.1	2.0
IL6R-BP244/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.8E-09	1.8E-06	2.6E-05	1.1E-07	4.6E-05	16.4	28.2	0.6
IL6R-BP245/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	6.3E-09	1.4E-06	2.5E-05	8.3E-08	3.9E-05	16.9	37.3	0.8
IL6R-BP246/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	8.0E-09	1.6E-06	2.3E-05	9.2E-08	4.4E-05	17.4	33.7	0.7
IL6R-BP247/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.5E-09	8.1E-07	1.2E-05	3.7E-08	4.4E-05	21.9	83.8	1.4
IL6R-BP248/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	1.7E-09	8.2E-07	1.1E-05	3.5E-08	4.4E-05	23.4	88.6	1.3
IL6R-BP249/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.0E-09	6.2E-07	7.2E-06	3.7E-08	2.8E-05	16.8	83.8	1.8

[0179] ヒト天然型IgG1の配列を有するIL6R-G1d/IL6R-Lは、これに対してK439Eを導入したIL6R-B3/IL6R-Lの各FcgRに対する結合を1とした場合に、FcgRIaへの結合が1.3倍、FcgRIIaRへの結合が1.1倍、FcgRIIaHへの結合が1.1倍、FcgRIIbへの結合が1.2倍、FcgRIIIaVへの結合が0.9倍であり、これら全てのFcgRに対する結合がIL6R-G1d/IL6R-Lと同等であった。従って各改変体の結合を改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較することは、各改変体をヒト天然型IgG1の配列を有するIL6R-G1d/IL6R-Lと比較することと同等であると考えられる。そこでこれ以降の実施例においては各改変体の結合活性を改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較することとした。

[0180] 表1から、いずれの改変体も、改変導入前のIL6R-B3と比較してFcgRIIbへの親和性が向上しており、最も低かったIL6R-BF648/IL6R-Lで2.6倍、最も高かったIL6R-BP230/IL6R-Lで147.6倍であった。また、選択性を示すKD(IIaR)/KD(IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP234/IL6R-Lで10.0、最も高かったIL6R-BP231/IL6R-Lで32.2となり、いずれの改変体も改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの0.3と比較して選択性が向上していた。なお、いずれの改変体も、FcgRIa、FcgRIIaH、FcgRIIIaVへの結合は改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lよりも低かった。

[0181] 〔実施例３〕FcγRIIbに対する結合を増強したFc とFcγRIIb細胞外領域との複合体およびFcγRIIaR型細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

実施例２において最もFcgRIIbへの結合を増強した改変体IL6R-BP230/IL6R-Lは、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が約150倍に増強され、FcgRIIaR型への結合も1.9倍程度に抑えられている。従ってIL6R-BP230/IL6R-LはFcgRIIbへの結合、選択性共に優れた改変体であるが、さらに優れた改変体を作製するためには、可能な限りFcgRIIaRへの結合を抑制したうえでFcgRIIbへの結合をさらに増強できることが好ましい。

[0182] 参考例7の図２８に示したように、P238D改変を含むFcでは、CH2ドメインBのEUナンバリング２７０番目のAspとFcγRIIbの１３１番目Argとの間で強固な静電相互作用を形成するが、この１３１番目の残基がFcγRIIIaやFcγRIIaH型ではHisであるのに対し、FcγRIIaR型においてはFcγRIIbと同じArgであ

り、結果、この部分での相互作用に差が生じず、これがFcγRIIaR型との選択性が出にくい要因となっている。

[0183] 一方で、FcγRIIaとFcγRIIbは細胞外領域のアミノ酸配列の93%が一致し、非常に高い相同性を有している。天然型IgG1のFc（以下Fc（WT））とFcγRIIaR型の細胞外領域複合体の結晶構造（J. Imunol. 2011, 187, 3208-3217）を分析すると、両者の相互作用界面付近においては、FcγRIIaR型とFcγRIIbとの間でわずか３アミノ酸（Gln127, Leu132, Phe160）の違いしか見いだせておらず、FcγRIIaR型との選択性の改善には相当な困難が予想された。

そのため、さらなるFcγRIIbに対する結合活性増強と選択性の向上を図るためには、FcγRIIbに対する結合を増強したFc とFcγRIIb細胞外領域との複合体の立体構造だけではなく、選択性の改善が最も困難と予想されるFcγRIIaR型細胞外領域との複合体の立体構造を同時に取得し、レセプターの違いによる相互作用の微妙な差異を立体構造的に明らかにした上で、導入するアミノ酸変異を詳細に検討することが必要と考えた。そこでIL6R-BP230/IL6R-Lの作製においてベースとなった改変体であるIL6R-BP208/IL6R-L（参考例９において作製） のFcからK439Eの改変を除いたFc(P208) を対象にFcγRIIb細胞外領域、ならびにFcγRIIaR型細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析をおこなった。

[0184] ３－１．Fc（P208）とFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

構造解析の結果、Fc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造を分解能2.81Åで決定、その解析の結果取得された構造を図５に示す。2つのFc CH2ドメインの間にFcγRIIb細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析された天然型IgGのFcであるFc(WT)とFcγRIIIa（Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2011, 108, 12669-126674）、FcγRIIIb（Nature, 2000, 400, 267-273; J.Biol.Chem. 2011, 276, 16469-16477）、FcγRIIaの各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。

[0185] しかし細部を見ると、Fc(P208) /FcγRIIb細胞外領域複合体では、G237DならびにP238Dの変異の導入の影響により、Fc(WT)/FcγRIIaR型細胞外領域複合

体と比較して、Fc CH2ドメインAのヒンジ領域から続くEUナンバリング233番目から239番目のループ構造が変化していた（図６）。この結果、Fc(P208)のEUナンバリング237番目Aspの主鎖とFcγRIIｂの160番目Tyr側鎖との間に強固な水素結合の形成が認められた（図7）。このTyr160はFcγRIIaにおいてはH型、R型ともにPheであり、水素結合の形成は不可能なことから、本水素結合はFcγRIIbに対する結合活性の向上ならびにFcγRIIaに対する結合活性の低減という選択性の獲得に重要な寄与をしていると考えられた。

[0186] 一方で、Fc(P208)のEUナンバリング237番目のAspの側鎖自体はFcγRIIbとの間でとくに目立った相互作用は形成しておらず、Fc内部の残基との相互作用も見られなかった。このEUナンバリング237番目のAspの周囲には、Fc内のEUナンバリング332番目のIle、EUナンバリング333番目のGlu、EUナンバリング334番目のLysが近傍に位置していた（図8）。これらの部位を親水性残基に置換することでEUナンバリング237番目のAsp側鎖と相互作用を形成させ、本ループ構造を安定化できれば、FcγRIIbの160番目のTyrとの水素結合形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減することにつながり、結合自由エネルギーの増加、つまり結合活性の向上につながる可能性が考えられた。

[0187] 参考例７において示されたP238D改変をもつFc(P238D)とFcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(P208)とFcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を比較すると、Fc(P208)はFc(P238D)と比較し新たに５個の変異を含んでいるが、その多くは側鎖レベルの変化にとどまっていた。ただし、FcのCH2ドメインBにおいてはEUナンバリング271番目ProをGlyへと改変したことで、主鎖レベルでの位置変化が見られるとともに、あわせて手前のEUナンバリング266-270番のループの構造変化がおきていた（図9）。参考例８に示したように、Fc（P238D）においてはEUナンバリング270番目のAspがFcγRIIbの131番目Argと強固な静電相互作用を形成する際に、このEUナンバリング271番目Pro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆されていた。今回EUナンバリング271番目へのGly導入により見られた構造変化は、改変前のPro部分

にたまっていた構造的なひずみが解消された結果と考えられ、その解消分がFcγRIIbとの結合自由エネルギーの改善、つまり結合活性の向上につながったと推察している。

[0188] さらにこのEUナンバリング266-271番目のループの構造変化に起因して、EUナンバリング292番目のArgが二状態をとりつつ構造変化をおこしていることが確認された。その際、このEUナンバリング292番目のArgは、Fc(P208)における別の改変残基の一つであるEUナンバリング268番目のAspと静電相互作用を形成（図9）、本ループ構造の安定化に寄与している可能性が考えられた。本ループ中のEUナンバリング270番目のAspとFcγRIIｂの131番目のArgとの間で形成される静電相互作用は、FcγRIIbとの結合活性に大きく寄与していることから、H268D改変の導入は、本ループ構造をFcγRIIｂの結合時のコンフォメーションに安定化させることで、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減し、結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながった可能性がある。

[0189] また、本構造解析結果をもとに、さらなる活性向上を目指した改変の可能性を精査したところ、改変導入部位の候補のひとつとしてEUナンバリング239番目のSerが見出された。図10に示す通り、FcγRIIbの117番目のLysが構造的に見てもっとも自然な形で伸びる方向に、このCH2ドメインBのEUナンバリング239番目のSerは位置している。ただ、今回の解析ではFcγRIIbの117番目のLysの電子密度は確認されておらず、本Lys残基は一定の構造をとっていないことから、現状ではFc (P208)との相互作用へのこのLys残基の関与は限定的であると考えられるが、このCH2ドメインBのEUナンバリング239番目のSerを負電荷を有するAspまたはGluへと改変した場合、正電荷をもつFcγRIIbの117番目のLysとの間に静電相互作用が期待でき、その結果としてFcγRIIbへの結合活性の向上が期待された。

[0190] 一方、CH2ドメインAにおけるEUナンバリング239番目Serの構造を見てみると、本アミノ酸側鎖は、EUナンバリング236番目のGlyの主鎖と水素結合を形成し、ヒンジ領域から続き、FcγRIIｂ Tyr160側鎖と水素結合を形成するEU

ナンバリング237番目Aspを含む233番目から239番にかけてのループ構造を安定化させていると考えられた（図７）。本ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることは、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減し、結果として結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながる。一方、このCH2ドメインAのEUナンバリング239番目をAspまたはGluへと改変した場合、EUナンバリング239番目Gly主鎖との水素結合が失われ、さらにすぐ近くに存在するEUナンバリング265番目Aspと静電反発をも招く可能性があり、大きなループ構造の不安定化が起きる可能性が考えられた。この不安定化された分のエネルギーは、FcγRIIbとの結合自由エネルギーの減少に働くため、結果として結合活性の低下を招く可能性がある。

[0191] [Fc(P208) の発現精製]

Fc(P208)の調製は以下のように行った。まず、IL6R-BP208(配列番号：24)の、EUナンバリング４３９番目のGluを天然型ヒトIgG1の配列であるLysにしたIL6R-P208を作製した。次にEUナンバリング220番目のCysをSerに置換し、EUナンバリング216番目のGluからそのC末端をPCRによってクローニングした遺伝子配列Fc(P208)を参考例1に記載の方法にしたがって発現ベクターの作製、発現、精製を行った。なお、EUナンバリング220番目のCysは通常のIgG1においては、L鎖のCysとdisulfide bondを形成しているが、Fcのみを調製する場合、L鎖を共発現させないため、不要なdisulfide bond形成を回避するためにSerに置換した。

[0192] [FcγRIIb細胞外領域の発現精製]

参考例2の方法にしたがって調製した。

[0193] [Fc(P208) FcγRIIb細胞外領域複合体の精製]

結晶化用に得られたFcγRIIb細胞外領域サンプル 1.5mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1(Protein Science 1996, 5, 2617-2622) 0.15mgを加え、0.1M Bis-Tris pH6.5のBuffer条件で、室温にて３日間静置することにより、N型糖鎖をAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断した。次にこの糖鎖切断処理を施した

FcγRIIb細胞外領域サンプルを5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮し、20mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製した。さらに得られた糖鎖切断FcγRIIb細胞外領域画分にFc（P208）をモル比でFcγRIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加え、10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮後、25mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製し、Fc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルを得た。

[0194] [Fc(P208)/FcγRIIb複合体細胞外領域複合体の結晶化]

Fc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルを10000MWCOの限外ろ過膜 により約10mg/mlまで濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法にてSeeding法を併用しつつ結晶化をおこなった。結晶化にはVDXmプレート(Hampton Research)を用い、0.1M Bis-Tris pH6.5、19%(w/v) PEG3350, 0.2M Potassium Phosphate dibasicのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.85μl：0.85μlで混合して結晶化ドロップを作成、そこに同様な条件で得られた同複合体の結晶をSeed Bead(Hampton Research)を用いて砕いた種結晶溶液から作成した希釈溶液0.15μlを添加し、リザーバーの入ったウェルに密閉、20℃に静置したところ、板状の結晶を得ることに成功した。

[0195] [Fc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定]

得られたFc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体の単結晶一つを0.1M Bis-Tris pH6.5, 24%(w/v) PEG3350, 0.2M Potassium Phosphate dibasic, 20%(v/v) Ethylene glycolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させ、Spring-8のBL32XUにてX線回折データの測定をおこなった。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態を維持し、ビームライン備え付けのCCDディテクタMX-225HE(RAYONIX) により、結晶を0.6° ずつ回転させながらトータル300枚のX線回折画像を収集した。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2（J. Appl. Cryst. 2010, 43, 186-190）、XDS Package（Acta Cryst. 2010, D66, 125-132）ならび

にScala (Acta Cryst. 2006, D62, 72-82) を用い、最終的に分解能2.81Åまでの回折強度データを得た。本結晶は、空間群$C222_1$に属し、格子定数ａ＝156.69Å、ｂ＝260.17Å、ｃ＝56.85Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であった。

[0196] [Fc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

構造決定は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. 2007, 40, 658-674) を用いた分子置換法によりおこなった。得られた結晶格子の大きさとFc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分を別座標として取り出し、それぞれをFcのCH2ドメインの探索用モデルとした。同じくPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分を一つの座標として取り出し、Fc CH3ドメインの探索用モデルとした。最後にFcγRIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標からA鎖6-178番のアミノ酸残基部分を取り出しFc(P208) の探索用モデルとした。Fc CH3ドメイン、FcγRIIb細胞外領域、Fc CH2ドメインの各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定しようとしたところ、CH2ドメインのひとつについてはその位置決定がうまくいかなかった。そこで残りの３つの部分から計算された位相をもとに計算した電子密度マップに対し、Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造構造を参考にしながら最後のCH2ドメインの位置を決定、Fc(P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルを得た。得られた初期モデルに対し2つのFcのCH2ドメイン、2つのFcのCH3ドメインならびにFcγRIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0Åの回折強度データに対し、結晶学的信頼度因子Ｒ値は42.6%、Free R値は43.7%となった。さらにプログラムREFMAC5 (Acta Cryst. 2011, D67, 355-367) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出した２Ｆｏ－Ｆｃ

、Ｆｏ－Ｆｃを係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot（Acta Cryst. 2010, D66, 486-501）でおこない、これらを繰り返すことでモデルの精密化をおこなった。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.81Åの27259個の回折強度データを用い、4786個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子Ｒ値は24.5%、Free R値は28.2%となった。

[0197] ３－２．Fc（P208）とFcγRIIaR型細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

構造解析の結果、Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体との結晶構造を分解能2.87Åで決定した。Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の結晶構造を、実施例３－１に示したFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体との結晶構造と比較したところ、両レセプターの非常に高いアミノ酸相同性を反映し、全体構造については、ほとんど差異は見られなかった（図１１）。しかし、電子密度レベルで構造を詳細に見てみると選択性改善に使える可能性のある差異が見出された。FcγRIIaR型においては、160番目の残基はTyrではなくPheであり、図１２に示したとおり、P238D改変を含むFcとFcgRIIbとの結合時に存在したFc CH2ドメインAのEUナンバリング237番目のアミノ酸残基の主鎖との間の水素結合は形成できない。これがP238D改変の導入によるFcγRIIaR型との選択性改善の主要因と考えられるが、さらに電子密度レベルで比較してみると、FcγRIIbとの複合体では、Fc CH2ドメインAにおいて、EUナンバリング235番目のLeuやEUナンバリング234番目のLeuの側鎖の電子密度が確認可能であるのに対し、FcγRIIaR型との複合体ではこれら側鎖の電子密度が明確ではなく、EUナンバリング237番目の近辺のループが、この付近でのFcgRIIaR型との相互作用の低下にともない、ゆらいでいると考えられる。一方、CH2ドメインBについて同じ領域の構造を比較してみると（図１３）、FcγRIIｂとの複合体構造ではEUナンバリングの237番目のAspまでの電子密度が確認できるのに対し、FcγRIIaR型との複合体では、EUナンバリングの237番目のAspより手前３残基程度まで電子密度を確認することが可能であり、FcgRIIb結合時と

比較し、より広い領域を使って相互作用を形成していると考えられる。以上から、Fc（P208）のEUナンバリング234番目から238番目の領域においては、FcγRIIbとの結合の際はCH2ドメインA側の寄与が、FcγRIIaRとの結合の際はCH2ドメインB側の寄与が大きくなっている可能性が示唆された。

[0198] [FcγRIIaR型細胞外領域の発現精製]

参考例2の方法にしたがって調製した。

[0199] [Fc（P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の精製]

精製されたFcγRIIa R型細胞外領域サンプル 1.5mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1(Protein Science 1996, 5, 2617-2622) 0.15mgと20μlの5U/ml Endo F2（QA-bio）ならびに20μlの5U/ml Endo F3(QA-bio) を加え、0.1M Na Acetate pH4.5のBuffer条件で、室温にて９日間静置した後、さらに、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1(Protein Science 1996, 5, 2617-2622) 0.07mgと7.5μlの5U/ml Endo F2（QA-bio）ならびに7.5μlの5U/ml Endo F3(QA-bio)を追加、さらに３日間静置することにより、N型糖鎖をAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断した。次にこの糖鎖切断処理を施したFcγRIIaR型細胞外領域サンプルを10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮し、25mM HEPES pH7, 0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製した。さらに得られた糖鎖切断FcγRIIaR型細胞外領域画分にFc(P208) をモル比でFcγRIIaR型細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加え、10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮後、25mM HEPES pH7, 0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製し、Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のサンプルを得た。

[0200] [Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の結晶化]

Fc(P208)/FcγRIIa R型細胞外領域複合体のサンプルを10000MWCOの限外ろ過膜 により約10mg/mlまで濃縮し、シッテイングドロップ蒸気拡散法にて結晶化をおこなった。0.1M Bis-Tris pH7.5、26%(w/v) PEG3350, 0.2M Ammoniu

m Sulfaeのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.8μl：1.0μlで混合して結晶化ドロップを作成後、シールで密閉、20℃に静置したところ、板状の結晶を得ることに成功した。

[0201] [Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定]

得られたFc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の単結晶一つを0.1M Bis-Tris pH7.5, 27.5%(w/v) PEG3350, 0.2M Ammonium Sulfate, 20%(v/v) Glycerolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させ、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-17AにてX線回折データの測定をおこなった。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態を維持し、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315r (ADSC)により、結晶を0.6°ずつ回転させながらトータル225枚のX線回折画像を収集した。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. 2010, 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. 2010, D66, 125-132) ならびにScala (Acta Cryst. 2006, D62, 72-82) を用い、最終的に分解能2.87Åまでの回折強度データを得た。本結晶は、空間群$C222_1$に属し、格子定数ａ＝154.31Å、ｂ＝257.61Å、ｃ＝56.19Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であった。

[0202] [Fc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

構造決定は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. 2007, 40, 658-674) を用いた分子置換法によりおこなった。得られた結晶格子の大きさとFc(P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。実施例3-1で得られたFc(P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を探索用モデルとし、結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定、さらに得られた初期モデルに対し2つのFcのCH2ドメイン、2つのFcのCH3ドメインならびにFcγRIIaR型細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0Åの回折強度データに対し、結晶

学的信頼度因子Ｒ値は38.4%、Free R値は38.0%となった。さらにプログラムREFMAC5（Acta Cryst. 2011, D67, 355-367）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出した２Ｆｏ－Ｆｃ、Ｆｏ－Ｆｃを係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot（Acta Cryst. 2010, D66, 486-501）でおこない、これらを繰り返すことでモデルの精密化をおこなった。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.87Åの24838個の回折強度データを用い、4758個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子Ｒ値は26.3%、Free R値は29.8%となった。

[0203] 〔実施例４〕結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体

実施例３において示したように、FcgRIIb結合増強改変体Fc(P208)のCH2ドメインBでは、P271G改変の導入にともなう周囲の構造変化の結果としてEUナンバリング268番目Aspが、EUナンバリング292番目Argと静電相互作用を形成していることが示唆された（図９）。この相互作用形成がEUナンバリング266-271番目のループ構造の安定化に働き、結果としてFcγRIIbへの結合増強に寄与した可能性が考えられる。そこでこのEUナンバリング268番目のAspをGluに改変することで、FcγRIIb292番目のArgとの静電相互作用を強化し、本ループ構造をさらに安定化させることで、FcgRIIbとの相互作用増強につながるか検討を行った。また図８に示した通り、FcgRIIbのEUナンバリング160番目Tyrは、Fc(P208) CH2ドメインAのEUナンバリング237番目Aspの主鎖と水素結合を形成し、FcgRIIbとの結合に重要な役割を果たしている。一方EUナンバリング237番目Aspの側鎖部分は特定の相互作用は形成していないものの、分子内でEUナンバリング332番目Ile、EUナンバリング333番目Glu、EUナンバリング334番目Lysが近傍に位置している。これらの部位を親水性残基に置換することでEUナンバリング237番目Aspと相互作用を強めて、本残基近傍のループ構造を安定化することで、FcγRIIbの160番目のTyrとの相互作用が増強されるか、併せて検証した。

[0204] 実施例2において作製したIL6R-BP230/IL6R-L（配列番号：27/配列番号：21）に対して、H268E、I332T、I332S、I332E、I332K、E333K、E333R、E333S、E333T、K334S、K334T、K334Ｅをそれぞれ導入した改変体を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。

[0205] 各改変体の各FcgRに対するKDを表２に示す。なお、表中の改変とはIL6R-B3(配列番号：23)に対して導入した改変を示す。ただしIL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lについては*として示した。表中の親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。KD(IIaR)/KD(IIb)とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出した値である。

[0206]

[表2]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.5	1.9	149.0
IL6R-BP264/IL6R-L	H268E	6.5E-09	4.8E-07	9.2E-06	1.2E-08	5.2E-05	40.6	2.3	265.0
IL6R-BP384/IL6R-L	K334R	3.0E-09	1.3E-06	1.8E-05	7.1E-08	4.5E-05	17.7	0.9	43.5
IL6R-BP390/IL6R-L	I332S	1.6E-09	4.9E-07	7.3E-06	2.1E-08	2.9E-05	22.9	2.2	144.9
IL6R-BP391/IL6R-L	I332T	9.6E-10	3.4E-07	4.4E-06	1.3E-08	1.9E-05	26.6	3.2	242.2
IL6R-BP392/IL6R-L	I332K	7.9E-09	7.3E-06	2.8E-05	9.9E-07	2.9E-05	7.3	0.2	3.1
IL6R-BP393/IL6R-L	I332R	1.1E-08	3.9E-06	4.6E-05	2.7E-06	4.8E-05	1.4	0.3	1.2
IL6R-BP465/IL6R-L	E333K	1.6E-08	6.1E-07	1.5E-05	2.1E-08	6.7E-05	29.8	1.8	151.2
IL6R-BP466/IL6R-L	E333R	1.5E-08	5.2E-07	1.1E-05	1.7E-08	2.9E-05	30.4	2.1	181.3
IL6R-BP467/IL6R-L	K334S	8.9E-10	1.1E-06	1.2E-05	4.1E-08	3.2E-05	25.8	1.0	75.4
IL6R-BP468/IL6R-L	K334T	9.7E-10	1.1E-06	9.7E-06	4.0E-08	2.7E-05	26.3	1.0	77.7
IL6R-BP469/IL6R-L	E333S	1.3E-08	6.0E-07	1.2E-05	2.3E-08	3.7E-05	26.4	1.8	136.6
IL6R-BP470/IL6R-L	E333T	1.5E-08	4.9E-07	1.0E-05	1.6E-08	3.7E-05	30.6	2.2	192.5

[0207] IL6R-BP230/IL6R-Lに対してH268Eを導入したIL6R-BP264/IL6R-L、E333Kを導入したIL6R-BP465/IL6R-L、E333Rを導入したIL6R-BP466/IL6R-L、E333Tを導入したIL6R-BP470は、IL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合、選択性共に向上していた。またI332Tを導入したIL6R-BP391/IL6R-Lは、IL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの選択性は低下するものの、FcgRIIbへの結合が向上していた。

[0208] 〔実施例５〕EUナンバリング271番目周辺への網羅的改変の導入

P238D改変をもつFc(P238D)とFcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(P208)とFcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を比較すると、最も構造的に大きな変化が見られるのは、EUナンバリング271番目の近傍の構造となっている（図９）。参考例８に示したようにFc（P238D)では、EUナンバリング270番目AspがFcγRIIbの131番目Argと強固な静電相互作用を形成する際に、EUナンバリング271番目Pro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。Fc（P208)/FcγRIIbの構造においては、P271Gの改変導入により、この構造的なひずみを解消するように主鎖レベルでの位置変化がおきており、その結果、EUナンバリング271番目の近傍の構造が大きく変化したと考えられる。この変化した構造をさらに安定化できるようううまく改変を導入できれば、FcγRIIb　131番目Argとの静電相互作用形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失をさらに軽減でき、結合活性向上につながる可能性があ

る。そこで、ＥＵナンバリング271番目の周辺に対して網羅的な改変を導入し、FcgRIIbに対する結合増強あるいは選択性の向上効果を示す改変を探索した。

網羅的な改変を導入する鋳型としては、IL6R-B3(配列番号：23)に対して、E233D、G237D、P238D、H268E、P271Gを導入したIL6R-BP267(配列番号：29)を作製し用いた。IL6R-BP267に対し、EUナンバリング264番目、265番目、266番目、267番目、269番目、272番目のアミノ酸を元のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。得られた改変体の中から、改変を導入する前のIL6R-BP267/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合を増強するもの、あるいはFcgRIIbへの選択性を向上させるものについて表３にまとめた。

[0209] [表3]

改変体名	IL6R-BP267に加えた改変	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP267/IL6R-L		4.0E-09	1.7E-06	1.9E-05	1.3E-07	5.3E-05	13.0	0.7	24.3
IL6R-BP348/IL6R-L	S267A	5.5E-10	7.0E-07	2.2E-05	4.6E-08	2.7E-05	15.3	1.5	67.6
IL6R-BP300/IL6R-L	V264I	9.6E-09	6.9E-07	2.2E-05	5.8E-08	5.6E-05	11.9	1.6	53.3
IL6R-BP367/IL6R-L	E269D	3.1E-09	1.2E-06	4.6E-05	1.0E-07	5.3E-05	11.7	0.9	30.6
IL6R-BP350/IL6R-L	S267E	8.9E-10	1.5E-07	8.3E-05	1.0E-07	8.9E-05	1.5	7.0	30.0
IL6R-BP333/IL6R-L	V266F	9.1E-09	1.5E-06	3.4E-05	1.2E-07	5.9E-05	12.5	0.7	26.4
IL6R-BP352/IL6R-L	S267G	1.8E-09	1.9E-06	2.8E-05	1.2E-07	4.3E-05	15.7	0.6	25.3
IL6R-BP339/IL6R-L	V266M	4.6E-09	1.4E-06	1.8E-05	1.3E-07	2.4E-05	11.3	0.8	24.5
IL6R-BP520/IL6R-L	E272M	3.9E-09	3.0E-06	3.1E-05	1.7E-07	4.7E-05	17.5	0.4	17.8
IL6R-BP523/IL6R-L	E272Q	3.7E-09	2.7E-06	2.9E-05	1.7E-07	4.1E-05	15.9	0.4	18.4
IL6R-BP313/IL6R-L	D265E	2.6E-08	1.3E-05	4.7E-05	8.4E-07	3.8E-05	15.6	0.1	3.7
IL6R-BP513/IL6R-L	E272D	3.8E-09	1.7E-06	3.9E-05	1.1E-07	7.5E-05	15.4	0.6	28.1
IL6R-BP521/IL6R-L	E272N	3.6E-09	2.9E-06	4.4E-05	1.9E-07	9.9E-05	15.2	0.4	16.0
IL6R-BP338/IL6R-L	V266L	1.5E-08	2.2E-06	2.2E-05	1.5E-07	2.5E-05	15.0	0.5	21.3
IL6R-BP517/IL6R-L	E272I	3.2E-09	2.1E-06	2.2E-05	1.4E-07	3.5E-05	14.7	0.5	21.5
IL6R-BP514/IL6R-L	E272F	4.3E-09	3.0E-06	6.4E-05	2.1E-07	9.1E-05	14.0	0.4	14.6

[0210] 各改変体の各FcgRに対するKDを表３に示す。なお、表中の「IL6R-BP267に加えた改変」とは、鋳型としたIL6R-BP267(配列番号：29)に対して導入した改変を示す。ただしIL6R-B3を作製する際の元となるIL6R-B3/IL6R-Lについては*として示した。表中の親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(I

Ib)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。KD(IIaR)/KD(IIb)とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表３中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0211] 表３に示した改変体はいずれも、IL6R-B3/IL6R-Lと比較してFcgRIa、FcgRIIaH、FcgRIIIaVへの結合が維持または減少していた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、V264I、E269D、S267E、V266F、S267G、V266Mを加えた改変体は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が増強されていた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fを加えた改変体は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lと比較してKD(IIaR)/KD(IIb)の値が増加しており、FcgRIIbへの選択性を向上させる効果を示した。

[0212] 〔実施例６〕CH3領域への改変導入によるFcgRIIbへの結合増強

EUナンバリング396番目のProをLeuに置換する改変はFcgRIIbへの結合を増強することが報告されている（Cancer Res., 2007, 67, 8882-8890）。EUナンバリング396番目はFcgRとの相互作用には直接関与しない部位であるが、抗体の構造を変化させることでFcgRとの相互作用に影響を与えると考えられる。そこで、EUナンバリング396番目に網羅的改変を導入することにより、FcgRIIbへの結合あるいは選択性が向上するかどうかについて検証を行った。

IL6R-B3(配列番号：23)に対し、E233D, G237D, P238D, S267A, H268E, P271G, A330Rを導入したIL6R-BP423(配列番号：33)を作製し、鋳型とした。IL6R

-BP423に対し、EUナンバリング396番目を元のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸に置換した改変体を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。得られた改変体の各FcgRへの結合を表４にまとめた。

[0213] [表4]

改変体名	IL6R-BP423に加えた改変	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP423/IL6R-L		7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	1.6E-05	34.2	6.3	604
IL6R-BP447/IL6R-L	P396A	9.0E-10	1.6E-07	2.0E-06	5.3E-09	2.5E-05	29.7	7.0	584
IL6R-BP448/IL6R-L	P396D	7.5E-10	1.3E-07	1.4E-06	4.1E-09	9.7E-06	31.7	8.5	759
IL6R-BP449/IL6R-L	P396E	9.1E-10	1.4E-07	1.5E-06	4.6E-09	1.2E-05	29.8	8.0	667
IL6R-BP450/IL6R-L	P396F	8.4E-10	1.2E-07	1.3E-06	4.1E-09	9.6E-06	29.4	9.2	763
IL6R-BP451/IL6R-L	P396G	9.8E-10	1.8E-07	2.0E-06	6.2E-09	1.2E-05	29.2	6.1	499
IL6R-BP452/IL6R-L	P396H	7.5E-10	1.3E-07	1.5E-06	5.1E-09	1.1E-05	25.9	8.3	602
IL6R-BP453/IL6R-L	P396I	7.5E-10	1.2E-07	9.3E-07	4.6E-09	7.4E-06	25.5	9.4	675
IL6R-BP454/IL6R-L	P396K	8.2E-09	1.3E-07	1.4E-06	4.8E-09	9.1E-06	27.5	8.4	649
IL6R-BP455/IL6R-L	P396L	7.5E-10	1.3E-07	1.6E-06	4.0E-09	8.5E-06	31.8	8.6	767
IL6R-BP456/IL6R-L	P396M	6.0E-10	1.2E-07	2.0E-06	3.5E-09	9.2E-06	35.3	8.9	888
IL6R-BP457/IL6R-L	P396N	9.1E-10	1.5E-07	2.6E-06	5.2E-09	1.3E-05	28.9	7.3	591
IL6R-BP458/IL6R-L	P396Q	7.8E-10	1.4E-07	1.4E-06	4.5E-09	1.1E-05	31.1	7.9	687
IL6R-BP459/IL6R-L	P396R	1.1E-09	1.5E-07	1.4E-06	5.1E-09	1.2E-05	28.9	7.5	607
IL6R-BP460/IL6R-L	P396S	8.7E-10	1.6E-07	3.2E-06	6.5E-09	1.4E-05	25.2	6.7	478
IL6R-BP461/IL6R-L	P396T	1.3E-09	1.3E-07	1.5E-06	5.1E-09	9.9E-06	24.4	8.8	602
IL6R-BP462/IL6R-L	P396V	9.7E-10	1.3E-07	1.4E-06	5.2E-09	9.0E-06	25.0	8.5	593
IL6R-BP463/IL6R-L	P396W	1.3E-09	1.6E-07	1.9E-06	5.6E-09	1.2E-05	28.1	7.0	554
IL6R-BP464/IL6R-L	P396Y	1.1E-09	1.3E-07	2.1E-06	4.0E-09	9.9E-06	31.5	8.7	773

[0214] なお、表中の「IL6R-BP423に加えた改変」とはIL6R-BP423に対して導入した改変を示すが、IL6R-BP423を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lについては*として示した。表中の親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。KD(IIaR)/KD(IIb)とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表４中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0215] 表４の結果より、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mを導入したIL6R-BP456/IL6R-L、P396Lを導入したIL6R-BP455/IL6R-L、P396Yを導入したIL6R-BP464/IL6R-L、P396Fを導入したIL6R-BP450/IL6R-L、P396Dを導入したIL6R-BP448/IL6R-L、P396Qを導入したIL6R-BP458/IL6R-L、P396Iを導入したIL6R-BP453/IL6R-L、P396Eを導入したIL6R-BP449/IL6R-L、P396Kを導入したIL6R-BP454/IL6R-L、P396Rを導入したIL6R-BP459/IL6R-Lはいずれも改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が向上していた。またKD(IIaR)/KD(IIb)の値から、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mを導入したIL6R-BP456/IL6R-Lは、改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lと比較してKD(IIaR)/KD(IIb)の値が大きく、FcgRIIbへの選択性が向上していた。表４中で作製した改変体はいずれもFcgRIa, FcgRIIaH, FcgRIIIaVへの親和性は親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lよりも低かった。

[0216] 〔実施例７〕サブクラス配列の利用によるFcgRIIb増強改変体の作製

ヒトIgGにはサブクラスが存在し、FcgRへの結合プロファイルが異なる。ここでは、IgG1とIgG4の各FcgRへの親和性の違いを、FcgRIIbへの結合、選択性の向上に利用できないか検証した。

まずはじめに、IgG1とIgG4の各FcgRへの親和性を解析した。抗体H鎖としては、ヒトIgG4 のＥＵナンバリング228番目のSerをProに置換し、C末端のGlyおよびLysを除去したG4dを有するIL6R-G4d(配列番号：30)を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、IL6R-G1d/IL6R-LおよびIL6R-G4d/IL6R-Lを発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR (FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。得られた改変体の各FcgRへの結合を表５にまとめた。

[0217]

[表5]

改変体名	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)
IL6R-G1d/IL6R-L	1.2E-10	9.7E-07	6.5E-07	3.9E-06	4.2E-07
IL6R-G4d/IL6R-L	6.6E-10	2.1E-06	3.4E-06	2.6E-06	3.4E-06

[0218] IL6R-G4d/IL6R-Lは、IL6R-G1d/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が1.5倍強く、FcgRIIaRへの結合が2.2倍弱いことが分かった。また、FcgRIa、FcgRIIaH、FcgRIIIaVへの親和性に関してもIL6R-G4d/IL6R-Lは、IL6R-G1d/IL6R-Lと比較して弱かった。以上の結果から、IL6R-G4dはIL6R-G1dと比較してFcgRIIbへの結合、選択性共に優れていることが明らかとなった。

[0219] 図１４はG1dとG4dのCH1からC末端までの配列(EUナンバリング１１８番目から445番目)を比較したものである。図１４中の枠で囲まれたアミノ酸はG1dとG4dで異なる残基であることを示している。これらの異なるアミノ酸の中から、FcgRとの相互作用に関与すると予想される部位をいくつか選択し、FcgRIIbへの結合、選択性共にすぐれているG4dの配列をFcgRIIb増強改変体に移植することで、更なる結合、選択性の向上が可能であるかどうかを検証した。

[0220] 具体的には、IL6R-BP230に対して、A327Gを導入したIL6R-BP473、A330Sを導入したIL6R-BP472、P331Sを導入したIL6R-BP471、A330SとP331Sを導入したIL6R-BP474、A327GとA330Sを導入したIL6R-BP475、A327G、A330S、P331Sを導入したIL6R-BP476、A327GとP331Sを導入したIL6R-BP477を作製した。またIL6R-BP230のEUナンバリング118番目のAlaから225番目のThrまでをG4dの配列(EUナンバリング118番目のAlaから222番目のProまで)に置換したIL6R-BP478(配列番号31)を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR (FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。

[0221] 各改変体の各FcgRに対するKDを表６に示す。なお、表中の「親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。「IL6R-B

P230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入した改変を示すが、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lについては*1として、またIL6R-BP230のEUナンバリング118番目のAlaから225番目のThrまでをG4dの配列(EUナンバリング118番目のAlaから222番目のProまで)に置換したIL6R-BP478(配列番号31)については*2として示した。「親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。KD(IIaR)/KD(IIb)とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表６中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出した値である。

[0222] [表6]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.5	1.9	149.0
IL6R-BP471/IL6R-L	P331S	7.3E-09	8.0E-07	1.2E-05	3.5E-08	7.1E-05	22.7	1.4	88.1
IL6R-BP472/IL6R-L	A330S	5.2E-09	3.3E-06	2.4E-05	1.5E-07	3.8E-05	21.5	0.3	20.3
IL6R-BP473/IL6R-L	A327G	6.2E-09	3.8E-07	4.8E-06	1.8E-08	3.6E-05	21.1	2.9	172.2
IL6R-BP474/IL6R-L	A330S/P331S	4.1E-09	3.0E-06	3.7E-05	1.8E-07	5.5E-05	16.6	0.4	16.9
IL6R-BP475/IL6R-L	A327G/A330S	4.9E-09	1.0E-06	1.5E-05	1.1E-07	4.6E-05	9.7	1.1	29.2
IL6R-BP476/IL6R-L	A327G/A330S/P331S	5.9E-09	1.3E-06	1.9E-05	1.3E-07	4.9E-05	9.7	0.9	23.7
IL6R-BP477/IL6R-L	A327G/P331S	9.2E-09	5.1E-07	7.6E-06	3.7E-08	5.8E-05	14.0	2.2	84.9
IL6R-BP478/IL6R-L	*2	7.7E-09	5.4E-07	6.7E-06	1.9E-08	3.5E-05	28.0	2.0	160.6

[0223] 表６に記載した改変体のうち、A327Gを導入したIL6R-BP473/IL6R-LはIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が1.2倍増強されていた。また、IL6R-BP230のEUナンバリング118番目のAlaから225番目のThrまでをG4dの配列(EUナンバリング118番目のAlaから222番目のProまで)に置換したIL6R-BP478/IL6R-LはIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合、FcgRIIaRへの結合共に1.1倍増強していた。いずれの改変体もFcgRIa, FcgRIIaH, FcgRIIIaVへの親

和性は親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lよりも低かった。

[0224] また図１４に示すように、G1dとG4dでこの他に異なるアミノ酸となっている部位としてEUナンバリング２６８番目、２７４番目、２９６番目、３５５番目、３５６番目、３５８番目、４０９番目、４１９番目、４４５番目が挙げられる。従ってこれらの部位をIgG4由来のアミノ酸に置換することでFcgRIIbへの結合および選択性が向上する可能性が考えられる。

ここまでの検討において、改変体IL6R-BP230/IL6R-Lに対してヒトIgG4の配列であるA327Gを移植することで、FcγRIIbへの結合活性が増強されることが示された。そこでIgG4とIgG1の配列で異なる部位についてさらに検討を行った。

具体的には、抗体H鎖としてIL6R-BP230に対して、K274Qを導入したIL6R-BP541、Y296Fを導入したIL6R-BP542、H268Qを導入したIL6R-BP543、R355Qを導入したIL6R-BP544、D356Eを導入したIL6R-BP545、L358Mを導入したIL6R-BP546、K409Rを導入したIL6R-BP547、Q419Eを導入したIL6R-BP548を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-Lを共通して用いた。参考例１の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が参考例２の方法により評価された。

各改変体の各FcγRに対するKDを表7に示した。なお、表中の、「親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。表中の「IL6R-BP230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*1として示した。「親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD（IIaR)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表7において灰

色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載された

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出された数値である。

[表7]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.0E-08	4.9E-07	9.7E-06	1.8E-08	3.9E-05	28.0	2.2	175.6
IL6R-BP541/IL6R-L	K274Q	1.1E-08	4.5E-07	9.3E-06	1.6E-08	4.1E-05	27.8	2.4	189.6
IL6R-BP542/IL6R-L	Y296F	1.3E-08	4.9E-07	9.7E-06	2.0E-08	4.3E-05	24.4	2.2	153.7
IL6R-BP543/IL6R-L	H268Q	2.3E-08	5.6E-07	7.4E-06	2.0E-08	4.6E-05	27.3	1.9	151.5
IL6R-BP544/IL6R-L	R355Q	9.8E-09	4.8E-07	1.2E-05	1.7E-08	4.5E-05	28.8	2.2	183.9
IL6R-BP545/IL6R-L	D356E	9.9E-09	5.7E-07	9.1E-06	1.7E-08	4.5E-05	32.7	1.9	178.6
IL6R-BP546/IL6R-L	L358M	9.0E-09	5.0E-07	1.0E-05	1.5E-08	3.7E-05	32.8	2.2	204.6
IL6R-BP547/IL6R-L	K409R	1.2E-08	4.9E-07	7.5E-06	1.9E-08	3.5E-05	25.5	2.2	162.6
IL6R-BP548/IL6R-L	Q419E	1.2E-08	5.0E-07	9.4E-06	1.9E-08	3.4E-05	26.2	2.2	161.8

表7に示すように、IL6R-BP230/IL6R-Lに対してK274Qを導入したIL6R-BP541/IL6R-L、R355Qを導入したIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eを導入したIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mを導入したIL6R-BP546/IL6R-L は改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcγRIIbへの結合が増強されていた。またこの中で、IL6R-BP230/IL6R-Lに対してR355Qを導入したIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eを導入したIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mを導入したIL6R-BP546/IL6R-Lは改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してKD(IIaR)/KD(IIb)の値が増加しており、FcγRIIbへの選択性についても向上する改変であることが示された。

[0225] 〔実施例８〕FcgRIIbへの結合増強、選択性の向上をもたらす改変の組み合わせ検討

これまでの検討において見出されたFcγRIIbへの結合活性あるいは選択性を向上させる改変の組み合わせについて検討し、さらなる最適化を試みた。

IL6R-B3に対してこれまでの検討の中でFcγRIIbへの結合の増強、および/または選択性の向上をもたらした改変の組合せが導入された。また比較対照

として既存のFcγRIIbへの結合を増強する改変（Seungら（Mol. Immunol.（2008）45, 3926-3933））である、S267E、およびL328Fの改変がIL6R-B3に導入されたIL6R-BP253が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-Lが用いられた。参考例１の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考例２の方法によって評価された。

各改変体の各FcγRに対するKDを表8に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3に対して導入された改変を示した。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKDで除した値を指す。KD（IIaR)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaRと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。またKD（IIaH)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaHに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaHと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表8において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載された

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した数値である。

[0226]

[表8]

改変体名	改変	FcgRIa に対する KD(mol/L)	FcgRIIaR に対する KD(mol/L)	FcgRIIaH に対する KD(mol/L)	FcgRIIb に対する KD(mol/L)	FcgRIIIaV に対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	KD(IIaH)/ KD(IIb)	親ポリペプチドの KD(IIaR)/ 改変ポリペプチドの KD(IIaR)	親ポリペプチドの KD(IIb)/ 改変ポリペプチドの KD(IIb)
G1d		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.1	1.2
B3	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
BP253	S267E/L328F	6.7E-11	2.1E-09	1.2E-06	1.1E-08	3.6E-06	0.2	107.1	528.8	276.8
BP262	G237D/P238D/H268E/P271G	1.0E-08	2.0E-06	4.5E-05	1.2E-07	5.6E-05	17.0	375.0	0.5	25.8
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	7.4E-09	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.5E-05	28.3	227.6	3.2	252.0
BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.3E-08	6.3E-07	1.2E-05	1.5E-08	9.6E-05	41.2	789.5	1.9	203.9
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	1.4E-08	3.2E-07	1.1E-05	1.8E-08	4.0E-05	18.0	621.5	3.4	175.1
BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	4.5E-09	1.8E-06	2.1E-05	9.2E-08	2.8E-05	19.6	228.3	0.6	33.7
BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	2.2E-06	7.2E-05	1.1E-07	1.4E-04	19.6	637.2	0.5	27.4
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	1.6E-05	34.2	390.6	6.3	605.5
BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	4.1E-09	2.2E-07	1.5E-05	9.1E-09	4.2E-05	23.6	1644.7	5.1	339.9
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R	1.0E-09	1.6E-07	4.9E-05	5.9E-09	4.1E-05	27.6	8361.8	6.9	529.0
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	4.9E-09	3.9E-07	4.2E-05	1.4E-08	3.6E-05	28.0	3000.0	2.8	221.4
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	6.2E-09	1.7E-07	3.5E-06	5.4E-09	3.8E-05	31.5	648.1	6.5	574.1
BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	2.2E-07	1.1E-05	1.2E-08	3.5E-05	18.5	909.1	4.9	256.2
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R	3.6E-09	4.1E-07	7.6E-06	1.2E-08	3.2E-05	34.6	649.6	2.7	265.0
BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K/I332T	7.5E-10	6.8E-07	7.3E-06	3.4E-08	2.9E-05	20.0	216.0	1.6	91.7
BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T	5.5E-10	3.4E-07	4.1E-06	1.2E-08	2.5E-05	27.2	333.3	3.3	252.0
BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T	1.0E-09	4.2E-07	3.4E-06	1.6E-08	2.2E-05	27.1	217.9	2.6	198.7
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	2.6E-10	2.2E-07	2.1E-06	5.1E-09	1.3E-05	43.8	411.0	4.9	606.7
BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	7.5E-10	2.2E-07	1.4E-06	5.9E-09	1.1E-05	37.7	236.5	4.9	523.6
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T	2.1E-10	1.8E-07	1.6E-06	5.5E-09	8.8E-06	32.7	293.6	6.2	568.8
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	2.8E-06	6.1E-09	6.0E-05	20.9	460.5	8.7	509.9
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	1.6E-06	5.2E-09	2.8E-05	24.0	307.1	8.8	595.0
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	3.6E-07	3.8E-06	1.5E-08	3.7E-05	24.0	562.8	3.0	205.3
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R	4.5E-09	3.8E-07	4.7E-06	1.2E-08	2.5E-05	30.6	379.0	2.9	250.0
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R	1.8E-08	5.1E-07	9.5E-06	2.3E-08	2.3E-05	21.7	406.0	2.2	132.5
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.0E-09	8.0E-08	1.5E-06	2.6E-09	2.4E-05	31.0	581.4	13.8	1201.6
BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G	5.3E-09	9.0E-07	1.5E-05	5.6E-08	4.0E-05	16.1	268.3	1.2	55.5
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G	1.3E-08	6.3E-06	2.1E-05	2.0E-07	4.6E-05	32.1	107.7	0.2	15.9
BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.0E-09	4.0E-07	6.8E-06	1.9E-08	2.4E-05	20.5	350.5	2.8	159.8
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.3E-09	1.3E-06	1.8E-05	7.8E-08	2.5E-05	16.8	230.8	0.8	39.7
BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G	8.2E-10	7.8E-07	1.1E-05	4.6E-08	2.5E-05	17.1	240.7	1.4	67.8
BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M	1.2E-09	3.9E-08	8.4E-07	1.2E-09	1.0E-05	33.8	730.4	28.3	2695.7
BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.2E-09	7.4E-08	1.6E-06	1.9E-09	2.0E-05	40.1	864.9	14.8	1675.7
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.3E-09	4.3E-08	8.7E-07	1.0E-09	1.2E-05	42.8	870.0	25.7	3100.0
BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.5E-09	1.1E-07	2.4E-06	2.4E-09	2.3E-05	46.7	1000.0	9.8	1291.7
BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.3E-09	1.2E-07	2.2E-06	3.0E-09	2.1E-05	38.8	723.7	9.3	1019.7
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	7.9E-10	9.2E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.6E-05	38.8	678.0	1.2	131.4
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	8.2E-10	1.1E-06	1.9E-05	2.1E-08	3.6E-05	52.1	900.5	1.0	146.9
BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.9E-09	2.5E-07	5.4E-06	6.6E-09	4.0E-05	38.6	820.7	4.3	471.1
BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.3E-09	4.9E-07	1.2E-05	9.7E-09	3.3E-05	50.9	1243.5	2.2	321.2
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.2E-09	4.7E-07	3.7E-06	1.8E-08	3.0E-05	25.5	201.1	2.3	168.5
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R	2.1E-09	8.5E-08	9.6E-07	4.1E-09	2.8E-05	21.0	236.5	12.9	763.5
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L	1.3E-09	5.1E-08	9.3E-07	1.7E-09	1.0E-05	30.8	563.6	21.7	1878.8
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	1.2E-09	4.9E-08	1.0E-06	1.5E-09	1.2E-05	33.8	684.9	22.3	2123.3
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.3E-09	7.2E-07	2.5E-05	2.4E-08	3.9E-05	29.9	1033.1	1.5	128.1
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	2.1E-09	6.3E-07	1.4E-05	2.5E-08	1.9E-05	25.1	555.6	1.7	123.0
BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R	2.1E-09	1.1E-07	1.3E-06	3.7E-09	2.4E-05	29.5	352.3	10.1	840.1
BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.2E-09	5.7E-08	8.6E-07	1.7E-09	2.1E-05	33.2	502.9	19.4	1812.9
BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P	1.4E-09	4.5E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.4E-05	18.5	658.4	2.4	127.6
BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D	1.1E-09	4.3E-07	1.1E-05	2.1E-08	3.8E-05	20.0	514.0	2.6	144.9
BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	3.1E-09	1.2E-07	2.5E-06	3.4E-09	5.5E-05	35.1	731.0	9.2	906.4
BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	2.6E-09	1.0E-07	1.8E-06	2.9E-09	2.6E-05	34.2	618.6	11.1	1065.3
BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D	1.4E-09	5.4E-07	2.0E-05	2.1E-08	6.1E-05	26.0	961.5	2.0	149.0
BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	5.2E-07	7.9E-06	1.8E-08	2.3E-05	29.2	443.8	2.1	174.2
BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	6.0E-09	1.7E-07	4.0E-06	3.8E-09	2.5E-05	43.5	1041.7	6.6	807.3
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.0E-09	1.8E-07	4.3E-06	3.5E-09	7.1E-05	50.6	1235.6	6.3	890.8
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.4E-09	1.2E-07	3.5E-06	3.8E-09	2.7E-05	33.1	933.3	8.9	826.7
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.2E-08	9.4E-08	1.9E-06	3.2E-09	2.6E-05	29.3	593.8	11.7	968.8
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	7.7E-09	1.2E-07	2.6E-06	4.1E-09	2.7E-05	29.3	634.1	9.2	756.1
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	9.3E-09	9.1E-08	1.8E-06	3.0E-09	2.5E-05	30.7	606.1	12.1	1043.8
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.1E-08	9.2E-08	3.2E-06	4.0E-09	3.3E-05	23.2	806.0	11.9	780.9
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	8.9E-09	7.9E-08	1.3E-06	3.0E-09	2.3E-05	26.6	437.7	13.9	1043.8
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	2.9E-08	2.7E-07	3.1E-06	6.9E-09	3.6E-05	39.1	447.3	4.1	447.3
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	5.5E-08	2.0E-07	3.0E-06	5.3E-09	3.0E-05	38.6	568.2	5.4	587.1
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.4E-08	3.3E-07	5.6E-06	8.4E-09	3.4E-05	39.0	666.7	3.4	369.0
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	9.6E-08	2.1E-07	4.6E-06	5.7E-09	3.9E-05	36.6	802.8	5.2	541.0
BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	1.8E-08	5.7E-07	1.1E-05	1.6E-08	2.4E-05	35.9	696.2	1.9	196.2
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	3.4E-07	5.0E-06	7.6E-09	4.8E-05	44.2	655.3	3.3	406.3
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-08	2.5E-07	2.8E-06	6.4E-09	4.8E-05	38.1	435.5	4.5	482.1
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-09	9.7E-08	1.9E-06	2.6E-09	3.0E-05	37.3	733.6	11.4	1196.9
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	3.4E-09	8.6E-08	1.4E-06	3.1E-09	2.0E-05	27.8	453.1	12.8	1003.2
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	8.0E-09	1.5E-07	2.3E-06	4.4E-09	2.4E-05	32.7	518.0	7.6	698.2
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	1.6E-07	3.2E-06	4.1E-09	3.0E-05	39.7	778.6	6.7	754.3
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	4.3E-08	3.0E-07	5.8E-06	8.4E-09	6.0E-05	35.4	692.1	3.7	369.9
BP557	G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.3E-08	8.5E-07	1.5E-05	2.0E-08	2.9E-05	42.0	746.3	1.3	154.2
BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R	1.3E-08	3.3E-07	4.9E-06	9.0E-09	3.6E-05	36.4	543.2	3.4	343.7
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	1.6E-06	2.0E-05	2.8E-08	4.4E-05	58.4	711.7	0.7	110.3
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.6E-09	4.2E-06	3.1E-05	1.8E-07	4.1E-05	22.8	168.5	0.3	16.8
BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	5.1E-07	5.3E-06	1.8E-08	3.7E-05	28.0	291.2	2.2	170.3
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	6.8E-07	1.1E-05	2.4E-08	5.3E-05	29.0	466.1	1.6	131.4
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	1.2E-08	4.6E-07	8.3E-06	1.6E-08	3.8E-05	29.1	525.3	2.4	196.2
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.1E-08	5.8E-07	1.0E-05	2.2E-08	4.9E-05	26.2	454.5	1.9	140.9
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.4E-09	2.3E-07	4.7E-06	5.5E-09	2.1E-05	41.5	856.1	4.8	564.7
BP567	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.1E-10	8.9E-07	1.7E-05	1.4E-08	3.9E-05	64.4	1231.9	1.2	224.6
BP568	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.9E-10	6.8E-07	1.1E-05	1.5E-08	2.5E-05	46.1	748.3	1.6	210.9

[0227] 表8に記載された改変体のうち、FcγRIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIIbおよびFcγRIIaRに対する結合活性は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して、それぞれ277倍、および529倍増強された。また、IL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIaへの結合活性もIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも増強されていた。一方、IL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIIa

HおよびFcγRIIIaVへの結合はIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。その他の改変体のうち、IL6R-BP436/IL6R-L、IL6R-BP438/IL6R-L、IL6R-BP567/IL6R-L、IL6R-BP568/IL6R-LのFcγRIaへの結合が、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較してわずかに増強されたが、それ以外の改変体のFcγRIaへの結合はいずれも減弱していた。また、いずれの改変体もFcγRIIaH、およびFcγRIIIaVへの結合は、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。

本検討で作製された改変体と、既存のFcγRIIbへの結合増強改変体であるIL6R-BP253/IL6R-Lを比較すると、KD(IIaH)/KD(IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP480/IL6R-Lで107.7、最も高かったIL6R-BP426/IL6R-Lで8362であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの107.1と比較して高かった。またKD(IIaR)/KD(IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP479/IL6R-Lで16.1、最も高かったIL6R-BP567/IL6R-Lで64.4であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの0.2と比較して高かった。これらの結果から、表8に記載された改変体はいずれも、既存のFcγRIIbに対する結合増強改変が加えられた改変体と比較してFcγRIIbへの選択性が向上した改変体であることが示された。特に、IL6R-BP559/IL6R-L、IL6R-BP493/IL6R-L、IL6R-BP557/IL6R-L、IL6R-BP492/IL6R-L、IL6R-BP500/IL6R-L、IL6R-BP567/IL6R-LはいずれもFcγRIIaRへの結合をIL6R-B3/IL6R-Lと比較して1.5倍以下に維持しつつ、FcγRIIbへの結合活性が100倍以上に増強されていることから、FcγRIIaRへの結合を増強してしまうことによる副作用を回避しながらFcγRIIbへの結合増強による効果を示すことが期待される。

またIL6R-BP489/IL6R-L、IL6R-BP487/IL6R-L、IL6R-BP499/IL6R-L、IL6R-BP498/IL6R-L、IL6R-BP503/IL6R-L、IL6R-BP488/IL6R-L、IL6R-BP490/IL6R-L、IL6R-BP445/IL6R-L、IL6R-BP552/IL6R-L、IL6R-BP507/IL6R-L、IL6R-BP536/IL6R-L、IL6R-BP534/IL6R-L、IL6R-BP491/IL6R-L、IL6R-BP553/IL6R-L、IL6R-BP532/IL6R-L、IL6R-BP506/IL6R-L、IL6R-BP511/IL6R-L、IL6R-BP502/IL6R-L、IL6R-BP531/IL6R-L、IL6R-BP510/IL6R-L、IL6R-BP535/IL6R-L、IL6R-BP4

97/IL6R-L、IL6R-BP533/IL6R-L、IL6R-BP555/IL6R-L、IL6R-BP554/IL6R-L、IL6R-BP436/IL6R-L、IL6R-BP423/IL6R-L、IL6R-BP440/IL6R-L、IL6R-BP538/IL6R-L、IL6R-BP429/IL6R-L、IL6R-BP438/IL6R-L、IL6R-BP565/IL6R-L、IL6R-BP540/IL6R-L、IL6R-BP426/IL6R-L、IL6R-BP437/IL6R-L、IL6R-BP439/IL6R-L、IL6R-BP551/IL6R-L、IL6R-BP494/IL6R-L、IL6R-BP537/IL6R-L、IL6R-BP550/IL6R-L、IL6R-BP556/IL6R-L、IL6R-BP539/IL6R-L、IL6R-BP558/IL6R-L、IL6R-BP425/IL6R-L、IL6R-BP495/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、FcγRIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-Lのそれと比較して上回っており、最も低かったIL6R-BP495/IL6R-Lから、最も高かったIL6R-BP489/IL6R-Lまでの増強の幅は、IL6R-B3/IL6R-Lの結合を1とした場合に321倍から3100倍までであった。従ってこれらの改変体は、FcγRIIbへの結合、選択性の両面で既存技術よりも優れた改変体であると言える。

ここで、FcγRIIbへの選択性の観点から最も優れていると考えられるIL6R-BP567/IL6R-Lと関連する改変体について、免疫原性の観点から考察した。最も選択性の高かったIL6R-BP567/IL6R-Lおよび、FcγRIIaRへの結合が天然型と比較して全く同等でFcγRIIbへの結合を147倍増強したIL6R-BP493/IL6R-LはY296D改変が導入されている。Y296はTregitope配列に含まれることが報告されており（De Grootら（Blood (2008) 112, 3303-3311））、この部位への改変導入は本来天然型IgG1が有する免疫抑制的な機能が損なわれる可能性がある。従って免疫原性の観点からは、Y296D改変を含まない改変体がより好ましい。IL6R-BP568/IL6R-LおよびIL6R-BP492/IL6R-Lは、それぞれIL6R-BP567/IL6R-LおよびIL6R-BP493/IL6R-Lから、Y296D改変を抜いたものである。FcγRIIbに対する結合活性および選択性についてみると、IL6R-BP492/IL6R-LおよびIL6R-BP568/IL6R-LはY296D改変を抜くことにより選択性、結合活性共にY296Dを含む場合よりも低下してしまっていた。しかしながら、IL6R-BP568/IL6R-Lは天然型と比較してFcγRIIaRへの結合が1.6倍、FcγRIIbへの結合が211倍であり、また、IL6R-BP492/IL6R-LはFcγRIIaRへの結合が1.2倍、FcγRIIbへの結合が131倍と依然として高い選択性と結合活性を維持していた。これらの

結果から、IL6R-BP568/IL6R-L およびIL6R-BP492/IL6R-L は、FcγRIIbへの結合活性、選択性に加えて免疫原性の面からも優れた改変体であると言える。

[0228] 〔実施例９〕ヘテロ二量化抗体によるFcgRIIbへの結合増強

９－１．P238Dを片鎖にのみ導入した検討

参考例７の図２６に示すように、Fc(P238D)がFcgRIIbへの高いFcgRIIbへの結合を獲得した要因は、P238D改変を導入することによって、Proでは周辺残基と疎水性コアを形成していたものが、Aspに変化することで疎水性コアに存在できなくなり溶媒側を向いた結果、ドメインAのループ構造が大きく変化したことに起因する。しかしながら、両方の鎖に対してP238D改変を導入する必要があるのか、また、片方の鎖に対してP238Dを導入し、もう片方の鎖に対しては他の改変でも良いのかという点については検討の余地がある。そこで抗体の各H鎖に異なる改変を導入したヘテロ二量化抗体を利用してこれらの点について検証を行った。

抗体H鎖には、WO2009/041062に開示されている血漿中動態が改善した抗グリピカン３抗体であるGpH7のCDRを含むグリピカン３抗体の可変領域(配列番号：15)を使用した。GpH7を可変領域に持つIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したGpH7-G1d(配列番号：34)に対し、D356KおよびH435Rの改変を導入したGpH7-A5(配列番号：35)、GpH7-G1dにK439Eの改変を導入したGpH7-B3(配列番号：17)を利用した。それぞれのH鎖に導入したD356KおよびK439Eの改変は、２つのH鎖からなるヘテロ二量化抗体を産生する際に、各H鎖のヘテロ体を効率的に形成させるために導入した(WO2006/106905)。H435RはProteinAへの結合を妨げる改変であり、異なる改変が導入された二つのH鎖からなる二量体であるヘテロ体と同じ改変が導入された二つのH鎖からなる二量体であるホモ体を効率よく分離するために導入した。一方のH鎖として、参考例１で作製したGpH7-B3(配列番号：17)に対し、EUナンバリング236番目、237番目、238番目のアミノ酸を元のアミノ酸とCysに置換した改変体を用いた。またもう一方の鎖としては、GpH7-A5(配列番号：35)に対してP238Dを導入したGpH7-AP001を作

製した。抗体L鎖には、WO2009/041062に開示される血漿中動態が改善したグリピカン３抗体のGpL16-k0(配列番号：16)を共通に使用した。これらの改変体を参考例１の方法により発現、精製し、参考例２の方法により各FcgRIIaR型、FcgRIIbに対する結合を評価した。各改変体のFcgRに対する結合量を図１５に示す。

[0229] 図１５に示した改変G237W, G237F, G236N, P238G, P238N, P238E, P238DはGpH7-B3に導入した改変を指す。また、A5/B3はどちらの鎖にも改変を導入していない、GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0を示し、片鎖にのみP238Dを含む改変体とは、GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0を示す。また、これらの結果を表９に示す。

[0230] [表9]

改変体名	GpH7-A5に導入した改変	GpH7-B3に導入した改変	GpH7-AP001/GpH7-BF648を100とした場合の改変ポリペプチドのFcgRIIaRへの結合量	GpH7-AP001/GpH7-BF648を100とした場合の改変ポリペプチドのFcgRIIbへの結合量	FcgRIIbへの結合量/FcgRIIaRへの結合量
GpH7-G1d/GpL16-k0	*	*	515	65	0.5
GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0			570	77	0.5
GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0		P238D	677	131	0.8
GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0	P238D	P238D	100	100	4.0
GpH7-AP001/GpH7-BP032/GpL16-k0	P238D	G236N	538	129	1.0
GpH7-AP001/GpH7-BP044/GpL16-k0	P238D	G237F	609	127	0.8
GpH7-AP001/GpH7-BP057/GpL16-k0	P238D	G237W	561	121	0.9
GpH7-AP001/GpH7-BP061/GpL16-k0	P238D	P238E	111	80	2.9
GpH7-AP001/GpH7-BP063/GpL16-k0	P238D	P238G	161	69	1.7
GpH7-AP001/GpH7-BP069/GpL16-k0	P238D	P238N	131	72	2.2

[0231] 表９中の「FcgRIIbへの結合量/FcgRIIaRへの結合量」とは、各改変体のFcgRIIbに対する結合量を各改変体のFcgRIIaRに対する結合量で割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbに対する選択性が高いことを示す。また、「Gp

H7-A5に導入した改変」および「GpH7-B3に導入した改変」は、それぞれGpH7-A5およびGpH7-B3に導入した改変を示すが、GpH7-A5およびGpH7-B3を作製する際の鋳型としたGpH7-G1dについては*として示した。表９の結果から両方の鎖にP238D改変を有するGpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0が最もFcgRIIbへの選択性が高かった。また、もう片方の鎖にP238E、P238N、P238Gをもつ GpH7-AP001/GpH7-BP061/GpL16-k0、GpH7-AP001/GpH7-BP069/GpL16-k0、GpH7-AP001/GpH7-BP063/GpL16-k0はFcgRIIbへの結合量/FcgRIIaRへの結合量がそれぞれ2.9、2.2、1.7であり、両方の鎖にP238D改変を有するGpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0と比較してもFcgRIIbへの高い選択性を維持していた。また、FcgRIIbへの親和性についても両方の鎖にP238D改変を有するGpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0の69%以上を維持していたことから、片方の鎖にP238D改変が存在すれば、もう片方の鎖についてはP238E, P238N, P238Gに代替可能であると言える。また、FcgRIIbへの結合に着目すると、両方の鎖にP238Dを含むGpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0と比較して、片方の鎖にのみP238Dを含み、もう片方の鎖には改変を含まないGpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0の方がFcgRIIbに対して強く結合し、片方の鎖にP238Dを含み、もう片方の鎖にそれぞれG236N、G237F、G237Wを含むGpH7-AP001/GpH7-BP032/GpL16-k0、GpH7-AP001/GpH7-BP044/GpL16-k0、GpH7-AP001/GpH7-BP057/GpL16-k0の方が、より強くFcgRIIbに結合することが明らかとなった。

[0232] ９－２．Fc(P208)/FcgRIIbの構造情報を基にした改変の検証

図１０に示したように、Fc(P208)/FcgRIIbの結晶構造においてはFcgRIIbの１１７番目Lysの電子密度が観察されておらず、本残基はFc(P208)との結合に大きくは関与していないと考えられ、近傍に位置するCH2ドメインBのEUナンバリング239番目SerをAspもしくはGluに置換することで、このFcgRIIbの117番目Lysとの間に静電相互作用を形成できる可能性がある。一方、図７に示したようにCH2ドメインAにおいては、EUナンバリング239番目Serは、EUナンバリング236番目Glyと水素結合を形成し、EUナンバリング233番目から239番目のループ構造を安定化することで、FcgRIIbのEUナンバリング160番目Tyrとの

結合強化に寄与していると考えられ、この部位の置換はCH2ドメインAにおいてループ構造の不安定化とそれにともなう結合活性の低下を招くことが予想され、ホモ改変ではこれらが相殺しあうことが予想された。そこで本検討では、ヘテロ二量化により片方の鎖にのみS239DもしくはS239Eの改変を導入し、FcgRIIbへの結合増強効果を検証した。

[0233] 片方の抗体H鎖としてIL6R-BP208(配列番号：24)に対してS239Dを導入したIL6R-BP256およびS239Eを導入したIL6R-BP257を作製した。同様に、IL6R-BP230(配列番号：27)に対してS239Dを導入したIL6R-BP259および、S239Eを導入したIL6R-BP260を作製した。もう一方の抗体H鎖として、IL6R-A5(配列番号：69)に対してIL6R-BP208のCH2に含まれるものと同じ改変であるE233D, G237D, P238D, H268D, P271G, A330Rを導入したIL6R-AP002および、IL6R-BP230のCH2に含まれるものと同じ改変であるE233D, G237D, P238D, H268D, P271G, Y296D, A330Rを導入したIL6R-AP009を作製し、用いた。また比較対象として既存のFcgRIIb増強技術（非特許文献２８）である、S267E、L328FをIL6R-B3に導入したIL6R-BP253（配列番号：32）を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用いた。参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIIaV型)に対する結合を評価した。

[0234] 各改変体の各FcgRに対するKDを表１０に示す。表中の「親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、「親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。「KD(IIaR)/KD(IIb)」とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表１０中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0235] [表10]

改変体名	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1
IL6R-B3/IL6R-L	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1
IL6R-BP253/IL6R-L	5.0E-11	2.3E-09	8.6E-07	8.9E-09	4.0E-07	0.3	480.0	349
IL6R-BP208/IL6R-L	1.9E-08	8.5E-07	8.3E-06	3.2E-08	5.3E-05	26.3	1.3	95
IL6R-BP256/IL6R-L	2.0E-09	7.3E-07	2.1E-05	8.7E-08	1.1E-05	8.4	1.5	36
IL6R-BP257/IL6R-L	3.1E-10	1.3E-06	3.9E-05	4.3E-07	1.9E-05	3.0	0.9	7
IL6R-AP002/IL6R-BP256/IL6R-L	3.6E-09	1.4E-07	4.2E-06	4.1E-09	1.7E-05	34.3	7.7	752
IL6R-AP002/IL6R-BP257/IL6R-L	1.9E-09	1.3E-07	4.9E-06	4.7E-09	1.4E-05	27.7	8.3	657
IL6R-BP230/IL6R-L	1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP259/IL6R-L	3.1E-09	8.6E-07	1.8E-05	1.1E-07	1.1E-05	8.0	1.3	29
IL6R-BP260/IL6R-L	3.1E-10	1.2E-06	3.9E-05	3.8E-07	2.1E-05	3.2	0.9	8
IL6R-AP009/IL6R-BP259/IL6R-L	3.5E-09	1.9E-07	6.6E-06	3.9E-09	2.2E-05	47.7	5.8	788
IL6R-AP009/IL6R-BP260/IL6R-L	1.7E-09	1.4E-07	5.4E-06	4.2E-09	1.6E-05	34.2	7.6	739

[0236] 表１０の結果から、IL6R-BP208/IL6R-Lに対して片鎖にS239Dを導入したIL6R-AP002/IL6R-BP256/IL6R-L、S239Eを導入したIL6R-AP002/IL6R-BP257/IL6R-Lは、いずれもIL6R-BP208/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合が増強されていた。またKD(IIaR)/KD(IIb)の値もIL6R-BP256/IL6R-Lを上回っており、FcgRIIbへの選択性においても向上していた。一方、IL6R-BP208/IL6R-Lの両方の鎖に対してS239Dを導入したIL6R-BP256/IL6R-Lおよび、両方の鎖にS239Eを導入したIL6R-BP257/IL6R-LはFcgRIIbへの結合、選択性共にIL6R-BP208/IL6R-Lと比較して大幅に低下した。このように一方の鎖にのみS239DもしくはS239Eを導入した場合にはFcgRIIbへの結合増強効果が見られたのに対し、両方の鎖に導入した場合にFcgRIIbに対する結合が大幅に低下した理由としては、前述の通り、CH2ドメインAにおけるループ構造の不安定化が要因であると考えられ

る。IL6R-BP230/IL6R-Lを鋳型としてS239D、S239Eを導入した場合においても同様の結果が見られた。IL6R-BP230/IL6R-Lの片方の鎖にそれぞれS239D、S239Eを導入したIL6R-AP009/IL6R-BP259/IL6R-L、IL6R-AP009/IL6R-BP260/IL6R-LはFcgRIIbへの結合、選択性ともにIL6R-BP230/IL6R-Lを上回ったが、両方の鎖にそれぞれS239D、S239Eを導入したIL6R-BP259/IL6R-L、IL6R-BP260/IL6R-Lはいずれも FcgRIIbへの結合、選択性共にIL6R-BP230/IL6R-Lと比較して大幅に低下した。また、IL6R-BP208/IL6R-LおよびIL6R-BP230/IL6R-Lの片方の鎖にS239D、もしくはS239Eを導入した改変体は、いずれも既存のFcgRIIb増強技術を利用したIL6R-BP253/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの結合、選択性共に上回っていた。

[0237] ９－３．Fc(P208)/FcgRIIaRの構造情報を基にした改変の検証

実施例３においてFc(P208)のFcgRIIbとの結晶構造とFcgRIIaRとの結晶構造を比較したところ、FcgRIIb160番目Tyrと水素結合を形成するEUナンバリング237番目付近において電子密度上に差が見られ、FcgRIIbとの結合にはCH2ドメインA側の、FcgRIIaRとの結合にはCH2ドメインB側の寄与が大きいことが示唆された（図１２、図１３）。たとえば、電位密度の見え方からみて、FcgRIIaR型との結合においては、CH2ドメインBの　EUナンバリング234番目Leu、235番目Leuがレセプターとの結合に関与していると考えられるが、一方で、FcgRIIbとの結合においては、これら残基の関与は少ないと考えられる。そこで、これら２つの残基を疎水性以外の残基へ置換することで、FcgRIIaR型との相互作用の方をより大きく低減できる可能性が考えられる。ただし、CH2ドメインＡ側においては、EUナンバリング234番目Leu、235番目Leuの残基は、EUナンバリング237番目付近のループ構造の安定化に寄与していると考えられ、特にFcgRIIbとの結合により大きく関与している可能性が高い。このため、これら残基を疎水性以外の残基へ置換することはCH2ドメインAにおけるFcgRIIbとの相互作用をより低下させる可能性がある。特にEUナンバリング235番目LeuはFcgRIIbとの複合体構造のCH2ドメインAにおいて良好な疎水相互作用を形成しており、EUナンバリング237番目付近のループ構造安定化への寄与が大きい

と考えられるため、本残基については片方の鎖のみ疎水性以外の残基に置換する検討を行った。また、両鎖のEUナンバリング235番目のLeuをそれ以外の疎水性アミノ酸に置換することで、特にCH2ドメインAでの疎水性相互作用をより強化し、EUナンバリング237番目付近のループ構造をより安定化できれば、FcgRIIb 160番目Tyrとの水素結合形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失の軽減につながり、FcgRIIbへの結合および選択性が向上する可能性があるのでそれについても併せて検討を行った。

[0238] 抗体H鎖としてはIL6R-B3（配列番号：23）に対し、E233D, G237D, P238D, H268E, P271G, Y296D, A330Rを導入したIL6R-BP264(配列番号：28)を作製し、鋳型として用いた。IL6R-BP264のEUナンバリング234番目のLeuをAsn, Ser, Asp, Gln, Glu, Thr Arg, His, Gly, Lys, Tyrにそれぞれ置換した改変体を作製した。また、IL6R-BP264のEUナンバリング235番目のアミノ酸を元のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸に置換した改変体を作製した。もう一方の抗体H鎖として、IL6R-A5(配列番号：69)に対し、E233D, G237D, P238D, H268E, P271G, Y296D, A330Rを導入したIL6R-AP029(配列番号：42)を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号：21)を共通して用い、IL6R-BP264に対しL234N, L234S, L234D, L234Q, L234E, L234T, L234R, L234H, L234G, L234K, L234Yを導入した改変体と、L235W, L235M, L235P, L235F, L235A, L235V, L235Iを導入した改変体については両鎖に同じ改変を含むホモ体として、L235N, L235S, L235D, L235Q, L235E, L235T, L235R, L235H, L235G, L235K, L235Yを導入した改変体についてはIL6R-AP029と組み合わせたヘテロ二量化抗体として検討を行った。

参考例１の方法に従い、これらの改変体から抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcgR（FcgRIa、FcgRIIaH型、FcgRIIaR型、FcgRIIb、FcgRIIaV型)に対する結合を評価した。各改変体のFcgRIIbに対するKDを横軸に、FcgRIIaRに対するKDを縦軸に示したグラフを図16に示す。

[0239] 図16に示すように、IL6R-BP264/IL6R-Lに対して両鎖にL234Yを導入したIL6R-BP404/IL6R-Lは、改変導入前のIL6R-BP264/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへの

結合がわずかに増強した。

[0240] これらの改変体の中から、FcgRIIbへの結合が増強したIL6R-BP404/IL6R-Lおよび、FcgRIIbへの選択性が向上していた改変体について表１１にまとめた。表中の親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgRIIbに対するKD値を各改変体のFcgRIIbに対するＫＤ値で割った値を指す。また、親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcgR IIaRに対するKD値を各改変体のFcgR IIaRに対するＫＤ値で割った値を指す。KD(IIaR)/KD(IIb)とは、各改変体のFcgRIIaRに対するKDを各改変体のFcgRIIbに対するKDで割った値であり、この値が大きいほどFcgRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表１１中灰色で塗りつぶしたセルは、FcgRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0241] [表11]

改変体名	FcgRIaに対するKD(mol/L)	FcgRIIaRに対するKD(mol/L)	FcgRIIaHに対するKD(mol/L)	FcgRIIbに対するKD(mol/L)	FcgRIIIaVに対するKD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP264/IL6R-L	7.4E-09	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.6E-05	28.3	3.2	252.0
IL6R-BP404/IL6R-L	1.0E-08	3.6E-07	3.4E-06	1.1E-08	3.3E-05	32.1	3.1	276.8
IL6R-BP408/IL6R-L	1.4E-07	3.4E-05	7.7E-05	7.2E-07	5.0E-05	47.0	0.03	4.3
IL6R-BP419/IL6R-L	4.0E-08	8.3E-07	3.8E-05	2.6E-08	3.8E-05	32.0	1.3	118.8
IL6R-AP029/IL6R-BP407/IL6R-L	1.3E-08	6.3E-07	8.9E-06	1.9E-08	2.3E-05	33.5	1.7	164.0
IL6R-AP029/IL6R-BP408/IL6R-L	2.0E-08	8.6E-07	8.2E-06	2.6E-08	3.1E-05	33.6	1.3	121.1
IL6R-AP029/IL6R-BP409/IL6R-L	1.9E-08	6.3E-07	9.4E-06	1.5E-08	2.8E-05	40.8	1.8	201.3
IL6R-AP029/IL6R-BP410/IL6R-L	1.7E-08	6.6E-07	5.1E-06	2.2E-08	2.1E-05	29.7	1.7	139.0

[0242] 表１１に示した通り、IL6R-BP264/IL6R-Lに対して両鎖にL234Yを導入したIL6R-BP404/IL6R-Lは、改変導入前のIL6R-BP264/IL6R-Lと比較してFcgRIIbへ

の結合が1.1倍上昇した。IL6R-BP264/IL6R-Lの両鎖にL235Qを導入したIL6R-BP408/IL6R-L、両鎖にL235Fを導入したIL6R-BP419/IL6R-L、片鎖にL235Dを導入したIL6R-AP029/IL6R-BP407/IL6R-L、片鎖にL235Qを導入したIL6R-AP029/IL6R-BP408/IL6R-L、片鎖にL235Eを導入したIL6R-AP029/IL6R-BP409/IL6R-L、片鎖にL235Tを導入したIL6R-AP029/IL6R-BP410/IL6R-Lはいずれも KD(IIaR)/KD(IIb)の値が改変導入前のIL6R-BP264/IL6R-Lと比較して大きく、FcgRIIbへの選択性が向上した改変体であった。

[0243] 〔実施例１０〕FcgRIIb結合増強Fc改変体のin silico免疫原性予測ツールによる免疫原性の評価

本実施例に記載のFc改変体を抗体医薬品として用いる場合には、その薬理作用を減弱する抗医薬品抗体の産生を誘導しないことが好ましい。免疫原性の高い抗体は抗医薬品抗体の産生を誘導しやすいことから、抗体医薬品の免疫原性はできるだけ低いことが好ましい。改変体の免疫原性をできるだけ増大させないようにするために、Epibase、EpiMatrix等のT-cell epitopeを予測するin silico免疫原性予測ツールが利用できる。Epibase Light (Lonza) はFASTER algorism (Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar;7(3):405-18.)を用いて、9-merペプチドとmajor DRB1アレルを含むMHC classIIとの結合能を計算するin silico免疫原性予測ツールである。本ツールはMHC classIIに対する強い結合を有するT-cell epitope (Strong epitopes) および中程度の結合を有するT-cell epitope (Medium epitopes) を同定することができる。

計算にはDRB1アロタイプの存在比が反映され、これには以下の表１２に示すCaucasianにおける存在比が使用できる。

[表12]

DRB1*1501	24.5%
DRB1*0301	23.7%
DRB1*0701	23.3%
DRB1*0401	16.2%
DRB1*0101	15.0%
DRB1*1101	11.6%
DRB1*1301	10.9%
DRB1*1302	8.2%
DRB1*0404	5.9%
DRB1*1104	5.8%
DRB1*1601	5.0%
DRB1*1401/1454	4.9%
DRB1*0801	4.9%
DRB1*0102	3.8%
DRB1*1201/1206/1210	3.3%
DRB1*0407	2.7%
DRB1*0901	2.3%
DRB1*1303	2.0%
DRB1*1001	1.9%
DRB1*0405	1.5%
DRB1*0403	1.0%
DRB1*1102	0.7%
DRB1*0802	0.7%
DRB1*1502	0.5%
DRB1*0804	0.4%
DRB1*1404	0.4%
DRB1*0803	0.3%
DRB1*0406	0.2%
DRB1*1402	0.2%
DRB1*1602	0.2%
DRB1*1202	0.1%
DRB1*0304	0.1%以下
DRB1*1405	0.1%以下
DRB1*0410	0.1%以下
DRB1*1503	0.1%以下
DRB1*1106	0.1%以下
DRB1*1504	0.1%以下
DRB1*1304	0.1%以下
DRB1*1110	0.1%以下
DRB1*1406	0.1%以下
DRB1*0411	0.1%以下
DRB1*0302	0.1%以下
DRB1*1312	0.1%以下

このツールを用いることで、これまでに報告のある各種Fc改変体と本実施例に記載のFcgRIIb選択的に結合を増強したFc改変体の配列中（EUナンバリング118位からC末端までの配列）に含まれる強い結合と中程度の結合を有する

全てのT-cell epitope数を比較した。具体的には、過去にFcgRIIIaに対する結合を増強すると報告されている（Proc Natl Acad Sci U S A. 2006,103:4005-10.）S239D、A330L、I332Eの改変を導入した抗体のFc領域であるFc（DLE）（配列番号：78）、過去にFcRnに対する結合を増強すると報告されている（J Biol Chem. 2006, 281:23514-24.）M252Y、S254T、T256Eの改変を導入した抗体のFc領域であるFc（YTE）（配列番号：79）、FcgRIIbに対する結合を増強すると報告されている（Mol Immunol. 2008, 45:3926-33.）S267E、L328Fの改変を導入した抗体のFc領域であるFc（EF）（配列番号：80）、WO2012/115241に記載されているFcgRIIbに対する結合を増強すると報告されているE233D、G237D、P238D、H268D、P271G、A330Rの改変を導入した抗体のFc領域であるFc（P208）（配列番号：81）を、既存技術を評価するための比較対象として作製し、本実施例に記載されているFcgRIIbに対する結合を増強する改変体BP568と同様にE233D、P238D、S264I、S267A、H268E、P271Gの改変を導入した抗体のFc領域であるFc（P587）（配列番号：70）およびBP492と同様にP238D、S264I、S267A、H268E、P271Gの改変を導入した抗体のFc領域であるFc(P588)（配列番号：71）を作製し、Epibaseを用いてこれらのFc改変体の強い結合と中程度の結合の全てのエピトープ数を比較した。その結果を表１３に示す。

[表13]

	T-cell epitope 数
Fc (DLE)	2
Fc (YTE)	5
Fc (EF)	4
Fc (P208)	5
Fc (P587)	2
Fc (P588)	2

この結果から、本実施例に記載の改変体のFc領域であるFc(P587)およびFc(P588)は既存のFc改変体の中でも、T-cell epitope数が少なく、免疫原性リスクが低いことが示された。この性質は医薬品として用いる上で、抗医薬品抗体を誘導する可能性が低減されており、優れていることを示している。

[0244] 〔実施例１１〕ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスを用いたヒトFcgRIIb結合増強Fc改変体の血中動態の評価

（１１－１）試験の概要

WO2013/047752で示されているように、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する抗原結合ドメインを有し、かつEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcgRに対する結合ドメインよりもFcgRにする結合活性が高いFcgR結合ドメインを含む抗原結合分子を投与することで、天然型ヒトIgGと比較して、生体中におけるその標的となる可溶性抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能である。FcgRの中でも、特にFcgRIIbに対する結合活性を増強させた抗原結合分子が生体内に投与された場合、血漿中の可溶性抗原の消失を早め、血漿中の可溶性抗原の濃度を効果的に低下させることが可能であることも報告されている。本実施例では、ヒトFcgRIIbを遺伝子改変により導入したトランスジェニックマウスに、ヒトFcgRIIbに対して結合を増強したFc改変体を投与することで、本明細書に記載した実際にヒトFcgRIIbに対する結合を増強したFc改変体で、その標的となる可溶性抗原の消失速度を速めることができるのかを検証した。

（１１－２）FcgRIIbに対して結合を増強した抗体の調製

ヒトFcgRIIbに対して結合を増強したFc改変体としては以下の抗体を用いた。WO2009/125825に開示されているヒトインターロイキン６レセプター（ヒトIL-6R）に対する抗体の可変領域と、ヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dの定常領域からなるIL6R-G1d（配列番号：19)に、BP568と同様にE233D、P238D、S264I、S267A、H268E、P271Gの改変を導入したIL6R-P587を作製した。抗体H鎖としてIL-6R-P587を、抗体L鎖としてはWO2009/125825に開示されているヒトIL-6Rに対する抗体のL鎖であるIL6R-L2（配列番号：74）を有するFv4-P587を参考例1の方法に従って調製した。また、比較対象として、IL6R-G1d（配列番号：19）とIL6R-L2（配列番号：74）とをそれぞれ抗体H鎖、L鎖と

して有するFv4-IgG1を同様に参考例1の方法に従って調製した。ここで調製したFv4-G1dおよびFv4-P587はWO2009/125825に記載の通り、酸性pH条件下では中性pH条件下と比較して抗原であるヒトIL-6Rに対して弱く結合するという、プロトンイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する抗原結合ドメインを有している。

（１１－３）ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスの作出

ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスを以下の方法により作製した。

C57BL/6(B6)マウスに、ヒトFcgRIIb遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出した。トランスジェニックマウスの作出は「Nagyら（Manipulating the mouse embryo, CSHL press.（2003）399-506）」および「上田ら（ジーンターゲティングの最新技術，羊土社.（2000）190-207）」に記載される手順に則り実施された。すなわち、B6マウスの受精卵前核に、ヒトFcgRIIb遺伝子（GeneBank # NW_004077999：18,307,411-18,381,603）のゲノム領域がクローニングされている大腸菌人工染色体（Bacterial artificial chromosome）を、マイクロインジェクションする事により作出した。得られたマウスのうち、ヒトFcgRIIb遺伝子が導入されたマウスを、ヒトFcgRIIb遺伝子に特異的にハイブリダイズするプローブを用いたサザンブロット法およびPCRにより選抜した。ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスから血液および肝臓を採取し、ヒトFcgRIIb遺伝子を特異的に増幅させるプライマーを用い、ヒトFcgRIIb遺伝子の発現をRT-PCR（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）にて確認した。その結果、ヒトFcgRIIb遺伝子の発現が検出された。また、ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスの血液よりマウスPBMC（Peripheral Blood Mononuclear Cell）を単離し、PBMC中のヒトFcgRIIbの発現をFACS（Fluorescence Activated Cell Sorting）解析により確認した。その結果、ヒトFcgRIIbの発現が検出された。以上のことから、ヒトFcgRIIbを発現するヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスが樹立できたことを確認した。

（１１－４）ヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスを用いた抗原と抗体を同時投与したin vivo試験

（１１－３）で作出したヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスを用いて、抗原である可溶型ヒトIL-6Rと（１１－２）で調製された抗ヒトIL-6R抗体とを同時に投与し、その投与後の血漿中可溶型ヒトIL-6R濃度および抗ヒトIL-6R抗体濃度が評価された。

可溶型ヒトIL-6Rおよび抗ヒトIL-6R抗体の混合溶液（それぞれ5μg/mL、0.1 mg/mL）を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。このとき、可溶型ヒトIL-6Rに対して抗ヒトIL-6R抗体は十分量過剰に存在することから、可溶型ヒトIL-6Rはほぼ全て抗体に結合していると考えられる。投与5分後、1時間後、4時間後、7時間後、1日後、3日後、7日後、14日後、21日後、28日後に血液を採取した。採取した血液は直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存した。抗ヒトIL-6R抗体としては、上述のFv4-P587、Fv4-IgG1を使用した。

（１１－５）血漿中抗ヒトIL-6R抗体濃度のELISA法による測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6R抗体濃度はELISA法にて測定した。まず抗ヒトIgG(γ鎖特異的)F(ab')2抗体断片(Sigma) をNunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)に分注し、4℃で一晩静置し抗ヒトIgG固相化プレートを調製した。血漿中濃度として0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125μg/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、これら検量線試料および血漿測定試料100μLに20 ng/mLの可溶型ヒトIL-6Rを200μL加え、室温で1時間攪拌した。その後抗ヒトIgG固相化プレートに分注しさらに室温で1時間攪拌した。その後ビオチン化抗ヒトIL-6 R抗体 (R&D) を室温で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies)を室温で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)を基質として用い発色反応を行い、1N硫酸 (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスにおける血漿中抗

体濃度推移を図３３に示した。

（１１－５）電気化学発光法による血漿中ヒトIL-6R濃度測定

マウスの血漿中ヒトIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定した。血漿中濃度として12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 ng/mLに調整したヒトIL-6R検量線試料および50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトシリズマブ溶液を混合し37℃で1晩反応させた。その後、0.5%BSA(w/v)を含有したPBS-Tween溶液を用いて5℃で1晩BlockingしたStreptavidin Gold Multi-ARRAY Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに室温で2時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(×2) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hSIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のヒトFcgRIIbトランスジェニックマウスにおける血漿中可溶型ヒトIL-6R濃度推移を図３４に示した。

（１１－６）ヒトFcgRIIb結合増強の効果

Fv4-IgG1とヒトFcgRIIbに対する結合を増強したFv4-P587のin vivo試験の結果を比較した。図３３に示したとおり、両者の抗体血漿中滞留性はほぼ同等であったが、図３４に示すとおり、ヒトFcgRIIbに対する結合を増強したFv4-P587と同時に投与したヒトIL-6Rのほうが、Fv4-IgG1と同時に投与したヒトIL-6Rと比較して、ヒトIL-6Rの消失が速くなっていることが確認された。すなわち、pH依存的にヒトIL-6Rに結合する抗体がヒトFcgRIIb結合能を増強することによって、可溶型ヒトIL-6R濃度を低減できることが見出された。

特定の理論に拘束されるものではないが、この結果から図３５に示したメカニズムに従い、ヒトFcγRIIbを介してFcγRIIbを発現する細胞に取り込まれることによって、当該抗体に結合する血漿中の可溶型抗原が消失していると考察することも可能である。

可溶型ヒトIL-6Rに結合する抗体に結合した可溶型ヒトIL-6Rは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶型ヒトIL-6Rに結合する抗体であるFv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶型ヒトIL-6Rを解離する。解離した可溶型ヒトIL-6Rはライソソームによって分解されるため、可溶型ヒトIL-6Rの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶型ヒトIL-6Rに結合する抗体であるFv4-IgG1はエンドソーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイクルされる。リサイクルされた当該抗体は再び可溶型ヒトIL-6Rに結合することができるため、抗原（可溶型ヒトIL-6R）に対する結合とFcRnによる血漿中でのリサイクルが繰り返される。その結果、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶型ヒトIL-6Rに結合することが可能となると考えられる。更にpH依存的に抗原に結合するFv4-IgG1のFcgRIIb結合活性を増強することにより、可溶型ヒトIL-6Rに結合する抗体と可溶型ヒトIL-6Rの複合体とがFcgRIIbを介して素早く細胞内に取り込まれることにより、可溶型ヒトIL-6R濃度をより効率的に低減することが可能であると考えられる（図３５）

[0245] 〔実施例１２〕ヒトFcgRIIbおよびヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたヒトFcgRIIb結合増強Fc改変体の血中動態の評価

（１２－１）試験の概要

WO2013/047752で示されているように、FcγRに対する結合活性が天然型IgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子を用いることで、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強されていない抗原結合分子と比較して、血漿中滞留性の向上が確認された。一方で、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子のほうが、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強されていない抗原結合分子と比較して、血漿中の標的抗原濃度が低下していたことも報告されている。そこで、本実施例に記載のヒトFcgRIIbに対する結

合を増強させたFc領域改変体を有する抗原結合分子が同様の性質を有するかを検証した。

（１２－２）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

実施例１１－２に記載されているFv4-IgG1、Fv4-P587に加えて、抗体H鎖としてFv4-P587のH鎖であるIL6R-P587に対して過去に抗体の血中動態を改善すると報告されている（Nat. Biotechnol. 2010. 28; 157-159）EUナンバリングで表される428位のMetのLeuへの置換と、434位のAsnのSerへの置換からなる改変を導入したIL6R- P587-LS（配列番号：73）と抗体L鎖としてIL6R-L2を有するFv4-P587-LSを参考例１の方法に従い調製した。

（１２－３）ヒトFcRnに対する相互作用解析

調製した抗体のヒトFcRnに対する相互作用解析をBiacore T200を用いて以下に記載のセンサーチップCM4（GE Healthcare）上にアミンカップリング法でプロテインL（BioVision）を適当量固定化し、そこへ目的の抗体を捕捉させた。次に、FcRn希釈液とランニングバッファー（参照対照溶液として）とをインジェクトし、センサーチップ上に捕捉させた抗体にヒトFcRnを相互作用させた。ランニングバッファーには50 mmol/Lリン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH6.0を用い、FcRnの希釈にもランニングバッファーを使用した。チップの再生には10 mmol/Lグリシン-HCl, pH1.5を用いた。測定は全て25℃で実施した。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数 ka（1/Ms）、および解離速度定数 kd（1/s）を算出し、その値をもとに各抗体のヒトFcRnに対する KD（M）を算出した。各パラメーターの算出にはBiacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare)を用いた。この方法で測定したときの、今回調製した抗体のヒトFcRnに対するKD値を表１４に示した。表１４に示されているように、Fv4-P587-LSはFv4-P587と比較してFcRnに対する結合が酸性条件下で増強していることが確認された。

[表14]

	pH6.0における ヒトFcRnに対するKD（μmol/L）
IgG1	1.4
P587	1.5
P587-LS	0.12

（１２－４）ヒトFcgRIIbおよびヒトFcRnトランスジェニックマウスの作出

ヒトFcgRIIb、ヒトFcRnトランスジェニックマウス、およびマウスFcRnノックアウトマウスを、以下の方法により作製した。

まず、マウスFcRnノックアウトマウスを作出した。ノックアウトマウスの作出は「Nagyら（Manipulating the mouse embryo, CSHL press. (2003) 399-506）」に記載される手順に則り実施された。すなわち、マウスFcRn遺伝子を破壊するためのターゲティングベクターを作製し、そのベクターをES細胞（C57BL/6マウス由来）に導入し、相同組み換えによりマウスFcRnの遺伝子を破壊した。樹立したマウスFcRnノックアウトマウスの肝臓からRNAを抽出し、RNAから合成したcDNAを鋳型に、マウスFcRnを特異的に増幅するプライマーを用いてRT-PCRを実施した。その結果、マウスFcRnノックアウトマウスでは、マウスFcRn遺伝子が検出されなかった。次いで、マウスFcRnノックアウトマウスに、ヒトFcgRIIbとヒトFcRn遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出した。トランスジェニックマウスの作出は「Nagyら（Manipulating the mouse embryo, CSHL press. (2003) 399-506）」および「上田ら（ジーンターゲティングの最新技術，羊土社. (2000) 190-207）」に記載される手順に則り実施された。すなわち、マウスFcRnノックアウトマウスの受精卵前核に、ヒトFcRn遺伝子（GeneBank #NC_000019.9：50,000,108-50,039,865）およびヒトFcgRIIb遺伝子（GeneBank # NW_004077999：18,307,411-18,381,603）のゲノム領域がクローニングされている大腸菌人工染色体（Bacterial artificial chromosome）を、マイクロインジェクションする事により作出した。得られたマウスのうち、ヒトFcRn遺伝子およびヒトFcgRIIb遺伝子が導入され、かつマウスFcRnノックアウトアレルがホモ接合体化されたマウスを、各

遺伝子に特異的にハイブリダイズするプローブを用いたサザンブロット法およびPCRにより選抜した。ヒトFcgRIIb、ヒトFcRnトランスジェニックマウス、およびマウスFcRnノックアウトマウスから血液を採取し、ヒトFcRn遺伝子およびヒトFcgRIIb遺伝子を特異的に増幅させるプライマーを用い、ヒトFcRn遺伝子およびヒトFcgRIIb遺伝子の発現をRT-PCRにて確認した。その結果、ヒトFcRn遺伝子およびヒトFcgRIIb遺伝子の発現が検出された。以上のことから、ヒトFcRnおよびヒトFcgRIIbを発現し、マウスFcRnの発現がない、ヒトFcgRIIb、ヒトFcRnトランスジェニックマウス、およびマウスFcRnノックアウトマウスが、樹立できたことを確認した。

（１２－５）pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

ヒトFcgRIIbおよびヒトFcRnトランスジェニックマウスにそれぞれFv4-IgG1、Fv4-P587およびFv4-P587-LSを投与したin vivo試験が実施例１１の方法と同様に実施され、当該マウス群の血漿中可溶型IL-6Rおよび血漿中抗ヒトIL-6R抗体濃度が測定された。血漿中抗ヒトIL-6R抗体濃度および血漿中可溶型IL-6Rの測定結果をそれぞれ図36、図37に示した。

Fv4-P587のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性を増強したFv4-P587-LSが投与されたマウス群において、Fv4-P587が投与されたマウス群に比べて、抗体の血漿中滞留性の向上が確認された。加えて、Fv4-P587-LSはFv4-IgG1よりも血漿中滞留性が向上していた。一方で、Fv4-P587-LSが投与されたマウス群の血漿中可溶型IL-6R濃度はFv4-P587が投与されたマウス群のそれと同等であった。Fv4-P587-LSまたはFv4-P587が投与されたマウス群は、Fv4-IgG1が投与されたマウス群に比べて、血漿中可溶型IL-6R濃度が低下していた。

以上のことから、ヒトFcγRIIbに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強している抗体の投与により、当該投与を受けた生体における投与した抗原結合分子の血漿中滞留性の向上が可能であることが示された。さらに、抗原結合分子が投与された生体の血漿中滞留性が向上しても、当該生体

における抗原消失効果は減弱することはなく、むしろ抗原消失効果を持続させることが可能であることが示された。

pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるための改変としては、特に限定されず、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法（Nat. Biotechnol. (2010) 28, 157-159）、434位のAsnをAlaに置換する方法（Drug Metab. Dispos. (2010) 38 (4) 600-605）、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法（J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524）、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法（J. Immunol. (2006) 176 (1), 346-356）、434位のAsnをHisに置換する方法(Clin. Pharmcol. Ther. (2011) 89 (2) 283-290)、ならびにWO2010/106180、WO2010/045193、WO2009/058492、 WO2008/022152、WO2006/050166、WO2006/053301、WO2006/031370、WO2005/123780、WO2005/047327、WO2005/037867、WO2004/035752、WO2002/060919などにおいて記載されるような改変も用いられる。

[0246] 〔参考例１〕抗体の発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

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

により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した（Protein Science 1995；4：2411-2423）。

[0247] 〔参考例２〕FcγRの調製方法および改変抗体とFcγRとの相互作用解析方法

FcγRの細胞外ドメインを以下の方法で調製した。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子の合成を当業者公知の方法で実施した。その際、各FcγRの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製した。具体的には、FcγRIについてはNCBIのアクセッション番号NM_000566.3の配列、FcγRIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM_001136219.1の配列、FcγRIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM_004001.3の配列、FcγRIIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM_001127593.1の配列、FcγRIIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM_000570.3の配列に基づいて作製し、C末端にHisタグを付加した。またFcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIbについては多型が知られているが、多型部位についてはFcγRIIaについてはJ. Exp. Med., 1990, 172: 19-25、FcγRIIIaについてはJ. Clin. Invest., 1997, 100 (5): 1059-1070, FcγRIIIbについてはJ. Clin. Invest., 1989, 84, 1688-1691を参考にして作製した。

[0248] 得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入し、目的タンパク質を発現させた。なお、結晶構造解析用に用いたFcγRIIbについては、終濃度10 μg/mLのKifunesine存在下で目的タンパク質を発現させ、FcγRIIbに付加される糖鎖が高マンノース型になるようにした。培養し、得られた培養上清を回収した後、0.22μmフィルターを通して培養上清を得た。得られた培養上清は原則として次の4ステップで精製した。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（SP Sepharose FF）、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過、を実施した。ただし、FcγRIについては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを実施した。精製したタンパク質については分光光度計を

用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度を算出した（Protein Science 1995；4：2411-2423）。

[0249] Biacore T100（GEヘルスケア）、Biacore T200（GEヘルスケア）、Biacore A100、Biacore 4000を用いて、各改変抗体と上記で調製したFcγレセプターとの相互作用解析を行った。ランニングバッファーにはHBS-EP+（GEヘルスケア）を用い、測定温度は25℃とした。Series S Sensor Chip CM5（GEヘルスケア）またはSeries S sensor Chip CM4（GEヘルスケア）に、アミンカップリング法により抗原ペプチド、ProteinA（Thermo Scientific）、Protein A/G（Thermo Scientific）、Protein L（ACTIGENまたはBioVision）を固定化したチップ、あるいはSeries S Sensor Chip SA (certified)（GEヘルスケア）に対して予めビオチン化しておいた抗原ペプチドを相互作用させ、固定化したチップを用いた。

[0250] これらのセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、抗体に対する結合量を測定し、抗体間で比較した。ただし、Fcγレセプターの結合量はキャプチャーした抗体の量に依存するため、各抗体のキャプチャー量でFcγレセプターの結合量を除した補正値で比較した。また、10 mM glycine-HCl、pH1.5を反応させることで、センサーチップにキャプチャーした抗体を洗浄し、センサーチップを再生して繰り返し用いた。

[0251] また、各改変抗体のFcγRに対するKD値を算出するため速度論的な解析は以下の方法にしたがって実施した。まず、上記のセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareにより測定結果を1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka（L/mol/s）、解離速度定数kd(1/s)を算出し、その値から解離定数KD（mol/L）を算出した。

[0252] また、各改変抗体とFcγRとの相互作用が微弱で、上記の速度論的な解析で

は正しく解析できないと判断された場合、その相互作用についてはBiacore T100 Software Handbook BR1006-48 Edition AEに記載の以下の1:1結合モデル式を利用してKDを算出した。

1:1 binding modelで相互作用する分子のBiacore上での挙動は以下の式１によって表わすことができる。

〔式１〕

$$R_{eq} = C \bullet R_{max} / (KD+C) + RI$$

R_{eq}:a plot of steady state binding levels against analyte concentration

C: concentration

RI:bulk refractive index contribution in the sample

R_{max}:analyte binding capacity of the surface

この式を変形すると、KDは以下の式２のように表わすことができる。

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

この式にR_{max}、RI、Cの値を代入することで、KDを算出することが可能である。RI、Cについては測定結果のセンサーグラム、測定条件から値を求めることができる。R_{max}の算出については、以下の方法にしたがった。その測定回に同時に評価した比較対象となる相互作用が十分強い抗体について、上記の1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られたR_{max}の値を、比較対象となる抗体のセンサーチップへのキャプチャー量で除し、評価したい改変抗体のキャプチャー量で乗じて得られた値をR_{max}とした。

[0253] 〔参考例3〕Fc改変体のFcγRに対する結合の網羅的解析

IgG1と比較して、活性型FcγR、特にFcγRIIaのH型およびR型のいずれの遺伝子多型に対してもFcを介した結合が減少し、かつFcγRIIbに対する結合が増強した抗体を作製するために、IgG1抗体に変異を導入し、各FcγRに対する結合の網羅的解析を実施した。

[0254] 抗体H鎖には、WO2009/041062に開示されている血漿中動態が改善した抗グリピカン３抗体であるGpH7のCDRを含むグリピカン３抗体の可変領域（配列番号：15）を使用した。同様に、抗体L鎖には WO2009/041062に開示される血漿中動態が改善したグリピカン３抗体のGpL16-k0（配列番号：16）を共通に使用した。また、抗体H鎖定常領域として、IgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dに、K439Eの変異を導入したB3を利用した。このH鎖をGpH7-B3（配列番号：17）、L鎖をGpL16-k0（配列番号：16）と呼ぶ。

[0255] GpH7-B3に対して、FcγRの結合に関与すると考えられるアミノ酸とその周辺のアミノ酸（EUナンバリングで234番目から239番目、265番目から271番目、295番目、296番目、298番目、300番目、324番目から337番目）を元のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換した。これらのFc変異体をB3 variantと呼ぶ。B3 variantを参考例１の方法により発現、精製し、参考例２の方法により各FcγR（FcγRIa、FcγRIIa H型、FcγRIIa R型、FcγRIIb、FcγRIIIa）に対する結合を網羅的に評価した。

それぞれのFcγRとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作製した。各B3 variantに由来する抗体のFcγRに対する結合量の値を、B3に変異を導入していない比較対象となる抗体（EUナンバリングで234番目から239番目、265番目から271番目、295番目、296番目、298番目、300番目、324番目から337番目がヒト天然型IgG1の配列を有する抗体）のFcγRに対する結合量の値で割った。その値を更に100倍した値を、各変異体のFcγRに対する相対的な結合活性の指標とした。横軸に各変異体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各変異体の活性型FcγRであるFcγRIa、FcγRIIa H型、FcγRIIa R型、FcγRIIIaに対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図１、２、３、４）。

その結果、図１～４にラベルで表示したように、全改変のうち、mutation A（EUナンバリングで238番目のProをAspに置換する改変）という変異およびmutation B（EUナンバリングで328番目のLeuをGluに置換する改変）という変異のみが導入すると、導入前に比べて、FcγRIIbに対する結合を顕著に増強

し、FcγRIIaの両タイプに対する結合を顕著に抑制する効果があることを見出した。

[0256] 〔参考例4〕FcγRIIb選択的結合改変体のSPR解析

実施例１で見出したEUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変について各FcγRに対する結合をより詳細に解析した。

[0257] 抗体H鎖可変領域としてWO2009/125825に開示されているヒトインターロイキン6レセプターに対する抗体の可変領域であるIL6R-Hの可変領域（配列番号：18）を、抗体H鎖定常領域としてヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dを有するIL6R-G1d（配列番号：19）をIgG1のH鎖として用いた。IL6R-G1dのEUナンバリング238番目のProをAspに置換したIL6R-G1d-v1（配列番号：20）を作製した。次に、IL6R-G1dのEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換したIL6R-G1d-v2を作製した。また、比較のため非特許文献２８に記載されているIL6R-G1dのEUナンバリング267番目のSerをGluに置換し、EUナンバリング328番目のLeuをPheに置換したIL6R-G1d-v3を作製した。抗体L鎖としてはtocilizumabのL鎖であるIL6R-L（配列番号：21）を共通に用い、それぞれのH鎖と共に参考例１の方法に従い、抗体を発現、精製させた。ここで得られた抗体H鎖としてIL6R-G1d、IL6R-G1d-v1、IL6R-G1d-v2、IL6R-G1d-v3に由来するアミノ酸配列を有する抗体をそれぞれIgG1、IgG1-v1、IgG1-v2、IgG1-v3と呼ぶ。

[0258] 次に、これらの抗体とFcγRとの相互作用の速度論的な解析をBiacore T100（GE Healthcare）を用いて実施した。ランニングバッファーにはHBS-EP+（GE Healthcare）を用い、測定温度は25℃とした。Series S Sensor Chip CM5（GE Healthcare）に対してアミンカップリング法によりProtein Aを固定化したチップを用いた。このチップへ目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈した各FcγRを相互作用させ、抗体に対する結合を測定した。測定後は10 mM glycine-HCl、pH1.5を反応させることで、チップにキャプチャーした抗体を洗浄し、チップを再生して繰り返し用いた。Biacore Evaluation Softwareにより測定結果として得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelで解析することで結合速度定数ka（L/mol/s）、解離速度

定数kd(1/s)を算出し、その値から解離定数KD（mol/L）を算出した。

[0259] 今回、IgG1-v1とIgG1-v2のFcγRIIa H型とFcγRIIIaに対する結合は微弱なため、上記の解析法ではKD等の速度論的パラメターを算出できなかった。これらの相互作用については、Biacore T100 Software Handbook BR1006-48 Edition AEに記載の以下の1:1結合モデル式を利用してKDを算出した。

1:1結合モデルで相互作用する分子のBiacore上での挙動は以下の式１によって表わすことができる。

[0260] 〔式１〕

$$R_{eq} = C \bullet R_{max} / (KD+C) + RI$$

R_{eq}:a plot of steady state binding levels against analyte concentration

C: concentration

RI:bulk refractive index contribution in the sample

R_{max}:analyte binding capacity of the surface

この式を変形すると、KDは以下の式２のように表わすことができる。

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

[0261] この式にR_{max}、RI、Cの値を代入することで、KDを算出することが可能である。今回の測定条件からはRI=0、C=2 μmol/Lとすることができる。また、R_{max}には各FcγRに対するIgG1の相互作用解析結果として得られたセンサーグラムに対して1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られたR_{max}の値をIgG1のキャプチャー量で除し、IgG1-v1、IgG1-v2のキャプチャー量で乗じて得られた値とした。これはIgG1に変異を導入したいずれの改変体においても、IgG1と比較して各FcγRが結合できる限界量には変化がなく、測定時のR_{max}はその測定時にチップ上に結合している抗体の量に比例するという仮定に基づいた計算である。R_{eq}は測定時に観察された各FcγRのセンサーチップ上の各改変体に対する結合量とした。

[0262] 今回の測定条件では、FcγRIIa H型に対するIgG1-v1、IgG1-v2の結合量（R_{eq}）はそれぞれ約2.5、10 RU、FcγRIIIaに対するIgG1-v1、IgG1-v2の結合量（R_{eq}）はそれぞれ約2.5、5 RUであった。FcγRIIa H型に対する相互作用解析時のIgG1、IgG1-v1、IgG1-v2のキャプチャー量は452、469.2、444.2 RUであり、FcγRIIIaに対する相互作用解析時のIgG1、IgG1-v1、IgG1-v2のキャプチャー量は454.5、470.8、447.1 RUであった。また、FcγRIIa H型、FcγRIIIaに対するIgG1の相互作用解析結果として得られたセンサーグラムに対して1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られたR_{max}はそれぞれ69.8、63.8 RUであった。これらの値を使うと、FcγRIIa H型に対するIgG1-v1、IgG1-v2のR_{max}はそれぞれ72.5、68.6 RU、FcγRIIIaに対するIgG1-v1、IgG1-v2のR_{max}はそれぞれ66.0、62.7 RUと算出された。これらの値を

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式に代入して、IgG1-v1、IgG1-v2のFcγRIIa H型およびFcγRIIIaに対するKDを算出した。

[0263] IgG1、IgG1-v1、IgG1-v2、IgG1-v3の各FcγRに対するKD値を表１（各抗体の各FcγRに対するKD値）に、またIgG1の各FcγRに対するKD値をIgG1-v1、IgG1-v2、IgG1-v3の各FcγRに対するKD値で割ったIgG1-v1、IgG1-v2、IgG1-v3の相対的なKD値を表２（各抗体の各FcγRに対する相対的なKD値）に示した。

[0264] [表15]

	IgG1	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
FcγRIa	3.4E-10	7.3E-09	4.6E-10	1.9E-10
FcγRIIa R	1.2E-06	1.2E-05	2.9E-06	2.3E-09
FcγRIIa H	7.7E-07	5.6E-05*	1.2E-05*	1.5E-06
FcγRIIb	5.3E-06	1.1E-06	2.3E-06	1.3E-08
FcγRIIIa	3.1E-06	5.1E-05*	2.3E-05*	8.8E-06

(mol/L)

[0265] 上記表１５中、*はFcγRのIgGに対する結合が十分に観察されなかったため、

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出したKDを意味する。

[0266] [表16]

	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
FcγRIa	0.047	0.74	1.8
FcγRIIa R	0.10	0.41	522
FcγRIIa H	0.014	0.064	0.51
FcγRIIb	4.8	2.3	408
FcγRIIIa	0.061	0.14	0.35

(IgG1の各FcγRに対するKD値を各抗体のIgG1の各FcγRに対するKD値で割った値)

[0267] 表１６から、IgG1と比べてIgG1-v1はFcγRIaに対して結合活性が0.047倍に低下し、FcγR IIaのR型に対しては0.10倍に低下し、FcγRIIa H型に対して結合活性が0.014倍に低下し、FcγRIIIaに対しては結合活性が0.061倍に低下していた。一方で、FcγRIIbに対しては結合活性が4.8倍向上していた。

[0268] また、表１６からIgG1と比べてIgG1-v2はFcγRIaに対して結合活性が0.74倍に低下し、FcγR IIaのR型に対しては0.41倍に低下し、FcγRIIa H型に対して結合活性が0.064倍に低下し、FcγRIIIaに対する結合活性は0.14倍に低下していた。一方で、FcγRIIbに対しては結合活性が2.3倍向上していた。

[0269] すなわち、この結果から、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変を有するIgG1-v1およびEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変を含むIgG1-v2は、FcγRIIaの両遺伝子多型を含む活性型の全FcγRに対する結合を減弱させる一方で、抑制型FcγRであるFcγRIIbに対する結合を上昇させる性質があることが明らかとなった。

[0270] 次に、FcγRIIbに対する結合活性とFcγRIIa R型又はH型に対する結合活性

の比率を指標にして、得られた改変体のFcγRIIbに対する選択性を評価した。具体的には、FcγRIIa R型又はH型に対するKD値をFcγRIIbに対するKD値で割った値であるI/A (R)又はI/A (H)を各FcγRIIaに対するFcγRIIbの選択性の指標として用いた。この指標はFcγRIIbに対するKD値が小さくなるほど、あるいはFcγRIIaに対するKD値が大きくなるほど大きな値を示す。すなわち、より大きな値を示す改変体の方がFcγRIIaと比較したFcγRIIbに対する相対的な結合活性が向上していることを示す。各改変体について、この指標を表１７にまとめた。

[0271] [表17]

	IgG1	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
I/A (R)	0.23	11	1.3	0.18
I/A (H)	0.15	51	5.2	115

[0272] 表１７の結果から、IgG1と比較して既存技術を適用したIgG1-v3はI/A (H)についてはIgG1よりも大きな値を示し、FcγRIIbに対してより選択的であるが、I/A (R)についてはIgG1よりも小さな値を示し、FcγRIIbに対する選択性は改善していた。一方で、本実施例で見出したIgG1-v1とIgG1-v2はI/A (R)およびI/A (H)のいずれもIgG1より大きな値を示しており、FcγRIIbに対する選択性がFcγRIIaのいずれの遺伝子多型に対しても改善していた。

このような性質を持つ改変はこれまでに報告が無く、実際に図１８、１９、２０、２１に示すように極めて希有である。EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変やEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変は免疫炎症性疾患等の治療薬の開発に極めて有用である。

[0273] また、表２から非特許文献２８に記載されているIgG1-v3は確かにFcγRIIbに対する結合を408倍増強し、FcγRIIa H型に対する結合は0.51倍に減少しているが、その一方でFcγRIIa R型に対する結合を522倍増強している。この結果から、IgG1-v1およびIgG1-v2はFcγRIIa R型およびH型の両方に対する結合を抑制し、かつFcγRIIbに対する結合を増強することから、IgG1-v3と比べてFcγRIIbに対してより選択的に結合する改変体であると考えられる。すなわ

ち、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変やEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変は免疫炎症性疾患等の治療薬の開発に極めて有用である。

[0274] 〔参考例5〕FcγRIIb選択的結合改変と他のFc領域のアミノ酸置換の組み合わせによる効果

参考例３および参考例４で見出したFcγRIIbに対する選択性が向上されたEUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変体を元にしてFcγRIIbに対する選択性を更に増強することを試みた。

まず、IL6R-G1dにEUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変を導入したIL6R-G1d_v1（配列番号：20）に対して、参考例４に記載したFcγRIIbに対する選択性を増強するEUナンバリング328番目のLeuのGluへの置換を導入した改変体IL6R-G1d-v4を作製し、IL6R-L （配列番号：21）と合わせて、参考例１の方法にしたがって調製した。ここで得られた抗体H鎖としてIL6R-G1d-v4に由来するアミノ酸配列を有する抗体をIgG1-v4とする。IgG1、IgG1-v1、IgG1-v2、IgG1-v4のFcγRIIbに対する結合活性を参考例２の方法にしたがって評価し、その結果を表１８に示した。

[0275] [表18]

改変体	改変	FcγRIIb に対する KD (mol/L)	相対的な FcγRIIb に対する KD (IgG1 の KD/各改変体の KD)
IgG1	-	5.30E-06	1
IgG1-v1	EU ナンバリング 238 番目の Pro の Asp への置換	1.10E-06	4.8
IgG1-v2	EU ナンバリング 328 番目の Leu の Glu への置換	2.30E-06	2.3
IgG1-v4	EU ナンバリング 238 番目の Pro の Asp への置換 EU ナンバリング 328 番目の Leu の Glu への置換	1.10E-05	0.47

[0276] 表１８の結果から、L328EはFcγRIIbに対する結合活性をIgG1と比べて2.3倍向上することから、同じくFcγRIIbに対する結合活性をIgG1と比べて4.8倍向上するP238Dと組み合わせると、FcγRIIbに対する結合活性の向上の程度が

更に増すことが期待されたが、実際にはそれらの改変を組み合わせた改変体のFcγRIIbに対する結合活性はIgG1と比べて0.47倍に低下してしまうことが明らかとなった。この結果はそれぞれの改変の効果からは予測できない効果である。

[0277] 同様にして、IL6R-G1dにEUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変を導入したIL6R-G1d-v1（配列番号：20）に対して、参考例４に記載したFcγRIIbに対する結合活性を向上するEUナンバリング267番目のSerのGluへの置換およびEUナンバリング328番目のLeuのPheへの置換を導入した改変体IL6R-G1d-v5を参考例１の方法にしたがって調製した。ここで得られた抗体H鎖としてIL6R-G1d-v5に由来するアミノ酸配列を有する抗体をIgG1-v5とする。IgG1、IgG1-v1、IgG1-v3、IgG1-v5のFcγRIIbに対する結合活性を参考例２の方法にしたがって評価し、その結果を表１９に示した。

P238D改変体に対して、参考例４でFcγRIIbに対する増強効果のあったS267E/L328Fを導入して、改変導入前後でのFcγRIIbに対する結合活性を評価し、その結果を表１９に示した。

[0278] [表19]

改変体	改変	FcγRIIb に対する KD (mol/L)	相対的な FcγRIIb に対する KD (IgG1 の KD/各改変体の KD)
IgG1	-	5.30E-06	1
IgG1-v1	EU ナンバリング 238 番目の Pro の Asp への置換	1.10E-06	4.8
IgG1-v3	EU ナンバリング 267 番目の Ser の Glu への置換 EU ナンバリング 328 番目の Leu の Phe への置換	1.30E-08	408
IgG1-v5	EU ナンバリング 238 番目の Pro の Asp への置換 EU ナンバリング 267 番目の Ser の Glu への置換 EU ナンバリング 328 番目の Leu の Phe への置換	4.50E-07	12

[0279] 表１９の結果から、S267E/L328FはFcγRIIbに対する結合活性をIgG1と比べて408倍向上することから、同じくFcγRIIbに対する結合活性をIgG1と比べて

4.8倍向上するP238Dと組み合わせると、FcγRIIbに対する結合活性の向上の程度が更に増すことが期待されたが、実際には先の例と同様に、それらの改変を組み合わせた改変体のFcγRIIbに対する結合活性はIgG1と比べて12倍程度しか向上していないことが明らかとなった。この結果もそれぞれの改変の効果からは予測できない効果である。

[0280] これらの結果から、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換はそれ単独ではFcγRIIbに対する結合活性を向上させるものの、その他のFcγRIIbに対する結合活性向上改変と組み合わせた場合には、その効果を発揮しないことが明らかとなった。この一つの要因としてFcとFcγRとの相互作用界面の構造がEUナンバリング238番目のProのAspへの置換を導入することによって変化してしまい、天然型抗体において観察された改変の効果を反映しなくなってしまったことが考えられる。このことから、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換を含むFcを鋳型にして、更にFcγRIIbに対する選択性に優れたFcを創出することは、天然型抗体で得られた改変の効果の情報を活用することができず、極めて困難であると考えられた。

[0281] 〔参考例６〕P238D 改変に加えてhinge部分の改変を導入した改変体のFcγRIIbに対する結合の網羅的解析

参考例５で示したように、ヒト天然型IgG1に対してEUナンバリング238番目のProをAspに置換したFcに対し、さらにFcγRIIbへの結合を上げると予測される他の改変を組み合わせても、期待される組み合わせ効果は得られなかった。そこで、EUナンバリング238番目のProをAspに置換したFc改変体を元にして、そのFcに対して改変を網羅的に導入することにより、さらにFcγRIIbへの結合を増強する改変体を見出す検討を実施した。抗体H鎖としては、IL6R-G1d（配列番号：19）に対し、EUナンバリング252番目のMetをTyrに置換する改変、EUナンバリング434番目のAsnをTyrに置換する改変を導入したIL6R-F11（配列番号：22）を作製し、これに対してさらにEUナンバリング238番目のProをAspに置換する改変を導入したIL6R-F652を作製した。IL6R-F652に対し、EUナンバリング238番目の残基の近傍の領域（EUナンバリング234番目から237番

目、239番目）を元のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換した抗体H鎖配列を含む発現プラスミドをそれぞれ用意した。抗体L鎖にはIL6R-L（配列番号：21）を共通して用いた。これらの改変体を参考例１の方法により発現、精製し、発現させた。これらのFc変異体をPD variantと呼ぶ。参考例２の方法により各PD variantのFcγRIIa R型およびFcγRIIbに対する相互作用を網羅的に評価した。

[0282] それぞれのFcγRとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。各PD variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変であるIL6R-F652/IL6R-L）の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各PD variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。横軸に各PD variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各PD variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した(図２２)。

[0283] その結果、11種類の改変が、改変導入前の抗体と比較してFcγRIIbに対する結合を増強し、FcγRIIa R型に対する結合を維持または増強する効果があることを見出した。これらの11種類の改変体のFcγRIIbおよびFcγRIIa Rに対する結合活性をまとめた結果を表２０に示す。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：22）に対して導入した改変を表す。

[0284]

[表20]

改変体名	改変	FcγRIIbに対する相対的結合活性	FcγRIIaRに対する相対的結合活性
IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

[0285] この11種類の改変をP238Dが導入された改変体に対して、さらに追加で導入した場合の相対的なFcγRIIbに対する結合活性の値、参考例３においてこれらの改変をP238Dを含まないFcに導入した際の相対的なFcγRIIbに対する結合活性の値を図２３に示した。これら11種類の改変は、P238D改変に更に導入すると、導入前に比べてFcγRIIbに対する結合量を増強していたが、G237F, G237W, S239Dを除く8種類の改変ではそれとは反対に参考例３で用いたP238Dを含まない改変体（GpH7-B3/GpL16-k0）に導入した場合にはFcγRIIbへの結合を下げる効果を示していた。

参考例５とこの結果から、天然型IgG1に対して導入した改変の効果からP238D改変をFcに含む改変体に対して同改変を導入したときの効果を予測するのは困難であることが明らかとなった。また言いかえれば今回見出した8種類の改変は、本検討を行わなければ見出すことが不可能な改変である。

[0286] 表２０に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIaVに対するKD値を参考例２の方法で測定した結果を表２１にまとめた。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：22）に対して導入した改変を表

す。ただし、IL6R-F11を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD(IIaR)/KD(IIb)およびKD(IIaH)/KD(IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表２１に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-F11（配列番号：22）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表２１中灰色で塗りつぶしたセルは、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0287] 表２１から、いずれの改変体もIL6R-F11と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は1.9倍から5.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-F11/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比はいずれも0.7であるため、表２１のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRII

aRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から5.0であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたと言える。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIaR型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-F11と比較して親和性が低下していた。

[0288]

[表21]

改変体名	改変	FcgRIaに対する KD(mol/L)	FcgRIIaRに対する KD(mol/L)	FcgRIIaHに対する KD(mol/L)	FcgRIIbに対する KD(mol/L)	FcgRIIIaVに対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaH)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)	改変体のFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親ポリペプチドのFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	2.6	0.1
IL6R-F11/IL6R-L		9.0E-10	5.0E-06	5.0E-06	6.8E-06	1.5E-06	0.7	0.7	1.0	1.0
IL6R-PD042/IL6R-L	L234W/P238D	6.3E-08	1.6E-05	1.9E-05	2.0E-06	3.7E-05	8.1	9.5	3.4	3.2
IL6R-PD043/IL6R-L	L234Y/P238D	7.5E-08	2.6E-05	2.3E-05	1.6E-06	4.5E-05	15.9	14.4	4.2	4.6
IL6R-PD078/IL6R-L	G237A/P238D	1.4E-07	3.2E-05	2.1E-05	3.0E-06	3.7E-05	10.5	7.0	2.3	4.2
IL6R-PD080/IL6R-L	G237D/P238D	1.4E-07	2.1E-05	2.5E-05	2.0E-06	4.3E-05	10.7	12.8	3.5	4.2
IL6R-PD081/IL6R-L	G237E/P238D	3.4E-07	3.9E-05	2.5E-05	3.6E-06	4.1E-05	10.6	7.0	1.9	5.0
IL6R-PD082/IL6R-L	G237F/P238D	5.2E-08	1.4E-05	1.6E-05	3.4E-06	4.3E-05	4.1	4.7	2.0	2.8
IL6R-PD086/IL6R-L	G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.3E-05	2.6E-06	4.1E-05	6.9	7.1	2.7	3.5
IL6R-PD087/IL6R-L	G237M/P238D	5.2E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.9E-06	3.7E-05	7.7	7.0	2.4	4.0
IL6R-PD094/IL6R-L	G237W/P238D	3.6E-08	7.2E-06	1.2E-05	2.3E-06	3.8E-05	3.1	5.2	2.9	1.4
IL6R-PD095/IL6R-L	G237Y/P238D	9.3E-08	7.9E-06	1.5E-05	2.3E-06	4.2E-05	3.4	6.4	2.9	1.6
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	4.9E-09	3.5E-06	1.9E-05	1.4E-06	1.7E-05	2.6	14.0	5.0	0.7

[0289] 〔参考例７〕P238Dを含むFcとFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

先の参考例５に示した通り、P238Dを含むFcに対して、FcγRIIbとの結合活性を向上する、あるいはFcγRIIbへの選択性を向上させる改変を導入しても、FcγRIIbに対する結合活性が減弱してしまうことが明らかとなり、この原因としてFcとFcγRIIbとの相互作用界面の構造がP238Dを導入することで変化してしまっていることが考えられた。そこで、この現象の原因を追及するためP238Dの変異をもつIgG1のFc（以下、Fc(P238D)）とFcγRIIb細胞外領域との複合体の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、天然型 IgG1のFc（以下、Fc(WT)）とFcγRIIb細胞外領域との複合体と立体構造ならびに結合様式を比較することとした。なお、FcとFcγR細胞外領域との複合体の立体構造については、すでに複数の報告があり、Fc(WT) / FcγRIIIb細胞外領域複合体（Nature, 2000, 400, 267-273; J.Biol.Chem. 2011, 276, 16469-16477）、Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体（Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2011, 108, 12669-126674）、Fc(WT) / FcγRIIa細胞外領域複合体（J. Imunol. 2011, 187, 3208-3217）の立体構造が解析されている。これまでにFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造は解析されていないが、Fc(WT)との複合体の立体構造が既知であるFcγRIIaとFcγRIIbでは細胞外領域においてアミノ酸配列の93%が一致し、非常に高い相同性を有していることから、Fc（WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造はFc(WT) / FcγRIIa細胞外領域複合体の結晶構造からモデリングにより推定した。

[0290] Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体についてはX線結晶構造解析により分解能2.6Åで立体構造を決定した。その解析結果の構造を図２４に示す。２つのFc CH2ドメインの間にFcγRIIb細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析されたFc(WT)とFcγRIIIa、FcγRIIIb、FcγRIIaの各細胞外領域との複合体の立体構造と類似している。

次に詳細な比較のため、Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、FcγRIIb細胞外

領域ならびにFc CH2ドメインAに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた（図２５）。その際、Fc CH2ドメインB同士の重なりの程度は良好でなく、この部分に立体構造的な違いがあることが明らかとなった。さらにFc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造ならびにFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造を使い、FcγRIIb細胞外領域とFc CH2ドメインBとの間でその距離が3.7Å以下の原子ペアを抽出し比較することで、FcγRIIbとFc CH2ドメインBとの間の原子間相互作用の違いをFc(WT)とFc(P238D)とで比較した。表２２に示すとおり、Fc(P238D)とFc(WT)では、Fc CH2ドメインBとFcγRIIbとの間の原子間相互作用は一致していない。

[0291]

[表22]

FcgRIIb 原子			Fc(P648D) CH2 ドメイン B 相互作用相手(原子間距離, Å)			Fc(WT) CH2 ドメイン B 相互作用相手(原子間距離, Å)		
Val	116	CG2				Asp	265	OD2 (3.47)
						Gly	237	O (3.65)
Ser	126	OG	Ser	298	N (3.31)			
			Ser	298	CB (3.32)			
			Tyr	296	O (3.05)			
Lys	128	CA	Ser	298	OG (3.50)			
Phe	129	CB	Ser	298	O (3.36)			
Phe	129	CD2				Asn	297	CB (3.50)
						Asn	297	CG (3.43)
Lys	128	C	Ser	298	OG (3.47)			
Phe	129	N	Ser	298	OG (3.30)			
Phe	129	O	Ser	267	OG (3.54)			
Arg	131	CB				Val	266	O (3.02)
Arg	131	CG				Val	266	O (3.22)
Arg	131	CD				Val	266	CG1 (3.45)
						Val	266	C (3.55)
						Val	266	O (3.10)
Arg	131	NE	Ala	327	O (3.60)	Val	266	C (3.66)
						Val	266	O (3.01)
						Val	266	N (3.49)
Arg	131	CZ	Asp	270	CG (3.64)	Val	266	N (3.13)
			Asp	270	OD2 (3.22)			
			Asp	270	OD1 (3.27)			
			Ala	327	CB (3.63)			
Arg	131	NH1	Asp	270	CG (3.19)	Val	266	CG1 (3.47)
			Asp	270	OD2 (2.83)	Val	266	N (3.43)
			Asp	270	OD1 (2.99)	Thr	299	OG1 (3.66)
			Ser	267	CB (3.56)	Ser	298	O (3.11)

Arg	131	NH2	Asp	270	CG	(3.20)	Asp	265	CA	(3.16)
			Asp	270	OD2	(2.80)	Val	266	N	(3.37)
			Asp	270	OD1	(2.87)				
			Ala	327	CB	(3.66)				
Tyr	157	CE1					Leu	234	CG	(3.64)
							Leu	234	CD1	(3.61)
Tyr	157	OH					Gly	236	O	(3.62)
							Leu	234	CA	(3.48)
							Leu	234	CG	(3.45)

[0292] さらにFc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造について、Fc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、P238D付近の詳細構造を比較した。Fc(P238D)とFc(WT)では変異導入位置であるEUナンバリング238番目のアミノ酸残基の位置が変化し、それにともないヒンジ領域から続くこの近辺のループ構造がFc(P238D)とFc(WT)では変化していることがわかる（図２６）。もともとFc(WT)においてはEUナンバリング238番目のProは蛋白の内側にあり、周囲の残基と疎水性コアを形成しているが、これが電荷をもち非常に親水的なAspに変化した場合、そのまま疎水性コアにいることは脱溶媒和の点でエネルギー的に不利となってしまう。そこでFc(P238D)ではこのエネルギー的な不利を解消するため、EUナンバリング238番目のアミノ酸残基が溶媒側を向く形に変化しており、それがこの付近のループ構造の変化をもたらしたと考えられる。さらに、このループはS-S結合で架橋されたヒンジ領域から続いていることから、その構造変化が局所的な変化にとどまらず、Fc CH2ドメインAとドメインBの相対的な配置にも影響し、結果、FcγRIIbとFc CH2ドメインBとの間の原子間相互作用に違いをもたらしたと推察される。このためP238D改変を既に有するFcに、天然型IgGにおいてFcγRIIbに対する選択性、結合活性を向上させる改変を組み合わせても予測される効果が得られなかったと考えられる。

[0293] また、P238Dの導入による構造変化の結果、Fc CH2ドメインAにおいては、隣のEUナンバリング237番目のGlyの主鎖とFcγRIIbの160番目のTyrとの間に水素結合が認められる（図２７）。このTyr160に相当する残基はFcγRIIaで

はPheであり、FcγRIIaとの結合の場合ではこの水素結合は形成されない。160番目のアミノ酸は、Fcとの相互作用界面におけるFcγRIIaとFcγRIIbの間の数少ない違いの一つであることをあわせると、FcγRIIbに特有となるこの水素結合の有無が、Fc(P238D)のFcγRIIbに対する結合活性の向上と、FcγRIIaに対する結合活性の低減を招き、選択性向上の原因になったと推測される。また、Fc CH2ドメインBについてはEUナンバリング270番目のAspとFcγRIIbの131番目のArgとの間に静電的な相互作用が認められる（図２８）。FcγRIIaのアロタイプの一つFcγRIIa H型では、対応する残基がHisとなっており、この静電相互作用を形成できない。このことからFcγRIIa R型と比較してFcγRIIa H型ではFc(P238D)に対する結合活性が低減している理由が説明できる。このようなX線結晶構造解析の結果に基づく考察から、P238Dの導入によるその付近のループ構造の変化とそれに伴うドメイン配置の相対的な変化が天然型IgGにはない新たな相互作用を形成し、P238D改変体のFcγRIIbに対する選択的な結合プロファイルにつながっていることが明らかとなった。

[0294] [Fc(P238D)の発現精製]

P238D改変を含むFcの調製は以下のように行った。まず、hIL6R-IgG1-v1（配列番号：20）のEUナンバリング220番目のCysをSerに置換し、EUナンバリング２１６番目のGluからそのC末端をPCRによってクローニングした遺伝子配列Fc(P238D)を参考例1に記載の方法にしたがって発現ベクターの作製、発現、精製を行った。なお、EUナンバリング220番目のCysは通常のIgG1においては、L鎖のCysとdisulfide bondを形成しているが、Fcのみを調製する場合、L鎖を共発現させないため、不要なdisulfide bond形成を回避するためにSerに置換した。

[0295] [FcγRIIb細胞外領域の発現精製]

参考例2の方法にしたがって調製した。

[0296] [Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の精製]

結晶化用に得られたFcγRIIb細胞外領域サンプル 2mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1(Prote

in Science 1996, 5, 2617-2622) 0.29mgを加え、0.1M Bis-Tris pH6.5のBuffer条件で、室温にて３日間静置することにより、N型糖鎖をAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断した。次にこの糖鎖切断処理を施したFcγRIIb細胞外領域サンプルを5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮し、20mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製した。さらに得られた糖鎖切断FcγRIIb細胞外領域画分にFc(P238D)をモル比でFcγRIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加え、10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮後、20mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製、Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルを得た。

[0297] [Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶化]

Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルを10000MWCOの限外ろ過膜 により約10mg/mlまで濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化をおこなった。結晶化にはHydra II Plus One (MATRIX)を用い、100mM Bis-Tris pH6.5、17% PEG3350, 0.2M Ammonium acetate, 2.7%(w/v) D-Galactoseのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.2μl：0.2μlで混合して結晶化ドロップを作成し、シール後、20℃に静置したところ、薄い板状の結晶を得ることに成功した。

[0298] [Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定]

得られたFc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の単結晶一つを100mM Bis-Tris pH6.5, 20% PEG3350, Ammonium acetate, 2.7%(w/v) D-Galactose, Ethylene glycol 22.5%(v/v) の溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させ、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-1AにてX線回折データの測定をおこなった。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態を維持し、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 270 (ADSC) により、結晶を0.8° ずつ回転させながらトータル225枚のX線回折画像を収集した

。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2（CCP4 Software Suite）、XDS Package（Walfgang Kabsch）ならびにScala（CCP4 Software Suite）を用い、最終的に分解能2.46Åまでの回折強度データを得た。本結晶は、空間群$P2_1$に属し、格子定数ａ＝48.85Å、ｂ＝76.01Å、ｃ＝115.09Å、α＝90°、β＝100.70°、γ＝90°であった。

[0299] ［Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析］

Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造決定は、プログラムPhaser（CCP4 Software Suite）を用いた分子置換法によりおこなった。得られた結晶格子の大きさとFc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分を別座標として取り出し、それぞれFc CH2ドメインの探索用モデルとした。同じくPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分を一つの座標として取り出し、Fc CH3ドメインの探索用モデルとした。最後にFcγRIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標からA鎖6-178番のアミノ酸残基部分を取り出しFcγRIIb細胞外領域の探索用モデルとした。Fc CH3ドメイン、FcγRIIb細胞外領域、Fc CH2ドメインの順番に各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定し、Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルを得た。得られた初期モデルに対し2つのFc CH2ドメイン、2つのFc CH3ドメインならびにFcγRIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0Åの回折強度データに対し、結晶学的信頼度因子Ｒ値は40.4%、Free R値は41.9%となった。さらにプログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出した2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot（Paul Emsley）でおこな

い、これらを繰り返すことでモデルの精密化をおこなった。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.6Åの24291個の回折強度データを用い、4846個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子R値は23.7%、Free R値は27.6%となった。

[0300] [Fc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造作成]

Fc(WT) / FcγRIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3RY6の構造座標をベースに、プログラムDisovery Studio 3.1(Accelrys)のBuild Mutants機能を使い、FcγRIIbのアミノ酸配列と一致するように構造座標中のFcγRIIaに変異を導入した。その際、Optimization LevelをHigh、Cut Radiusを4.5とし、５つのモデルを発生させ、その中から最もエネルギースコアが良いものを採用し、Fc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造とした。

[0301] 〔参考例８〕結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体のFcγRに対する結合の解析

参考例７で得られたFc (P238D)とFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析の結果に基づき、EUナンバリング238番目のProをAspに置換したFc改変体上で、FcγRIIbとの相互作用に影響を与えることが予測される部位（EUナンバリング233番目、240番目、241番目、263番目、265番目、266番目、267番目、268番目、271番目、273番目、295番目、296番目、298番目、300番目、323番目、325番目、326番目、327番目、328番目、330番目、332番目、334番目の残基）に対して網羅的な改変を導入し、さらにFcγRIIbとの結合を増強する組み合わせ改変体を検討した。

[0302] 参考例４で作製したIL6R-G1d（配列番号：19）に対し、EUナンバリング439番目のLysをGluに置換した改変を導入したIL6R-B3（配列番号：23）を作製した。次に、IL6R-B3に対し、EUナンバリングで238番目のProをAspに置換した改変を導入したIL6R-BF648を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：21）を共通に用いた。これらの改変体を参考例１の方法に従い、抗体を発現、精製し、参考例２の方法により各FcγR（FcγRIa、 FcγRIIa H型、FcγRI

Ia R型、FcγRIIb、FcγRIIIa V型）に対する結合を網羅的に評価した。

[0303] それぞれのFcγRとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って図を作成した。各改変体の各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体(EUナンバリング238番目のProをAspに置換したIL6R-BF648/IL6R-L)の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各改変体の各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。横軸に各改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した(図２９)。

その結果、図２９に示すように、全改変中24種類の改変において、改変導入前の抗体と比較してFcγRIIbに対する結合を維持または増強する効果があることを見出した。これらの改変体のそれぞれのFcγRに対する結合を表２３に示す。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：23, 表２３中のIL6R-2B999）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0304]

[表23]

改変体名	改変	FcgRIaに対する相対的結合活性	FcgRIIaRに対する相対的結合活性	FcgRIIaHに対する相対的結合活性	FcgRIIbに対する相対的結合活性	FcgRIIIaVに対する相対的結合活性
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-2B999/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	73	92	83	104	94
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

[0305] 表２３に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIa V型に対するKD値を参考例２の方法で測定した結果を表２４にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：23）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD(IIaR)/KD(IIb)およびKD(IIaH)/KD(IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表２４に示した。ここ

で親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：23）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表２４中灰色で塗りつぶしたセルは、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

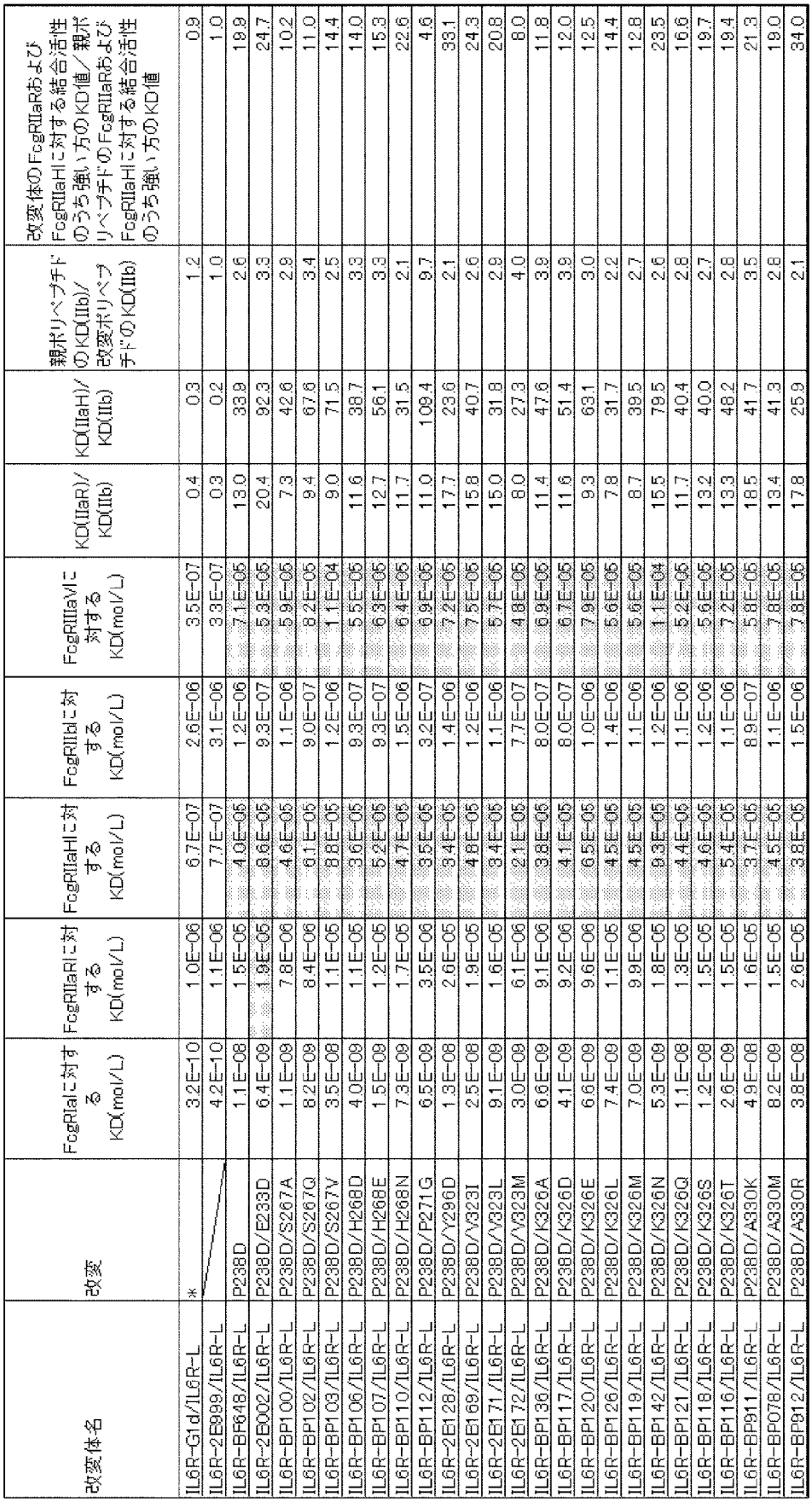
の式を利用して算出した値である。

[0306] 表２４から、いずれの改変体もIL6R-B3(表２４中のIL6R-2B999)と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は2.1倍から9.7倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表２４のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が4.6から34.0であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれよりも低減していたと言える。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増

強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0307]

[表24]



改変体名	改変	FcgRIaに対する KD(mol/L)	FcgRIIaRに対する KD(mol/L)	FcgRIIaHに対する KD(mol/L)	FcgRIIbに対する KD(mol/L)	FcgRIIIaVに対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaH)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)	改変体のFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親ポリペプチドのFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-2B999/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	6.4E-09	1.9E-05	8.6E-05	9.3E-07	5.3E-05	20.4	92.3	3.3	24.7
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.8E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.9E-05	7.3	42.6	2.9	10.2
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	8.2E-09	8.4E-06	6.1E-05	9.0E-07	8.2E-05	9.4	67.6	3.4	11.0
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	3.5E-08	1.1E-05	8.8E-05	1.2E-06	1.1E-04	9.0	71.5	2.5	14.4
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	4.0E-09	1.1E-05	3.6E-05	9.3E-07	5.5E-05	11.6	38.7	3.3	14.0
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-08	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05	12.7	56.1	3.3	15.3
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	7.3E-09	1.7E-05	4.7E-05	1.5E-06	6.4E-05	11.7	31.5	2.1	22.6
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05	11.0	108.4	9.7	4.6
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	1.3E-08	2.6E-05	3.4E-05	1.4E-06	7.2E-05	17.7	23.6	2.1	33.1
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	2.5E-08	1.9E-05	4.8E-05	1.2E-06	7.5E-05	15.8	40.7	2.6	24.3
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	9.1E-09	1.6E-05	3.4E-05	1.1E-06	5.7E-05	15.0	31.8	2.9	20.8
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	3.0E-09	6.1E-06	2.1E-05	7.7E-07	4.8E-05	8.0	27.3	4.0	8.0
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	6.6E-09	9.1E-06	3.8E-05	8.0E-07	6.9E-05	11.4	47.6	3.9	11.8
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	4.1E-09	9.2E-06	4.1E-05	8.0E-07	6.7E-05	11.6	51.4	3.9	12.0
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	6.6E-09	9.6E-06	6.5E-05	1.0E-06	7.9E-05	9.3	63.1	3.0	12.5
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	7.4E-09	1.1E-05	4.5E-05	1.4E-06	5.6E-05	7.8	31.7	2.2	14.4
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05	8.7	38.5	2.7	12.8
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04	15.5	78.5	2.6	23.5
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	1.1E-08	1.3E-05	4.4E-05	1.1E-06	5.2E-05	11.7	40.4	2.8	16.6
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	1.2E-08	1.5E-05	4.6E-05	1.2E-06	5.6E-05	13.2	40.0	2.7	19.7
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	2.6E-09	1.5E-05	5.4E-05	1.1E-06	7.2E-05	13.3	48.2	2.8	19.4
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	4.9E-08	1.6E-05	3.7E-05	8.9E-07	5.8E-05	18.5	41.7	3.5	21.3
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	8.2E-09	1.5E-05	4.5E-05	1.1E-06	7.8E-05	13.4	41.3	2.8	19.0
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	3.8E-08	2.6E-05	3.8E-05	1.5E-06	7.8E-05	17.8	25.9	2.1	34.0

[0308] 得られた組み合わせ改変体のうち、有望なものについて、結晶構造からその効果の要因を考察した。図３０にはFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を示した。この中で、左側に位置するH鎖をFc Chain A、右側に位置するH鎖をFc Chain Bとする。ここでFc Chain AにおけるEUナンバリング233番目の部位は、FcγRIIbのEUナンバリング113番目のLysの近傍に位置することが分かる。ただし、本結晶構造においては、E233の側鎖はその電子密度がうまく観察されておらず、かなり運動性の高い状態にある。従ってEUナンバリング233番目のGluをAspに置換する改変は、側鎖が1炭素分短くなることによって側鎖の自由度が小さくなり、その結果、FcγRIIbのEUナンバリング113番目のLysとの相互作用形成時のエントロピーロスが低減され、結果、結合自由エネルギーの向上に寄与しているものと推測される。

[0309] 図３１には同じくFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の構造のうち、EUナンバリング330番目の部位近傍の環境を示した。この図から、Fc（P238D）のFc Chain AのEUナンバリング330番目の部位周辺はFcγRIIbのEUナンバリング85番目のSer、86番目のGlu、163番目のLysなどから構成される親水的な環境であることが分かる。従って、EUナンバリング330番目のAlaをLys、あるいはArgに置換する改変は、FcγRIIbのEUナンバリング85番目のSer、ないしEUナンバリング86番目のGluとの相互作用強化に寄与しているものと推測される。

[0310] 図３２にはFc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体および、Fc(WT) / FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、EUナンバリング271番目のProの構造を示した。これら二つの構造は、良く一致するが、EUナンバリング271番目のProの部位においては異なる立体構造となっている。また、Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造においては、この周辺の電子密度が弱いことを考え合わせると、Fc(P238D)/FcγRIIbにおいては、EUナンバリング271番目がProであることで、構造上、大きな負荷がかかっており、それによってこのループ構造が最適な構造をとり得ていない可能性が示唆された。従って、EU

ナンバリング271番目のProをGlyに置換する改変は、このループ構造に柔軟性を与え、FcγRIIbと相互作用するうえで最適な構造をとらせる際のエネルギー的な障害を軽減することで、結合増強に寄与しているものと推測される。

[0311] 〔参考例９〕P238Dと組み合わせることによりFcγRIIbへの結合を増強する改変の組み合わせ効果の検証

参考例６、参考例８において得られた改変の中で、FcγRIIbへの結合を増強する効果もしくはFcγRIIbへの結合を維持し、他のFcγRへの結合を抑制する効果が見られた改変同士を組み合わせ、その効果を検証した。

参考例８の方法と同様に、表１９，２２から特に優れた改変を選択し、抗体H鎖IL6R-BF648に対して組み合わせて導入した。抗体L鎖には共通してIL6R-Lを用い、参考例１の方法に従い、抗体を発現、精製させ、参考例２の方法により各FcγR(FcγRIa、 FcγRIIa H型、FcγRIIa R型、FcγRIIb、FcγRIIIa V型)に対する結合を網羅的に評価した。

それぞれのFcγRとの相互作用解析結果について、以下の方法に従って相対的結合活性を算出した。各改変体の各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体(EUナンバリング238番目のProをAspに置換したIL6R-BF648/IL6R-L)の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各改変体の各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。横軸に各改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（表２５）。

なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：23）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0312]

[表25]

改変体名	改変	FcgRIaに対する相対的結合活性	FcgRIIaRに対する相対的結合活性	FcgRIIaHに対する相対的結合活性	FcgRIIbに対する相対的結合活性	FcgRIIIaVに対する相対的結合活性
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2BF53/IL6R-L	E233D/P238D/V323M	155	286	207	156	126
IL6R-2BF61/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87
IL6R-BF082/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	74	126	108	138	87
IL6R-BF083/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	91	122	107
IL6R-BF084/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	109	203	162	141	106
IL6R-BF085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	19	278	158	152	104
IL6R-BF086/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123
IL6R-BF087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158
IL6R-BF088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122
IL6R-BF089/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	43	222	186	147	136
IL6R-BF129/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	68	111	98	138	95
IL6R-BF130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	104	272	224	160	115
IL6R-BF131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	33	364	253	160	118
IL6R-BF132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	91	191	130	150	120
IL6R-BF133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114
IL6R-BF143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	236	143	135	114
IL6R-BF144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	64	204	108	121	128
IL6R-BF145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	152	153
IL6R-BF146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	208	156	160
IL6R-BF147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	582	177	209
IL6R-BF148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	33	603	452	176	227
IL6R-BF149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	173	186
IL6R-BF150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	30	757	770	183	204
IL6R-BF151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	39	705	621	180	221
IL6R-BF152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	34	638	548	178	146
IL6R-BF176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	102	201	128	147	131
IL6R-BF177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	186
IL6R-BF178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110
IL6R-BF179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	39	570	226	177	125
IL6R-BF180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	178	100
IL6R-BF181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	106	362	150	170	122
IL6R-BF182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	95	413	139	173	120
IL6R_DF183/IL6R_L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	191	164	110
IL6R-BF184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	96	436	131	171	106
IL6R-BF185/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	47	670	446	178	181
IL6R-BF186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	43	614	368	175	143
IL6R-BF187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	68	397	205	157	124
IL6R-BF188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	74	636	294	178	121
IL6R-BF189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	56	557	183	177	141
IL6R-BF190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	50	615	224	181	155
IL6R-BF191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
IL6R-BF192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	109	406	122	172	118
IL6R_DF193/IL6R_L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	110	449	154	173	135
IL6R-BF194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	69	672	395	178	249
IL6R-BF195/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	68	661	344	181	221
IL6R-BF196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	89	402	195	157	137
IL6R-BF197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	294	179	209
IL6R-BF198/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	104	449	188	164	157
IL6R-BF199/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330R	112	172	116	144	103
IL6R-BF200/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	60	754	517	188	164
IL6R-BF201/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330R	57	696	359	186	121
IL6R_DF202/IL6R_L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	43	615	205	105	100
IL6R-BF203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	35	637	255	185	88
IL6R-BF204/IL6R-L	E233D/P238D/F27*G/K326A/A330R	110	301	137	165	121
IL6R-BF205/IL6R-L	E233D/P238D/F27*G/Y296D/A330R	97	335	108	167	93
IL6R-BF206/IL6R-L	E233D/P238D/F27*G/A330R	101	362	123	168	92
IL6R-BF207/IL6R-L	E233D/P238D/A330R	74	103	103	124	97
IL6R-BF208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	81	690	310	186	118
IL6R-BF209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	68	625	267	186	153
IL6R_DF210/IL6R_L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	57	661	279	107	135
IL6R-BF211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	128	312	111	165	87
IL6R-BF212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	117	363	135	173	122
IL6R-BF213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R	118	382	123	169	100
IL6R-BF214/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	285	174	165

[0313] 表２５に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIa V型に対するKD値を参考例２の方法で測定した結果を表２６にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：23）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD(IIaR)/KD(IIb)およびKD(IIaH)/KD(IIb)はそれぞ

れ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で割った値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表２６に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：23）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表２６中灰色で塗りつぶしたセルは、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたたため、参考例２に記載の

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0314] 表２６から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は3.0倍から99.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値／各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値／FcγRIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表２６のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い

方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から29.9であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたと言える。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0315]

[表26]

改変体名	改変	FcgRIaに対する KD(mol/L)	FcgRIIaR に対する KD(mol/L)	FcgRIIaH に対する KD(mol/L)	FcgRIIbに対する KD(mol/L)	FcgRIIIaVに対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaH)/KD(IIb)	親抗リペプチドのKD(IIb)/改変抗リペプチドのKD(IIb)	改変体のFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値／親抗リペプチドのFcgRIIaRおよびFcgRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
IL6R-G1A/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-BS/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF846/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-06	1.2E-06	7.1E-06	13.0	3.3.9	2.6	19.9
IL6R-2B252/IL6R-L	E233D/P238D/V323M	1.4E-09	5.0E-06	1.9E-05	4.3E-07	5.0E-06	11.5	30.1	7.2	6.5
IL6R-2B261/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	9.0E-09	2.2E-05	9.3E-06	1.0E-06	7.3E-06	21.8	32.4	3.0	28.8
IL6R-BF082/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	1.8E-08	1.2E-05	8.7E-06	5.4E-07	8.1E-06	22.8	60.0	5.8	16.8
IL6R-BF083/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	3.8E-08	2.3E-05	2.4E-05	7.9E-07	6.6E-06	29.0	55.5	2.9	29.0
IL6R-BF084/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	7.0E-09	7.2E-06	2.4E-05	5.0E-07	6.7E-06	14.3	47.6	6.1	9.4
IL6R-BF085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	2.9E-07	4.2E-06	2.4E-05	3.2E-07	6.8E-06	13.1	74.5	9.6	5.5
IL6R-BF086/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	2.7E-08	9.7E-06	3.4E-06	5.7E-07	5.7E-06	17.1	59.9	5.4	12.6
IL6R-BF087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	3.8E-08	9.7E-06	2.1E-05	8.1E-07	4.4E-06	16.0	34.7	5.1	12.6
IL6R-BF088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	3.9E-07	2.9E-06	2.3E-06	2.2E-07	5.7E-06	13.3	106.5	14.3	3.7
IL6R-BF089/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	6.5E-08	6.4E-06	2.0E-05	3.9E-07	5.1E-06	16.6	51.9	8.0	8.3
IL6R-BF129/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	2.5E-08	1.5E-05	4.0E-06	5.2E-07	7.5E-06	28.3	77.5	6.0	13.6
IL6R-BF130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	1.8E-09	5.3E-06	2.8E-05	3.0E-07	7.1E-06	17.5	85.5	10.2	6.9
IL6R-BF131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	1.2E-07	3.1E-06	1.1E-05	2.5E-07	5.9E-06	12.5	56.9	12.6	4.0
IL6R-BF132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	1.5E-08	9.0E-06	3.0E-06	3.7E-07	5.8E-06	21.5	81.1	8.4	10.3
IL6R-BF133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	1.3E-07	8.6E-06	2.0E-06	5.6E-07	6.2E-06	15.5	46.8	5.6	11.2
IL6R-BF143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	1.6E-08	5.7E-06	2.7E-05	5.7E-07	6.2E-06	10.0	47.1	5.4	7.5
IL6R-BF144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	3.7E-08	8.9E-06	3.8E-05	7.9E-07	5.6E-06	8.7	45.8	3.9	8.9
IL6R-BF145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	1.2E-07	3.4E-06	1.7E-05	3.4E-07	4.5E-06	9.9	49.9	8.1	4.4
IL6R-BF146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	7.4E-09	2.1E-06	1.8E-05	2.3E-07	3.0E-06	9.3	80.0	13.7	2.7
IL6R-BF147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	1.4E-07	8.8E-07	5.1E-06	6.6E-08	3.3E-06	13.6	77.7	47.1	1.2
IL6R-BF148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	8.8E-08	1.1E-06	7.0E-06	7.5E-08	5.0E-06	14.5	93.8	41.4	1.4
IL6R-BF149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	1.2E-07	1.4E-06	8.4E-06	9.3E-08	5.7E-06	15.0	89.9	33.1	1.8
IL6R-BF150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	3.2E-07	5.5E-07	3.4E-06	3.1E-06	3.4E-06	17.7	109.0	98.0	0.7
IL6R-BF151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	8.4E-08	6.7E-07	4.7E-06	4.0E-06	8.1E-06	16.9	117.8	77.4	0.8
IL6R-BF152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	7.3E-08	9.1E-07	5.9E-06	4.1E-06	4.8E-06	19.5	135.9	75.0	1.0

IL6R-BF176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	7.3E-09	9.9E-09	3.0E-05	3.0E-07	5.4E-05	19.1	831	8.6		8.9
IL6R-BF177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	3.3E-08	7.1E-07	8.3E-06	5.2E-06	6.7E-05	13.8	159.2	60.0		0.9
IL6R-BF178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	4.3E-08	9.3E-07	1.4E-06	5.1E-08	6.4E-06	16.1	272.4	99.1		1.2
IL6R-BF179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	6.4E-08	1.4E-06	1.8E-06	8.4E-08	5.6E-06	16.7	190.9	36.9		1.8
IL6R-BF180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	9.2E-06	1.2E-06	1.8E-06	6.2E-06	7.0E-06	15.6	291.8	48.9		1.5
IL6R-BF181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.5E-09	3.2E-06	2.6E-05	1.6E-07	5.7E-06	20.3	162.5	18.3		4.2
IL6R-BF182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	1.0E-08	2.6E-06	2.8E-05	1.1E-07	5.8E-06	23.5	256.9	26.3		3.3
IL6R-BF183/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	1.7E-08	2.6E-06	1.5E-05	2.4E-07	5.6E-06	19.7	62.5	12.9		3.3
IL6R-BF184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	1.1E-08	2.3E-06	3.0E-06	1.3E-07	9.0E-06	18.2	238.1	24.5		3.0
IL6R-BF185/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	8.5E-09	8.8E-07	7.9E-06	8.9E-08	8.6E-06	12.6	105.2	44.5		1.1
IL6R-BF186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.5E-08	9.6E-07	9.3E-06	6.1E-08	9.4E-06	15.8	152.5	50.7		1.3
IL6R-BF187/IL6R-L	L234Y/P236D/P271G/K326A/A330K	2.5E-08	2.8E-06	1.8E-05	2.8E-07	5.6E-06	9.7	62.3	10.7		3.6
IL6R-BF188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	2.1E-08	1.0E-06	1.6E-05	4.0E-06	5.6E-06	21.8	350.1	67.6		1.3
IL6R-BF189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.2E-08	1.4E-06	2.1E-05	7.4E-08	4.9E-06	18.5	283.8	41.8		1.8
IL6R-BF190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.3E-08	1.1E-06	1.7E-05	5.8E-08	4.6E-06	19.3	292.6	53.2		1.5
IL6R-BF191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.0E-09	3.0E-06	2.7E-05	1.5E-07	4.9E-06	20.3	184.9	21.2		3.8
IL6R-BF192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.6E-09	2.6E-06	9.2E-06	1.1E-07	5.6E-06	23.1	283.2	27.3		3.4
IL6R-BF193/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.5E-09	2.2E-06	2.5E-05	1.2E-07	5.2E-06	16.3	206.6	25.5		2.9
IL6R-BF194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	2.4E-08	8.2E-07	8.5E-06	5.2E-08	4.7E-06	15.8	169.5	56.4		1.1
IL6R-BF195/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	2.2E-09	9.1E-07	1.0E-05	5.0E-06	3.1E-06	16.2	200.8	62.0		1.2
IL6R-BF196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.4E-08	3.0E-06	1.9E-05	2.2E-07	5.1E-06	13.4	85.2	13.9		3.9
IL6R-BF197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	1.5E-08	9.8E-07	1.7E-05	5.8E-06	3.3E-06	17.1	208.7	52.7		1.3
IL6R-DF180/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/I268D/P271G/K326A/A330K	1.1E-06	2.2E-06	2.0E-05	2.0E-07	4.4E-06	11.0	101.5	15.7		2.0
IL6R-BF198/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330R	6.4E-09	8.6E-06	2.6E-05	4.9E-07	6.1E-06	17.5	53.0	6.3		11.1
IL6R-BF200/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	3.3E-06	5.3E-07	4.2E-06	3.4E-05	3.8E-06	15.6	123.9	91.2		0.8
IL6R-BF201/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330R	5.1E-09	8.4E-07	6.9E-06	4.0E-08	5.2E-06	21.0	172.1	77.1		1.1
IL6R-BF202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	9.5E-09	1.2E-06	9.2E-06	6.4E-08	5.8E-06	19.2	141.0	48.4		1.6
IL6R-BF203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	1.8E-07	9.9E-07	1.1E-05	4.9E-05	7.2E-06	20.5	226.8	83.7		1.3
IL6R-BF204/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330R	7.5E-09	4.5E-06	2.1E-05	2.5E-07	5.2E-06	17.6	62.7	12.2		5.8
IL6R-BF205/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	7.7E-09	3.5E-06	2.8E-05	1.6E-07	6.8E-06	21.8	176.1	18.4		4.5
IL6R-BF206/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330R	8.2E-09	3.1E-06	2.4E-05	2.0E-07	6.9E-06	16.1	123.1	15.8		4.1
IL6R-BF207/IL6R-L	E233D/P238D/A330R	2.2E-08	1.9E-05	2.9E-06	8.4E-07	6.8E-06	23.0	94.5	3.7		25.1
IL6R-BF208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	1.9E-06	8.5E-07	8.3E-06	3.2E-06	5.3E-06	26.3	256.2	95.4		1.1
IL6R-BF209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	3.3E-06	1.2E-06	9.8E-06	5.1E-06	4.1E-06	22.7	195.3	60.4		1.5
IL6R-BF210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	6.5E-06	1.0E-06	9.5E-06	3.9E-06	4.6E-06	25.4	241.1	78.4		1.3
IL6R-BF211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	4.2E-09	4.1E-06	2.7E-06	2.2E-07	7.5E-06	18.5	120.5	13.8		5.4
IL6R-BF212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	5.2E-09	3.5E-06	2.2E-05	1.7E-07	5.8E-06	21.1	133.3	16.7		4.5
IL6R-BF213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R	4.1E-09	3.1E-06	2.4E-05	1.8E-07	6.3E-06	17.7	156.4	17.6		4.0
IL6R-BF214/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	5.9E-09	1.7E-06	9.2E-06	1.2E-07	3.0E-05	14.5	76.0	26.2		2.2

[0316] なお、各配列番号の配列における可変領域および定常領域を下表にまとめた。表中、「B3」は「2B999(B3)」、「omlizH」は「omalizumab_VH」、「omlizL」は「omalizumab_VL」を表す。

[表27]

配列番号	可変領域	定常領域
15	GpH7	
16	GpL16	k0
17	GpH7	B3
18	IL6R	
19	IL6R	G1d
20	IL6R	IgG1-v1
21	IL6R-L	k0
22	IL6R	F11
23	IL6R	B3
24	IL6R	BP208
25	omlizH	G1d
26	omlizL	CK
27	IL6R	BP230
28	IL6R	BP264
29	IL6R	BP267
30	IL6R	G4d
31	IL6R	BP478
32	IL6R	BP253
33	IL6R	BP423
34	GpH7	G1d
35	GpH7	A5
36	IL6R	BP404
37	IL6R	BP408
38	IL6R	BP419
39	IL6R	BP407
40	IL6R	BP409
41	IL6R	BP410
42	IL6R	AP029
43		BP230
44		BP231
45		BP265
46		BP391
47		BP429
48		BP436

配列番号	可変領域	定常領域
49		BP437
50		BP445
51		BP473
52		BP478
53		BP481
54		BP487
55		BP488
56		BP489
57		BP490
58		BP491
59		BP492
60		BP493
61		BP494
62		BP495
63		BP498
64		BP499
65		BP503
66		BP509
67		BP510
68		BP511
69	IL6R	A5
70		Fc(P587)
71		Fc(P588)
72	IL6R	P587
73	IL6R	P587-LS
74	IL6R-L2	k0
75		BP557
76		BP559
77		BP567
78		Fc(DLE)
79		Fc(YTE)
80		Fc(EF)
81		Fc(P208)

産業上の利用可能性

[0317] 本発明によって、アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドと比較して、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、また、FcγRIIa(R型)と比較したFcγRIIbに対する結合選択性が増強したFc領域改変体、該Fc領域改変体を含むポリペプチドが提供された。該ポリペプチドを用いることにより、FcγRIIbのITIMのリン酸化を介した炎症性免疫反応の抑制性シグナルを伝達することが可能となる。また、FcγRIIbに選択的に結合する性質を抗体のFcに付与することにより、FcγRIIbを介した免疫抑制的な作用を通じて、抗医薬品抗体の産生を抑制できる可能性がある。

請求の範囲

[請求項1] EUナンバリング238番目のアミノ酸、並びに、EUナンバリング233番目のアミノ酸、234番目のアミノ酸、235番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、265番目のアミノ酸、266番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸、269番目のアミノ酸、271番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、274番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、326番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、331番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸、333番目のアミノ酸、334番目のアミノ酸、355番目のアミノ酸、356番目のアミノ酸、358番目のアミノ酸、396番目のアミノ酸、409番目のアミノ酸及び419番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されているFc領域改変体であって、該改変体のFcγレセプターに対する結合活性が〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が15.0以上となるFc領域改変体。

[請求項2] EUナンバリング238番目のアミノ酸、268番目のアミノ酸及び271番目のアミノ酸が他のアミノ酸に改変され、更に、EUナンバリング233番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、264番目のアミノ酸、267番目のアミノ酸、272番目のアミノ酸、296番目のアミノ酸、327番目のアミノ酸、330番目のアミノ酸、332番目のアミノ酸及び396番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に改変されている、請求項１に記載のFc領域改変体。

[請求項3] EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、並びに、233番目のアミノ酸がAsp、234番目のアミノ酸がTyr、235番目のアミノ酸がPhe、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、265番目のアミノ酸がGlu、266番目のアミノ酸がPhe、Leu又はMet、267番目のアミノ酸がAla、Glu、Gly又はGln、268番目のアミノ酸がAsp、Gln又はGlu、269

番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro又はGln、274番目のアミノ酸がGln、296番目のアミノ酸がAsp又はPhe、326番目のアミノ酸がAla又はAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がLys、Arg又はSer、331番目のアミノ酸がSer、332番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、333番目のアミノ酸がLys、Arg、Ser又はThr、334番目のアミノ酸がArg、Ser又はThr、355番目のアミノ酸がAla、Gln、356番目のアミノ酸がGlu、358番目のアミノ酸がMet、396番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp又はTyr、409番目のアミノ酸がArg及び419番目のアミノ酸がGluであるアミノ酸群から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有しているFc領域改変体であって、該改変体のFcγレセプターに対する結合活性が〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が15.0以上となるFc領域改変体。

[請求項4] EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、及び、271番目のアミノ酸がGlyであって、更に、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla又はGly、272番目のアミノ酸がAsp又はPro、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg、332番目のアミノ酸がThr、及び、396番目のアミノ酸がLeu又はMetであるアミノ酸群から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有している、請求項３に記載のFc領域改変体。

[請求項5] 〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が50.0以上である、請求項１から４のいずれかに記載のFc領域改変体。

[請求項6] 〔アミノ酸改変が導入されていないFc領域を含むポリペプチドのFc

γRIIbに対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が100.0以上である、請求項１から４のいずれかに記載のFc領域改変体。

[請求項7] 〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa(R型)に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が10.0以上である、請求項１から６のいずれかに記載のFc領域改変体。

[請求項8] 〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIa(R型)に対するKD値〕／〔Fc領域改変体を含むポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕の値が20.0以上である、請求項１から６のいずれかに記載のFc領域改変体。

[請求項9] 前記Fc領域改変体が下記の（a)～(x）のいずれかに記載のアミノ酸改変が含まれる、請求項１から８いずれかに記載のFc領域改変体。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び332番目のアミノ酸改変

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、268番目、271番目、296番目、327番目及び330番目のアミノ酸改変

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目

、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び330番目のアミノ酸改変

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、296番目、327番目、330番目及び396番目のアミノ酸改変

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び330番目のアミノ酸改変

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目

、268番目及び271番目のアミノ酸改変

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目、237番目、267番目、268番目、271番目、296番目及び330番目のアミノ酸改変

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目、264番目、267番目、268番目、271番目、272番目及び296番目のアミノ酸改変

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目、233番目、264番目、267番目、268番目、271番目及び296番目のアミノ酸改変

[請求項10] 前記Fc領域改変体が、下記の（a)～(x）のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する、請求項１から８いずれかに記載のFc領域改変体。

(a) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(b) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp又はGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(c) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(d) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がGly又はAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(e) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ

酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(f) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目Arg及び332番目のアミノ酸がThrであるアミノ酸配列

(g) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(h) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(i) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(j) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(k) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(l) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(m) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(n) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(o) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がAla又はGly、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(p) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMet又はLeuであるアミノ酸配列

(q) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp、327番目のアミノ酸がGly、330番目のアミノ酸がArg及び396番目のアミノ酸がMetであるアミノ酸配列

(r) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ

酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(s) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(t) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がPro、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(u) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu及び271番目のアミノ酸がGlyであるアミノ酸配列

(v) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、237番目のアミノ酸がAsp、267番目のアミノ酸がGly、268番目のアミノ酸がAsp、271番目のアミノ酸がGly、296番目のアミノ酸がAsp及び330番目のアミノ酸がArgであるアミノ酸配列

(w) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly、272番目のアミノ酸がAsp及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

(x) Fc領域のEUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、233番目のアミノ酸がAsp、264番目のアミノ酸がIle、267番目のアミノ酸がAla、268番目のアミノ酸がGlu、271番目のアミノ酸がGly及び296番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列

[請求項11] 配列番号43～68、配列番号70、配列番号71および配列番号75～77か

ら選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるFc領域改変体。

[請求項12] 請求項１から１１のいずれかに記載の少なくとも２つのFc領域改変体を含むポリペプチドであって、当該２つのFc領域改変体が会合しているポリペプチド。

[請求項13] 前記ポリペプチドに含まれる会合している２つのFc領域改変体が同一のアミノ酸配列である、請求項１２に記載のポリペプチド。

[請求項14] 前記ポリペプチドに含まれる会合している２つのFc領域改変体が異なるアミノ酸配列である、請求項１２に記載のポリペプチド。

[請求項15] 前記会合している２つのFc領域改変体のアミノ酸配列が、Fc領域改変体のEUナンバリング235番目のアミノ酸、236番目のアミノ酸、237番目のアミノ酸、238番目のアミノ酸及び239番目のアミノ酸から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が異なるアミノ酸である、請求項１４に記載のポリペプチド。

[請求項16] 会合している2つのFc領域改変体のいずれか一方のアミノ酸配列が、EUナンバリング235番目のアミノ酸がAsp、Gln、Glu又はThr、236番目のアミノ酸がAsn、237番目のアミノ酸がPhe又はTrp、238番目のアミノ酸がGlu、Gly又はAsn及び239番目のアミノ酸がAsp又はGluから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸を有しているアミノ酸配列である、請求項１５に記載のポリペプチド。

[請求項17] 前記Fc領域改変体を含むポリペプチドがIgG抗体である、請求項１２から１６のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項18] 前記Fc領域改変体を含むポリペプチドがFc融合タンパク質分子である、請求項１２から１６のいずれかに記載のポリペプチド。

[請求項19] 請求項１２から１８のいずれかに記載のポリペプチドを含有する医薬組成物。