明　細　書

発明の名称 ： FcγRIIb特異的Fc抗体

技術分野

[0001] 本発明は、親ポリペプチドと比較して、IgGのFc領域にアミノ酸置換を導入することで、FcγRIIaのうちEUナンバリング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）のいずれの遺伝子多型のFcγRIIa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た該Fc領域を含むポリペプチド、該ポリペプチドを含有する医薬組成物、該ポリペプチドを含有する免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤、及びこれらの製造方法に関する。また、本発明は親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaのうちEUナンバリング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）のいずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対しても結合活性を維持あるいは減少させ、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強させる方法、及び生体に投与された場合に、親ポリペプチドと比較して、抗体の産生を抑制する方法に関する。さらに、本発明は親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaのうち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）のいずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対しても結合活性が維持あるいは減少され、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強されたポリペプチドを製造する方法、及び生体に投与された場合に、親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製造する方法に関する。

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FcγR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したり（非特許文献18）、ループス（lupus）様の症状を呈したり、グッドパスチャー（Goodpasture）シンドローム様の症状を呈したりする（非特許文献19）ことが報告されている。

[0009] また、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B細胞との関与を中心に、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御する役割を果たしていると考えられ、自己免疫疾患、炎症性疾患を制御するための有望な標的分子である。

[0011] 市販の抗体医薬として主に用いられているIgG1は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可能性が考えられる。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す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複合体を形成する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、コラーゲン関節炎モデルにおいて症状を緩和したことが報告されている（非特許文献30)。

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、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レセプターファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性においても重要な役割を果たすことが明らかにされている。具体的にはTNFレセプターファミリーに含まれるCD40、DR4、DR5、CD30、CD137に対する抗体のアゴニスト活性には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32, 33, 34, 35, 36, 37）。非特許文献32 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。

[0013] 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の報告はなされている（非特許文献28）。この文献中では、抗体のFc領域にS267E/L328F、G236D/S267E、S239D/S267E等の改変を加えることで、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）。

FcγRIIbに対する結合がIgG1と比べて増強していたとしても、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38）。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39）。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40, 非特許文献41）。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42）。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、仮にFcγRIIbに対する結合が増強されていたとしても、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。

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43）。抗体の抗原がマクロファージによって貪食されると同時に抗体自身も貪食されることになるが、その場合その抗体由来のペプチド断片も抗原提示され、抗原性が高くなると考えられ、抗体に対する抗体（抗抗体）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、抗体に対する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。

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い、また抗原性が高くなり、抗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。

[0014] このような観点から先のFcγRIIbに対する結合を増強したFc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44、非特許文献 45）。このことから、このFc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。

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、樹状細胞の成熟が自発的に起こることが報告されている（非特許文献46, 非特許文献47）。この報告から、FcγRIIbは炎症などが生じていない定常状態において、積極的に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FcγR

IIb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が求められている。

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48）。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。

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。

[0015] 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49）。そのため、FcγRIIbに対して選択的に結合するFc領域を創製するには、これらの類似する配列を区別し、FcγRIIaの各遺伝子多型に対する結合活性を増加させない、あるいは減少させる一方で、FcγRIIbに対する結合活性を増加させるという、FcγRIIbに対する結合活性を選択的に向上させた性質を抗体のFc領域に付与することが、最も困難な課題であると考えられ、これまでにFcγRIIbに対する十分な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

[0016] 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

[0017] 非特許文献1：Nat Biotechnol, 23(9), 1073-1078, 2005

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

非特許文献3：Chem Immunol, 65, 88-110, 1997

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

非特許文献14：Nature, 368(6466), 70-73, 1994

非特許文献15：Science, 290(5489), 84-89, 2000

非特許文献16：J Immunol, 181(8), 5350-5359 2008

非特許文献17：J Immunol, 163(2), 618-622, 1999

非特許文献18：J Exp Med, 189(1), 187-194, 1999

非特許文献19：J Exp Med, 191(5), 899-906, 2000

非特許文献20：Hum Genet, 117(2-3), 220-227, 2005

非特許文献21：J Biol Chem, 282(3), 1738-1746, 2007

非特許文献22：Arthritis Rheum, 54(12), 3908-3917, 2006

非特許文献23：Nat Med, 11(10), 1056-1058, 2005

非特許文献24：J Immunol, 176(9), 5321-5328, 2006

非特許文献25：J Exp Med, 203(9), 2157-2164, 2006

非特許文献26：J Immunol, 178(5), 3272-3280, 2007

非特許文献27：Blood, 113(16), 3716-3725, 2009

非特許文献28：Mol Immunol, 45(15), 3926-3933, 2008

非特許文献29：J Allergy Clin Immunol, 2012 Jan 16. in press (PMID: 22257644)

非特許文献30：Arthritis Rheum, 62(7), 1933-1943, 2010

非特許文献31：Immunol Lett, 2012 Jan 25. in press (PMID: 22305932)

非特許文献32：Science, 333(6045), 1030-1034, 2011

非特許文献33：Cancer Cell, 19(1), 101-113, 2011

非特許文献34：J Clin Invest, 2012 Feb 13. pii: 61226. doi: 10.1172/JCI61226. in press (PMID: 22326955)

非特許文献35：J Immunol, 171(2), 562-568, 2003

非特許文献36：Blood, 108(2), 705-710, 2006

非特許文献37：J Immunol, 166(8), 4891-4898, 2001

非特許文献38：J Natl Cancer Inst, 99(16), 1232-1239, 2007

非特許文献39：Arthritis Rheum, 48(3), 719-727, 2003

非特許文献40：J Thromb Haemost, 7(1), 171-181, 2008

非特許文献41：J Immunol, 185(3), 1577-1583, 2010

非特許文献42：Sci Transl Med, 2(47), 47-63, 2010

非特許文献43：Mol Cancer Ther, 7(8), 2517-2527, 2008

非特許文献44：J Clin Invest, 97(5), 1348-1354, 1996

非特許文献45：Arthritis Rheum, 41(7), 1181-1189, 1998

非特許文献46：J Clin Invest, 115(10), 2914-2923, 2005

非特許文献47：Proc Natl Acad Sci USA, 102(8), 2910-2915, 2005

非特許文献48：Mol Immunol, 40(9), 585-593, 2003

非特許文献49：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

[0018] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は親ポリペプチドと比較して、IgGのFc領域にアミノ酸置換を導入することで、FcγRIIaのうちEUナンバリング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）のいずれの遺伝子多型のFcγRIIa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た該Fc領域を含むポリペプチド、該ポリペプチドを含有する医薬組成物、該ポリペプチドを含有する免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤、及びこれらの製造方法を提供することにある。また、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaのうちEUナンバリング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）のいずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対しても結合活性を維持あるいは減少させ、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強させる方法、及び生体に投与された場合に、親ポリペプチドと比較して、抗体の産生を抑制する方法を提供することにある。さらに、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaのうち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）のい

ずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対しても結合活性が維持あるいは減少され、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強されたポリペプチドを製造する方法、及び生体に投与された場合に、親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製造する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0019] 本発明者らは、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対して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該Fc領域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、EUナンバリング238番目のProをAspに置換する改変またはEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換する改変を含む抗体Fc領域を含むポリペプチドにおいて、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、H型とR型のいずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対してもFc領域を介した結合活性が低減することを見出した。さらに、EUナンバリング238番目のProをAspに置換する改変およびその他いくつかの改変を含む抗体Fc領域を含むポリペプチドにおいて、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、H型とR型のいずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対してもFc領域を介した結合活性が維持あるいは低減することを見出した。

[0020] すなわち本発明は、以下に関する。

〔１〕 少なくとも一つのアミノ酸が改変された抗体Fc領域を含むポリペプチド変異体であって、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性が維持あるいは減少し、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつ〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）に対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が1.2以上であるポリペプチド。

〔２〕 〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（H型）に対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が4.2以上である、〔１〕に記載のポリペプチド。

〔３〕 〔親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が1.6以上である、〔１〕または〔２〕に記

載のポリペプチド。

〔４〕　〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）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FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性のうち強い方のKD値〕の値が0.7以上である、〔１〕から〔３〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔５〕　親ポリペプチドと比較して、FcγRIIIaに対する結合活性が維持あるいは減少した、〔１〕から〔４〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔６〕　親ポリペプチドと比較して、FcγRIaに対する結合活性が維持あるいは減少した、〔１〕から〔５〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔７〕　アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である、〔１〕から〔６〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔８〕アミノ酸改変が、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換、およびEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナ

ンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、〔１〕から〔７〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔９〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、〔１〕から〔８〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔１０〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがFc融合タンパク質分子である、〔１〕から〔８〕のいずれか一項に記載のポリペプチド。

〔１１〕　抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性を維持あるいは減少し、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

〔１２〕　抗体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であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

〔１３〕　アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、およびEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番

目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、〔１１〕または〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、〔１１〕から〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１５〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがFc融合タンパク質分子である、〔１１〕から〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１６〕　抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性が維持あるいは減少され、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強されたポリペプチドを製造する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換

、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

〔１７〕　抗体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を製造する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

〔１８〕　アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、およびEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナン

バリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、〔１６〕または〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、〔１６〕から〔１８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２０〕　前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがFc融合タンパク質分子である、〔１６〕から〔１８〕のいずれか一項に記載の方法。

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

〔２２〕　〔１〕から〔１０〕、〔２１〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する医薬組成物。

〔２３〕　〔１〕から〔１０〕、〔２１〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する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。

〔２４〕　〔１〕から〔１０〕、〔２１〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤。

〔２５〕　免疫炎症性疾患が自己免疫疾患であって、自己抗原に対する抗体の産生が原因と考えられる疾患である、〔２４〕に記載の治療剤又は予防剤。

〔２６〕　〔１〕から〔１０〕、〔２１〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する疾患治療剤であって、該疾患が生体に必要なタンパク質を欠損する疾患である治療剤。

〔２７〕　〔１〕から〔１０〕、〔２１〕のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する抗ウィルス剤。

また本発明は、本発明の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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチド、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に関する。また本発明は、本発明の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ポリペプチドに関する。また本発明は、本発明の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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチド、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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチドの、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、本発明の抑制方法に使用するための、本発明の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ポリペプチドに関する。また本発明は、本発明の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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチド、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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチドの、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、本発明の治療方法に使用するための、本発明の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ポリペプチドに関する。また本発明は、本発明の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ポリペプチドを対象へ投与する工程を含む、ウィルスの抑制方法に関する。また本発明は、本発明の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もしくは本発明の製造方法により製造されたポリペプチドの、抗ウィルス剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明の抑制方法に使用するための、本発明の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ポリペプチドに関する。

発明の効果

[0021] 本発明によって、親ポリペプチドと比較して、H型とR型のいずれの遺伝子多型のFcγRIIa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たFc領域を含むポリペプチドが提供された。FcγRIIaのいずれの遺伝子多型（H型、R型）に対してもFcγRIIbに対する結合の選択性が増強された該ポリペプチドを用いることにより、R型およびH型のいずれの遺伝子多型を有する患者に対しても、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、抗抗体の産生を抑制できる可能性がある。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]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2]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3]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4]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5]IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4のFc領域を構成するアミノ酸残基と、EUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係を表す。

[図6]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。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（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の値を示す。

[図7]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。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8]Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を表す。

[図9]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を表す。

[図10]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を表す。

[図11]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12]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13]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。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14]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15]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16]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。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、親ポリペプチドと比較して、IgGのFc領域にアミノ酸置換を導入することでFcγRIIaに対する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た該Fc領域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ProのAspへの置換又はEUナンバリング328番目のLeuのGluへの置換を含む抗体Fc領域を含むポリペプチド、およびEUナンバリング238番目ProのAspへの置換といくつかの特定のアミノ酸置換との組み合わせを含む抗体Fc領域を含むポリペプチドを提供する。さらに本発明は親ポリペプチドと比較して、いずれの遺伝子多型のFcγRIIaに対する結合活性を維持あるいは減少させ、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強させる方法を提供する。また本発明は生体に投与された場合に、親ポリペプチドと比較して、抗体の産生を抑制する方法を提供する。

[0024] 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。

[0025] Fcγ受容体（本明細書ではFcγレセプターまたはFcγR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。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。

[0026] 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）。

[0027] 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）。

[0028] 本明細書で「親ポリペプチド」とは、本発明の抗体Fc領域を含むポリペプチドの作製の基礎となるポリペプチドを意味する。即ち、抗体Fc領域を含むポリペプチドであって、該Fc領域における少なくとも一つのアミノ酸が改変される前のポリペプチドであることができる。本発明における親ポリペプチ

ドは、例えば、天然型IgGのFc領域を含むポリペプチドであってもよく、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領域を含むポリプチドであってもよい。

[0029] 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。

[0030] 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Fc領域は図５（配列番号：１１～１４）に示しているが、例えば天然型ヒトIgG1を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG2を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG3を起源とするFc領域、天然型ヒトIgG4を起源とするFc領域を意味する。天然型IgGのFc領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。

[0031] 本発明において、本発明のポリペプチド又はFc領域が各種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。

[0032] 具体的には、Fc領域の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）。

[0033] 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。

[0034] 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。競合する変異Fc領域を含むポリペプチ

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。

[0035] 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。

[0036] FcγRに対する結合活性が減少したポリペプチドとは、親ポリペプチドと親ポリペプチドの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（ポリペプチド変異体ともいう）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と結合するものをいう。

[0037] 例えば、上記の測定法で測定したKD値において、KD値比（ポリペプチド変異体のKD値／親ポリペプチドのKD値）は、好ましくは1.25以上、2以上、3以上である。さらに好ましくは、5以上、10以上、100以上、1000以上、10000以上である。

また、上記の測定法で測定したKD値において、KD値が1μM以上増加していることが好ましく、2μM以上、3μM以上、5μM以上、10μM以上、20μM以上、50μM以上、100μM以上増加していることがさらに好ましい。また、上記の測定法で測定したKD値において、KD値が0.0001μM以上であることが好ましく、0.001μM以上、0.01μM以上、0.1μM以上、0.5μM以上、1μM以上、2μM以上、3μM以上、5μM以上、10μM以上、100μM以上、1000μM以上であることが更に好ましい。

[0038] FcγRに対する結合活性が増強したポリペプチドとは、親ポリペプチドの量とポリペプチド変異体の量を本質的に同じにしてアッセイを行った時に、親ポリペプチドよりも本質的により強い結合活性でFcγRと結合するものをいう。

[0039] 例えば、上記の測定法で測定したKD値において、KD値比（親ポリペプチドのKD値／ポリペプチド変異体のKD値）は、好ましくは1.25以上、2以上、3以上である。さらに好ましくは、5以上、10以上、100以上、1000以上、10000以上である。

また、上記の測定法で測定したKD値において、KD値が0.001μM以上低下していることが好ましく、0.01μM、0.1μM、1μM以上、2μM以上、3μM以上、5μM以上、10μM以上、20μM以上、50μM以上、100μM以上低下していることがさらに好ましい。

また、上記の測定法で測定したKD値において、KD値が5μM以下であることが好ましく、3μM以下、1μM以下、0.5μM以下、0.1μM以下、0.01μM以下、0.001μM以下、0.0001μM以下であることが更に好ましい。

[0040] 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、親ポリペプチドと親ポリペプチドの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（ポリペプチド変異体ともいう）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。

[0041] FcγRIIaに対する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たポリペプチドかどうかは、上記例に従って求めた、当該ポリペプチドのFcγRIIaに対するKD値と当該ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値とを用いることにより判断することが可能である。例えば本発明のポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値が親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値より減少し、本発明のポリペプチドのFcγRIIa（R型、H型）に対するKD値が親ポリペプチドのFcγRIIa（R型、H型）に対するKD値よりも増加している、あるいは維持されている場合である。また上記例に従って求めた、当該ポリペプチドのFcγRIaに対するKD値、FcγRIIIaに対するKD値を適宜組み合わせて判断することも可能である。

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、〔親ポリペプチドのKD値〕／〔ポリペプチド変異体のKD値〕のKD値比が、好ましくは1.6以上、2以上、3以上、さらに好ましくは、5以上、10以上、20以上、30以上、50以上となることを意味する。

また、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性が維持あるいは減少したとは、例えば、上記の測定法で測定したKD値において、〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）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FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性のうち強い方のKD値〕のKD値比が、好ましくは0.

7以上、1以上、2以上、3以上、さらに好ましくは、5以上、10以上、20以上、30以上、50以上となることを意味する。

[0042] 本発明におけるポリペプチドは、FcγRIIa R型及びFcγRIIa H型に対して結合活性が維持あるいは減少していることが好ましい。そしてFcγRIIa R型及びFcγRIIa H型に対して結合活性が維持あるいは減少しFcγRIIIaに対して結合活性が維持あるいは減少していることがより好ましい。さらに、FcγRIaに対しても結合活性が維持あるいは減少していることが好ましい。

FcγRIIIaあるいはFcγRIaに対する結合活性が維持あるいは減少したとは、例えば、上記の測定法で測定したKD値において、〔ポリペプチド変異体のKD値〕／〔親ポリペプチドのKD値〕のKD値比が、好ましくは1以上、2以上、3以上、さらに好ましくは、5以上、10以上、20以上、30以上、50以上となることを意味する。

[0043] また本発明のポリペプチドが、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上したポリペプチドかどうかは、上記例に従って求めた、本発明のポリペプチドの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値比の値が親ポリペプチドに比べて本発明のポリペプチドで大きくなった場合、本発明のポリペプチドは、親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向上したと判断することができる。

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、〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）に対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕のKD値比が、好ましくは1.2以上、2以上、3以上である。さらに好ましくは、5以上、10以上、20以上、30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、〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（H型）に

対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕のKD値比が、好ましくは4.2以上、5以上、10以上である。さらに好ましくは、20以上、30以上、50以上、100以上、200以上である。

[0044] 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。

[0045] 本発明のポリペプチドのFcγRIIa（R型、H型）に対する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たポリペプチドかどうかは、上記例に従って求めた、当該ポリペプチドのFcγRIIaに対する結合量と当該ポリペプチドのFcγRIIbに対する結合量とを用いることにより判断することが可能である。

[0046] 例えば、本発明のポリペプチドのFcγRIIbに対する結合量が親ポリペプチドのFcγRIIbに対する結合量より増加し、本発明のポリペプチドのFcγRIIa（R型、H型）に対する結合量が親ポリペプチドのFcγRIIa（R型、H型）に対する結合量と同等（維持されている）か、好ましくは減少している場合である。また上記例に従って求めた、当該ポリペプチドのFcγRIaに対する結合量、FcγRIIIaに対する結合量を適宜組み合わせて判断することも可能である。

[0047] 「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を含む領域のことをいう。IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリング（本明細書ではEU INDEXとも呼ばれる）（図５参照）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。

[0048] 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。

[0049] 本発明は、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）に対して、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変またはEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変を含むFc領域を含む抗体定常領域を提供する。ヒトIgGにEUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変またはEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変を導入することにより、親ポリペプチドと比較して、FcγRIa、FcγRIIIaおよびFcγRIIaのR型、H型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たポリペプチドを提供することが可能である。

[0050] 本発明は、EUナンバリング238番目のProをAspに置換した改変またはEUナンバリング328番目のLeuをGluに置換した改変を含むヒトIgGに対して、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。ここで改変とは、置換、欠損、付加、挿入のいずれか、又はそれらの組み合わせを意味する。また、これらの改変に加え、更に付加的な改変を含むことができる。付加的な改変は、たとえば、アミノ酸の置換、欠損、あるいは修飾のいずれか、あるいはそれらの組み合わせから選択することができる。例えば、FcγRIIbに対する結合活性を増強し、かつFcγRIIa（H型）およびFcγRIIa（R型）に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。そのような改変を加えることにより、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する。

[0051] これらの中でも、FcγRIIa（R型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましく、さらにFcγRIIa（H型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましい。このような改変として好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリング237番目のGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング238番目のProをPh

eに置換した改変、EUナンバリング325番目のAsnをMetに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをIleに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをAspに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをValに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをMetに置換した改変、EUナンバリング236番目のGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング327番目のAlaをAsnに置換した改変、EUナンバリング325番目のAsnをSerに置換した改変、EUナンバリング235番目のLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング266番目のValをMetに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング235番目のLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング235番目のLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング239番目のSerをGlyに置換した改変、EUナンバリング327番目のAlaをGluに置換した改変、EUナンバリング327番目のAlaをGlyに置換した改変、EUナンバリング238番目のProをLeuに置換した改変、EUナンバリング239番目のSerをLeuに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをThrに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをSerに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをMetに置換した改変、EUナンバリング331番目のProをTrpに置換した改変、EUナンバリング331番目のProをTyrに置換した改変、EUナンバリング331番目のProをPheに置換した改変、EUナンバリング327番目のAlaをAspに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング271番目のProをLeuに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをGluに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをAlaに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをIleに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをGlnに置換した改変、EUナンバリング328番目のLeuをValに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをArgに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをGlyに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング324番目のSerをValに置換した改変、EUナンバリング266番目のValをLeuに置換した改変、EUナンバリング271番目のPro

をGlyに置換した改変、EUナンバリング332番目のIleをPheに置換した改変、EUナンバリング324番目のSerをIleに置換した改変、EUナンバリング333番目のGluをProに置換した改変、EUナンバリング300番目のTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング337番目のSerをAspに置換した改変、EUナンバリング300番目のTyrをGlnに置換した改変、EUナンバリング335番目のThrをAspに置換した改変、EUナンバリング239番目のSerをAsnに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをIleに置換した改変、EUナンバリング239番目のSerをGluに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをPheに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをValに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをTyrに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをAspに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをProに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをHisに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをGlnに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをMetに置換した改変、EUナンバリング266番目のValをIleに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをGluに置換した改変、EUナンバリング300番目のTyrをGluに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをMetに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをValに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをThrに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをSerに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをHisに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをPheに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをProに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをTyrに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをIleに置換した改変、EUナンバリング295番目のGlnをLeuに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング334番目のLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをAlaに置換した改変、EUナンバリング239番目の

SerをAspに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234番目のLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234番目のLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをAlaに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをTyrに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233番目のGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをIleに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをMetに置換した改変、EUナンバリング296番目のTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

[0052] 更に、これらの改変の中でも好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリング237番目のGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをValに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング271番目のProをGlyに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをMetに置換した改変、EUナンバリング239番目のSerをAspに置換した改変、EUナンバリング267番目のSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234番目のLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234番目のLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをAlaに置換

した改変、EUナンバリング237番目のGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237番目のGlyをTyrに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233番目のGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268番目のHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをIleに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323番目のValをMetに置換した改変、EUナンバリング296番目のTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326番目のLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330番目のAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

上記の改変は１箇所であってもよいし、2箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変で好ましい例としては、表６～７、表９～１２に記載の改変が挙げられる。

[0053] また抗体定常領域部分に、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 Chem. 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、PCT/JP2011/077619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。

[0054] 本発明のポリペプチドの好ましい例として、IgG抗体を挙げることができる。抗体として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。

[0055] <置換>

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

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

(b) 標的部位における電荷若しくは疎水性、または

(c)側鎖の大きさ。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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

[0060] 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。

[0061] 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.）。

[0062] <抗体>

さらに、本発明は上述のいずれかに記載のアミノ酸配列が改変されたFc領域を含む抗体を提供する。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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)）。

[0066] 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。

[0067] 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）。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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）。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。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)、Miyajimaら (Annu. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331)、Tagaら (FASEB J. (1992) 6, 3387-3396)、Fantlら (Annu. Rev. Biochem. (1993), 62, 453-481)、

Smithら（Cell（1994）76（6）959-962）、Flower DR.（Biochim. Biophys. Acta（1999）1422（3）207-234）等に記載されている。

[0075] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、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。

[0076] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原であり、癌糖鎖抗原とも呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、上記の受容体としてGPIアンカー型受容体ファミリーに属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。

[0077] MHC抗原は、主にMHC class I抗原とMHC class II抗原に分類され、MHC cla

ss I抗原には、HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G、-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR、-DQ、-DPが含まれる。

[0078] 分化抗原には、CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15s、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD23、CD25、CD28、CD29、CD30、CD32、CD33、CD34、CD35、CD38、CD40、CD41a、CD41b、CD42a、CD42b、CD43、CD44、CD45、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。

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

その他の抗原としては下記のような分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファー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、LECT2、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。

[0080] 可変領域を構成するアミノ酸配列は、その抗原結合活性が維持される限り、１または複数のアミノ酸残基の改変が許容される。可変領域のアミノ酸配列を改変する場合、改変される部位や改変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。

[0081] 例えば、可変領域のN末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である。したがって、本発明

の抗体は、その重鎖のN末端がグルタミンの場合には、それがピログルタミン酸に修飾された可変領域を含む。

[0082] 本発明の抗体の可変領域は、任意の配列であってよく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体、および、これらの非ヒト抗体をヒト化したヒト化抗体、および、ヒト抗体など、どのような由来の抗体の可変領域でもよい。「ヒト化抗体」とは、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR;complementarity determining region）をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である（Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877）。また、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である（欧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、抗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）。

[0083] 抗体の軽鎖定常領域にはκ鎖とλ鎖タイプの定常領域が存在しているが、いずれの軽鎖定常領域であってもよい。さらに、本発明において軽鎖定常領域は、アミノ酸の置換、欠損、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。

[0084] 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。

[0085] また、本発明のポリペプチドは、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。

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。

[0086] 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ドメイン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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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」（GI

BCO 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] さらに本発明は抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対する結合活性が維持あるいは減少され、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強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）抗体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）親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対する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たポリペプチドを選択する工程。

[0103] 好ましい態様としては、抗体Fc領域を含むポリペプチドの製造方法であって、

（ａ）親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対する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。

また本発明は、抗体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）抗体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）で改変されたポリペプチドが生体に投与された場合に、親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。

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。

[0104] 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）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性を維持あるいは減少させるようにすることが好ましく、さらに、FcγRIa又は／及びFcγRIIIaに対する結合活性を減少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領域を含むポリペプチドにおいてEUナンバリング238番目のProがAspに置換またはEUナンバリング328番目のLeuがGluに置換されるように当該ポリペプチドを改変する。別の好ましい態様としては、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換に加えて、さらにEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換

、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換が行われるように当該ポリペプチドを改変する。

[0105] さらに本発明は、親ポリペプチドに比べて、FcγRIIaに対する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。

好ましい態様としては、例えばヒトIgGのFc領域を含むポリペプチドにおい

てEUナンバリング238番目のProがAspに置換またはEUナンバリング328番目のLeuがGluに置換されるように当該ポリペプチドを改変する。別の好ましい態様としては、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換に加えて、さらにEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換が行われるように当該ポリペプチドを改変する。

[0106] さらに本発明は、抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対する結

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た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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] さらに本発明は、抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIaに対する結合活性を維持あるいは減少し、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強する方法を提供する。

また本発明は、抗体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。

[0110] 好ましい態様としては、例えばヒトIgGのFc領域を含むポリペプチドにおいてEUナンバリング238番目のProがAspに置換またはEUナンバリング328番目のLeuがGluに置換されるように当該ポリペプチドを改変する。別の好ましい態様としては、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換に加えて、さらにEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAla

への置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換が行われるように当該ポリペプチドを改変する。

[0111] 上記方法においては、FcγRIIbに対する結合活性を増強させ、かつFcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性を維持あるいは減少させることが好ましく、さらに、FcγRIa又は／及びFcγRIIIaに対する結合活性を維持あるいは減少させることが好ましい。

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。

[0112] <医薬組成物>

本発明は、本発明の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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 上記本発明のポリペプチドは、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。

[0118] 本発明においては、上記本発明のポリペプチドは、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。

[0119] また、上記本発明のポリペプチドは、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。

[0120] また、上記本発明のポリペプチドは、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。

[0121] また、上記本発明のポリペプチドは、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。

[0122] また、上記本発明のポリペプチドは、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。

[0123] 本発明においては、上記本発明のポリペプチドは、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ので、本発明に記載のFc領域を用いたアゴニスト抗体は、癌の治療又は予防に有用である。本発明に記載のFc領域は、Aliases、CD120a、CD120b、Lymphotoxin β receptor、CD134、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、CD30、CD137、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、RANK、Osteoprotegerin、TNFRSF12A、TNFRSF13B、TNFRSF13C、TNFRSF14、Nerve growth factor receptor、TNFRSF17、TNFRSF18、TNFRSF19、TNFRSF21、TNFRSF25、Ectodysplasin A2 receptor等のTNF受容体ファミリーに対するアゴニスト抗体のアゴニスト活性を増強する。また、上記以外のアゴニスト抗体のアゴニスト活性も増強する。癌は次のものを包含するが、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、頭頚部癌、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。。

[0124] また本発明は、本発明の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。

[0125] また本発明は、少なくとも本発明の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ポリペプチドに関する。

[0126] 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

[0127] 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

[0128] 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。

[0129] 〔実施例１〕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。

[0130] 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（配列番号：１７）を利用した。このH鎖をGpH7-B3（配列番号：１８）、L鎖をGpL16-k0（配列番号：１６）と呼ぶ。

[0131] 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、FcγRII

b、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）。

[0132] 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。

[0133] 〔実施例２〕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。

[0134] 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：１９）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：２０）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：２１）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（配列番号：２３）を作製した。また、比較のため非特許文献27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（配列番号：２４）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：２２）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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 〔式１〕

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

[0138] 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

[0139] 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〕

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

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] [表1]

	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)

[0144] 上記表１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。

[0145]

[表2]

	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)

[0146] 表２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。

[0147] また、表２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。

[0148] 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。

[0149] 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３にまとめた。

[0150] [表3]

	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

[0151] 表３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１、２、３、４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。

[0152] また、表２から非特許文献27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。

[0153] 〔実施例３〕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

実施例１および実施例２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：２１）に対して、実施例２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（配列番号：２５）を作製し、IL6R-L （配列番号：２２）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４に示した。

[0154] [表4]

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

[0155] 表４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。

[0156] 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：２１）に対して、実施例２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（配列番号：２６）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５に示した。

P238D改変体に対して、実施例２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５に示した。

[0157] [表5]

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

[0158] 表５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。

[0159] 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。

[0160] 〔実施例４〕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

実施例３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に置換した改変Fc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：２０）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：２７）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（配列番号：２８）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：２２）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。

[0161] 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６)。

[0162] 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６に示す。なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-F11（配列番号：２７）に対して導入した改変を表す。

[0163] [表6]

配列番号	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
28	IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
29	IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
30	IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
31	IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
32	IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
33	IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
34	IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
35	IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
36	IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
37	IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
38	IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
39	IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

[0164] 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、実施例１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７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実施例１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。　実施例３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。

表６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７にまとめた。なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-F11（配列番号：２７）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７に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-F11（配列番号：２７）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表７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。

表７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７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、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-F11と比較して親和性が低下していた。

[表7]

配列番号	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
20	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
27	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
29	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
30	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
31	IL6R-PD079/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
32	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
33	IL6R-PD081/IL6R-L	G237E/P238D	3.4E-07	3.8E-05	2.5E-05	3.6E-06	4.1E-05	10.6	7.0	1.9	5.0
34	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
35	IL6R-PD086/IL6R-L	G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.8E-05	2.6E-06	4.1E-05	6.9	7.1	2.7	3.5
36	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
37	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
38	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
39	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

[0165] 〔実施例５〕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

先の実施例３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。

[0166] 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８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９）。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８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。

[0167]

[表8]

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) Asp 270 OD2 (3.22) Asp 270 OD1 (3.27) Ala 327 CB (3.63)	Val 266 N (3.13)
Arg 131 NH1	Asp 270 CG (3.19) Asp 270 OD2 (2.83) Asp 270 OD1 (2.99) Ser 267 CB (3.56)	Val 266 CG1 (3.47) Val 266 N (3.43) Thr 299 OG1 (3.66) 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)

[0168] 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１０）。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。

[0169] 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１１）。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１２）。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。

[0170] [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：２１）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236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。

[0171] [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。

[0172] [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。

[0173] [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。

[0174] [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。

[0175] ［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。

[0176] [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。

[0177] 〔実施例６〕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

実施例５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に置換した改変Fc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。

[0178] 実施例２で作製したIL6R-G1d（配列番号：２０）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：４０）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（配列番号：４１）を作製した。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：２２）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（FcγRI

a、 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。

[0179] 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１３)。

その結果、図１３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９に示す。なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-B3（配列番号：４０）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。

[0180]

[表9]

配列番号	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
20	IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
40	IL6R-2B999/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
41	IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
42	IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
43	IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
44	IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
45	IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
46	IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
47	IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
48	IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
49	IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
50	IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
51	IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	73	92	83	104	94
52	IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
53	IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
54	IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
55	IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
56	IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
57	IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
58	IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
59	IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
60	IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
61	IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
62	IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
63	IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
64	IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
65	IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

表９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１０にまとめた。表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-B3（配列番号：４０）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１０に示した。ここで親ポリペプチドと

は、IL6R-B3（配列番号：４０）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表１０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。

表１０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１０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FcγRIIaV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。

[表10]

配列番号	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
20	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
40	IL6R-2E999/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
41	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
42	IL6R-2E002/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
43	IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.8E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.8E-05	7.3	42.6	2.9	10.2
44	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
45	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
46	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
47	IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-09	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05	12.7	56.1	3.3	15.3
48	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
49	IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05	11.0	109.4	9.7	4.6
50	IL6R-2E128/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
51	IL6R-2E169/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
52	IL6R-2E171/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
53	IL6R-2E172/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
54	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
55	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
56	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
57	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
58	IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05	8.7	39.5	2.7	12.8
59	IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04	15.5	79.5	2.6	23.5
60	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
61	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
62	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
63	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
64	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
65	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

[0181] 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１４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。

[0182] 図１５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。

[0183] 図１６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。

[0184] 〔実施例７〕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

実施例４、実施例６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。

実施例６の方法と同様に、表６，９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11）。

なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-B3（配列番号：４０）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。

[0185]

[表11]

配列番号	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
20	IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
40	IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
41	IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
66	IL6R-2B253/IL6R-L	E233D/P238D/V323M	155	288	207	156	126
67	IL6R-2B261/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87
68	IL6R-BP062/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	74	126	106	136	87
69	IL6R-BP063/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	91	122	107
70	IL6R-BP064/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	109	203	162	141	106
71	IL6R-BP065/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	19	279	158	152	104
72	IL6R-BP066/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123
73	IL6R-BP067/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158
74	IL6R-BP068/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122
75	IL6R-BP069/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	43	222	186	147	136
76	IL6R-BP129/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	68	111	96	138	95
77	IL6R-BP130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	104	272	224	160	115
78	IL6R-BP131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	33	364	253	160	118
79	IL6R-BP132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	91	191	130	150	120
80	IL6R-BP133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114
81	IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	238	143	133	114
82	IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	64	204	108	121	128
83	IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	152	153
84	IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	203	156	180
85	IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	582	177	209
86	IL6R-BP148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	33	603	462	176	227
87	IL6R-BP149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	173	186
88	IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	30	757	770	183	204
89	IL6R-BP151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	39	705	621	180	221
90	IL6R-BP152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	34	638	548	178	146
91	IL6R-BP176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	102	201	128	147	131
92	IL6R-BP177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	186
93	IL6R-BP178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110
94	IL6R-BP179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	39	570	226	177	125
95	IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	179	100
96	IL6R-BP181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	108	362	150	170	122
97	IL6R-BP182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	95	413	139	173	120
98	IL6R-BP183/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	191	164	113
99	IL6R-BP184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	96	436	131	171	106
100	IL6R-BP185/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	47	670	446	179	191
101	IL6R-BP186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	43	614	368	175	143
102	IL6R-BP187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	68	387	205	157	124
103	IL6R-BP188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	74	636	234	179	121
104	IL6R-BP189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	56	557	183	177	141
105	IL6R-BP190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	50	615	224	181	155
106	IL6R-BP191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
107	IL6R-BP192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	108	406	122	172	118
108	IL6R-BP193/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	113	449	154	173	135
109	IL6R-BP194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	69	672	395	178	249
110	IL6R-BP195/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	68	661	344	181	221
111	IL6R-BP196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	89	402	185	157	137
112	IL6R-BP197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	294	179	206
113	IL6R-BP198/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	104	449	188	164	157
114	IL6R-BP199/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330R	112	172	116	144	103
115	IL6R-BP200/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	60	754	517	188	164
116	IL6R-BP201/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330R	57	696	359	186	121
117	IL6R-BP202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	43	615	285	185	108
118	IL6R-BP203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	35	637	255	185	88
119	IL6R-BP204/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330R	110	301	137	165	121
120	IL6R-BP205/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	97	335	108	167	93
121	IL6R-BP206/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330R	101	362	123	168	92
122	IL6R-BP207/IL6R-L	E233D/P238D/A330R	74	109	103	124	97
123	IL6R-BP208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	81	690	310	188	118
124	IL6R-BP209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	68	625	267	186	153
125	IL6R-BP210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	57	661	279	187	135
126	IL6R-BP211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	126	312	111	165	87
127	IL6R-BP212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	117	363	135	173	122
128	IL6R-BP213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R	118	362	123	169	100
129	IL6R-BP214/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	285	174	165

[0186] 表１１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１２にまとめた。表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-B3（配列番号：４０）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Fc

γRIIaR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１２に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：４０）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表１２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。

表１２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１２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、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-B3と比較して親和性が低下していた。

[0187]

[表12]

配列番号	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)	野生リベプチドのKD(IIb)/改変体リベプチドの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／野生リベプチドのFcgRIIaHおよびFcgRIIaRに対する結合活性のうち強い方のKD値
20	IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	5.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.3
40	IL6R-B8/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
41	IL6R-BF846/IL6R-L	P208D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-06	13.0	33.9	2.6	19.9
66	IL6R-2B253/IL6R-L	E233D/P238D/K326M	1.4E-08	5.0E-06	1.3E-05	4.3E-07	5.0E-06	11.5	30.1	7.2	8.5
67	IL6R-2B281/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	8.0E-09	2.2E-05	3.3E-05	1.0E-06	7.3E-06	21.0	32.4	3.0	28.8
68	IL6R-BP082/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	1.8E-08	1.2E-05	3.7E-05	5.4E-07	8.1E-06	22.8	69.0	5.8	15.8
69	IL6R-BP063/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	3.8E-08	2.3E-05	4.4E-05	7.9E-07	9.0E-06	29.0	55.5	3.9	29.0
70	IL6R-BP084/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
71	IL6R-BP085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	2.5E-07	4.2E-06	2.4E-05	3.2E-07	6.6E-06	13.1	74.5	8.6	5.5
72	IL6R-BP083/IL6R-L	P208D/K326A/A330K	2.7E-06	9.7E-06	3.4E-05	5.7E-07	5.7E-06	17.1	59.9	5.4	12.8
73	IL6R-BP087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	3.5E-08	9.7E-06	2.1E-05	6.1E-07	4.4E-06	16.0	34.7	5.1	12.6
74	IL6R-BP088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	3.3E-07	2.9E-06	2.3E-05	2.2E-07	6.7E-06	13.3	106.5	14.3	3.7
75	IL6R-BP089/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	6.3E-08	6.4E-06	2.0E-05	3.9E-07	5.1E-06	16.6	51.9	8.0	8.3
76	IL6R-BP129/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	2.5E-08	1.5E-05	4.0E-05	5.2E-07	7.5E-06	29.3	77.5	6.0	19.6
77	IL6R-BP130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	1.8E-09	5.3E-06	2.6E-05	3.0E-07	7.1E-06	17.5	85.5	10.2	6.9
78	IL6R-BP131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	1.2E-07	3.1E-06	1.4E-05	2.5E-07	5.8E-06	12.5	56.9	12.6	4.0
79	IL6R-BP132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	1.5E-08	8.0E-06	3.0E-05	3.7E-07	6.8E-06	21.5	81.1	8.4	10.3
80	IL6R-BP133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	1.3E-07	8.6E-06	2.6E-05	5.6E-07	8.2E-06	15.5	46.8	5.6	11.2
81	IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	1.6E-08	5.7E-06	2.7E-05	5.7E-07	6.6E-06	10.0	47.1	5.4	7.5
82	IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	3.7E-08	6.9E-06	3.6E-05	7.9E-07	5.8E-06	8.7	45.8	3.9	8.9
83	IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	1.2E-07	3.4E-06	1.7E-05	3.4E-07	4.5E-06	9.8	49.9	8.1	4.4
84	IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	7.4E-08	2.1E-06	1.8E-05	2.3E-07	3.8E-06	9.3	80.0	13.7	2.7
85	IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	1.4E-07	8.9E-07	5.1E-06	6.6E-08	3.3E-06	13.6	77.7	47.1	1.2
86	IL6R-BP148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	5.6E-08	1.1E-06	7.0E-06	7.5E-08	3.9E-06	14.5	93.8	41.4	1.4
87	IL6R-BP149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	1.2E-07	1.4E-06	3.4E-06	9.3E-08	2.7E-06	15.0	89.9	33.1	1.8
88	IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	3.2E-07	5.5E-07	3.4E-06	3.1E-08	9.4E-06	17.7	109.0	99.0	0.7
89	IL6R-BP151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	8.4E-08	6.7E-07	4.7E-06	4.0E-08	3.1E-06	16.8	117.8	77.4	0.9
90	IL6R-BP152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	7.3E-08	8.1E-07	5.8E-06	4.1E-08	4.8E-06	19.5	135.9	75.0	1.0

91	IL6R-BP179/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	7.3E-09	6.9E-06	3.0E-06	3.6E-07	5.4E-05	19.1	681	0.6		0.9
92	IL6R-BP177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	3.3E-08	7.1E-07	8.2E-06	5.2E-08	5.7E-05	13.6	159.2	60.0		0.3
93	IL6R-BP173/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	4.3E-08	9.3E-07	1.4E-05	5.1E-08	6.4E-05	18.1	272.4	90.1		1.2
94	IL6R-BP179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	6.4E-08	1.4E-06	1.9E-05	8.4E-08	5.0E-05	16.7	190.9	36.9		1.8
95	IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	9.0E-08	1.2E-06	1.9E-05	6.2E-08	7.0E-05	10.6	290.0	48.9		1.5
96	IL6R-BP181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.5E-09	3.2E-06	2.8E-05	1.6E-07	5.7E-05	20.3	162.5	18.3		4.2
97	IL6R-BP182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	1.0E-08	2.6E-06	2.8E-05	1.1E-07	5.6E-05	23.5	256.8	20.3		3.3
98	IL6R-BP183/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	1.7E-08	2.6E-06	1.5E-05	2.4E-07	5.6E-05	10.7	62.5	12.9		3.3
99	IL6R-BP184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	1.1E-08	2.3E-06	3.0E-06	1.3E-07	6.6E-05	18.2	238.1	24.5		3.0
100	IL6R-BP185/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	6.3E-08	9.3E-07	7.3E-06	6.9E-08	3.6E-05	12.6	105.2	44.5		1.1
101	IL6R-BP186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.5E-08	9.8E-07	9.3E-06	6.1E-08	4.8E-05	15.8	152.5	50.7		1.3
102	IL6R-BP187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	2.5E-08	2.8E-06	1.9E-06	2.9E-07	5.6E-05	9.7	62.3	10.7		3.6
103	IL6R-BP188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	2.1E-08	1.0E-06	1.9E-06	4.6E-08	5.0E-05	21.8	350.1	67.6		1.3
104	IL6R-BP189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.2E-08	1.4E-06	2.1E-06	7.4E-08	4.9E-05	18.5	283.8	41.8		1.8
105	IL6R-BP190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.3E-08	1.1E-06	1.7E-06	5.8E-08	4.5E-05	19.3	292.6	53.2		1.5
106	IL6R-BP191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.0E-09	3.0E-06	2.7E-06	1.5E-07	4.9E-05	20.3	184.9	21.2		3.8
107	IL6R-BP192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.6E-09	2.6E-06	3.2E-05	1.1E-07	5.8E-05	23.1	283.2	27.3		3.4
108	IL6R-BP193/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.3E-09	2.2E-06	2.5E-06	1.2E-07	5.2E-05	18.3	206.6	25.5		2.9
109	IL6R-BP194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	2.1E-08	9.2E-07	8.5E-06	5.2E-08	2.7E-05	15.8	163.5	59.4		1.1
110	IL6R-BP195/IL6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	2.3E-08	9.1E-07	1.0E-05	5.0E-08	3.1E-05	18.2	200.8	62.0		1.2
111	IL6R-BP198/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.4E-08	3.9E-06	1.9E-05	2.2E-07	5.1E-05	13.4	85.2	13.9		3.9
112	IL6R-BP197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	1.9E-08	9.8E-07	1.2E-05	5.8E-08	8.3E-05	17.1	206.7	53.7		1.3
113	IL6R-BP199/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.1E-08	2.2E-06	2.0E-06	2.0E-07	4.4E-05	11.0	101.5	15.7		2.9
114	IL6R-BP199/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330R	6.4E-09	8.3E-06	2.8E-06	4.9E-07	6.1E-05	17.5	53.0	6.3		11.1
115	IL6R-BP200/IL6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	3.3E-08	6.3E-07	4.2E-06	3.4E-08	3.8E-05	18.6	123.9	91.2		0.8
116	IL6R-BP201/IL6R-L	P233D/G237D/P238D/P271G/A330R	5.1E-06	8.4E-07	6.9E-06	4.0E-06	6.2E-05	21.0	172.1	7.1		1.1
117	IL6R-BP202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	9.5E-08	1.2E-06	9.2E-06	6.4E-08	5.8E-05	19.2	144.0	48.4		1.8
118	IL6R-BP203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	1.8E-07	9.3E-07	1.1E-05	4.9E-08	7.2E-05	20.5	226.8	63.7		1.3
119	IL6R-BP204/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330R	7.6E-09	4.5E-06	2.1E-06	2.5E-07	5.2E-05	17.0	82.7	12.2		5.8
120	IL6R-BP205/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	7.7E-09	3.5E-06	2.8E-05	1.6E-07	6.8E-05	21.8	176.1	19.4		4.5
121	IL6R-BP206/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330R	8.2E-09	3.1E-06	2.4E-05	2.0E-07	6.9E-05	16.1	123.1	15.8		4.1
122	IL6R-BP207/IL6R-L	E233D/P238D/A330R	2.2E-08	1.9E-05	2.9E-05	8.4E-07	6.5E-05	23.0	34.5	3.7		25.1
123	IL6R-BP208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	1.9E-08	9.5E-07	9.3E-06	3.2E-08	5.3E-05	26.3	256.2	95.4		1.1
124	IL6R-BP209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	3.9E-09	1.2E-06	1.0E-05	5.1E-09	4.1E-05	22.7	195.3	60.4		1.5
125	IL6R-BP210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	6.5E-08	1.0E-06	9.5E-06	3.9E-08	4.6E-05	25.4	241.1	78.4		1.3
126	IL6R-BP211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	4.2E-09	4.1E-06	2.7E-05	2.2E-07	7.3E-05	18.5	120.5	13.8		5.4
127	IL6R-BP212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	5.2E-09	3.5E-06	2.2E-05	1.7E-07	6.2E-05	21.1	133.3	18.7		4.5
128	IL6R-BP213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R	4.1E-08	3.1E-06	2.4E-05	1.8E-07	6.3E-05	17.7	106.4	17.6		4.0
129	IL6R-BP214/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	78.0	26.2		2.2

[0188] 〔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）。

[0189] 〔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。

[0190] 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）。

[0191] 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。

[0192] 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。

[0193] 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。

[0194] 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。

産業上の利用可能性

[0195] 本発明によって、親ポリペプチドと比較して、H型とR型のいずれの遺伝子多型のFcγRIIa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たFc領域を含むポリペプチドが提供された。FcγRIIaのいずれの遺伝子多型（H型、R型）に対してもFcγRIIbに対する結合の選択性が増強された該ポリペプチドを用いることにより、R型およびH型のいずれの遺伝子多型を有する患者に対しても、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] 少なくとも一つのアミノ酸が改変された抗体Fc領域を含むポリペプチド変異体であって、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性が維持あるいは減少し、FcγRIIbに対する結合活性が増強し、かつ〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）に対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が1.2以上であるポリペプチド。

[請求項2] 〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（H型）に対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が4.2以上である、請求項１に記載のポリペプチド。

[請求項3] 〔親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値〕／〔ポリペプチド変異体のFcγRIIbに対するKD値〕の値が1.6以上である、請求項１または２に記載のポリペプチド。

[請求項4] 〔ポリペプチド変異体のFcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）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FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性のうち強い方のKD値〕の値が0.7以上である、請求項１から３のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項5] 親ポリペプチドと比較して、FcγRIIIaに対する結合活性が維持あるいは減少した、請求項１から４のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項6] 親ポリペプチドと比較して、FcγRIaに対する結合活性が維持あるいは減少した、請求項１から５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項7] アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である、請求項１から６のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項8] アミノ酸改変が、EUナンバリング238番目のProのAspへの置換、およ

びEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、請求項１から７のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項9] 前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、請求項１から８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項10] 前記抗体Fc領域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１から８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[請求項11] 抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性を維持あるいは減少し、かつFcγRIIbに対する結合活性を増強する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

[請求項12] 抗体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であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

[請求項13] アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、およびEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの

置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、請求項１１または１２に記載の方法。

[請求項14] 前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、請求項１１から１３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] 前記抗体Fc領域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１１から１３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 抗体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、親ポリペプチドと比較して、FcγRIIa（R型）およびFcγRIIa（H型）に対する結合活性が維持あるいは減少され、かつFcγRIIbに対する結合活性が増強されたポリペプチドを製造する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

[請求項17] 抗体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を製造する方法であって、該アミノ酸改変がEUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、又はEUナンバリング３２８番目のLeuのGluへの置換である方法。

[請求項18] アミノ酸改変が、EUナンバリング２３８番目のProのAspへの置換、およびEUナンバリング237番目のGlyのTrpへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのPheへの置換、EUナンバリング267番目のSerのValへの置換、EUナンバリング267番目のSerのGlnへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAsnへの置換、EUナンバリング271番目のProのGlyへの置換、EUナンバリング326番目のLysのLeuへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGlnへの置換、EUナンバリング326番目のLysのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのMetへの置換、EUナンバリング239番目のSerのAspへの置換、EUナンバリング267番目のSerのAlaへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTrpへの置換、EUナンバリング234番目のLeuのTyrへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAlaへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのAspへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのGluへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのLeuへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのMetへの置換、EUナンバリング237番目のGlyのTyrへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのLysへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのArgへの置換、EUナンバリング233番目のGluのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのAspへの置換、EUナンバリング268番目のHisのGluへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのSerへの置換、EUナンバリング326番目のLysのThrへの置換、EUナンバリング323番目のValのIleへの置換、EUナンバリング323番目のValのLeuへの置換、EUナンバリング323番目のValのMetへの置換、EUナンバリング296番目のTyrのAspへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAlaへの置換、EUナンバリング326番目のLysのAsnへの置換、EUナンバリング330番目のAlaのMetへの置換のグループから選択される少なくとも一つの置換である、請求項１６または１７に記載の方法。

[請求項19] 前記抗体Fc領域を含むポリペプチドがIgG抗体である、請求項１６から１８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] 前記抗体Fc領域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１６から１８のいずれか一項に記載の方法。

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

[請求項22] 請求項１から１０、２１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する医薬組成物。

[請求項23] 請求項１から１０、２１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する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。

[請求項24] 請求項１から１０、２１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する免疫炎症性疾患の治療剤又は予防剤。

[請求項25] 免疫炎症性疾患が自己免疫疾患であって、自己抗原に対する抗体の産生が原因と考えられる疾患である、請求項２４に記載の治療剤又は予防剤。

[請求項26] 請求項１から１０、２１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する疾患治療剤であって、該疾患が生体に必要なタンパク質を欠損する疾患である治療剤。

[請求項27] 請求項１から１０、２１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有する抗ウィルス剤。