(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-540336
(P2024-540336A)
(43)公表日　令和6年10月31日(2024.10.31)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18	ZNA	4B065
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		4C084
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C085
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4H045
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全69頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526745(P2024-526745)
(86)(22)出願日　令和4年11月7日(2022.11.7)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月2日(2024.7.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/080998
(87)国際公開番号　WO2023/079147
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　2115957.9
(32)優先日　令和3年11月5日(2021.11.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　515202863
オスロ ユニヴェルジテットサイケフス ホーエフ
ノルウェー、エヌ－０４２４ オスロ、ニーダレン、ポストボクス ４９５０
(71)出願人　510179537
ウニヴァーシテテット イ オスロ
ノルウェー王国 ０３１６ オスロ，ブリンデルン，ピー．オー． ボックス １０７２
Ｐ．Ｏ． Ｂｏｘ １０７２，Ｂｌｉｎｄｅｒｎ，０３１６ Ｏｓｌｏ Ｎｏｒｗａｙ
(74)代理人　110000040
弁理士法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　アンデルセン、ヤン テリエ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＩｇＡ Ｆｃ－ＩｇＧ Ｆｃタンデム型タンパク質構築物

(57)【要約】
本発明は、ヒトＩｇＡ Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ Ｆｃ領域のＣ末端が、前記ヒトＩｇＧ Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物を提供する。このような構築物は、標的指向化ドメインをさらに含むことができる。前記構築物を含む組成物および前記構築物の治療的使用も提供される。
【選択図】図１

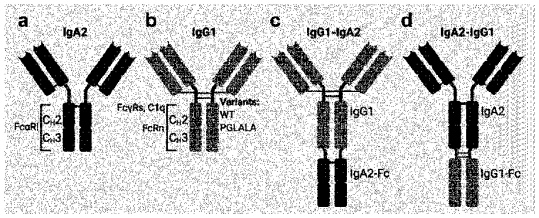


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域とヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域とを含み、前記ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端が、前記ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている、タンパク質構築物。
【請求項２】
前記ＩｇＡ　Ｆｃ領域が、ＩｇＡ１　Ｆｃ領域またはＩｇＡ２　Ｆｃ領域であり、好ましくはＩｇＡ２　Ｆｃ領域である、請求項１に記載のタンパク質構築物。
【請求項３】
前記ＩｇＧ　Ｆｃ領域が、ＩｇＧ　１Ｆｃ領域またはＩｇＧ２　Ｆｃ領域である、請求項１または２に記載のタンパク質構築物。
【請求項４】
前記構築物が、Ｆｃ受容体に結合可能であるか、またはＦｃエフェクター機能が可能である、請求項１から３のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項５】
前記構築物が、ＦｃαＲに結合可能、１種以上のＦｃγＲに結合可能、ＦｃＲｎに結合可能、Ｃ１ｑに結合可能、ＣＤＣを誘導可能、ＡＤＣＣを誘導可能、および／またはＡＤＣＰを誘導可能である、請求項４に記載のタンパク質構築物。
【請求項６】
前記ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端が、リンカーによって、および／または、ＣＨ１ドメインによって、前記ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている、請求項１から５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項７】
前記リンカーが、ペプチドリンカーであり、好ましくは、抗体ヒンジ領域を含むペプチドリンカーである、請求項６に記載のタンパク質構築物。
【請求項８】
前記ＩｇＧ　Ｆｃ領域または前記ＩｇＡ　Ｆｃ領域が、エフェクター機能を強化もしくは血漿中半減期を増加させる変異または改変を含む、請求項１から７のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項９】
前記変異または改変が、Ｆｃ受容体への結合を増加させ、好ましくはＦｃＲｎへの結合を増加させるか、またはＣ１ｑ結合を増加させる、請求項８に記載のタンパク質構築物。
【請求項１０】
前記Ｆｃ領域が、以下を含むことを特徴とする改変ＩｇＧ　Ｆｃ領域である、請求項８または９に記載のタンパク質構築物：
（ｉ）３１１位（またはこれに対応する位置）に、アルギニン（Ｒ）残基、または、リジン（Ｋ）残基等の類似の残基；
（ｉｉ）４２８位（またはこれに対応する位置）に、グルタミン酸（Ｅ）残基、または、アスパラギン酸（Ｄ）残基等の類似の残基；および
（ｉｉｉ）４３４位（またはこれに対応する位置）に、トリプトファン（Ｗ）残基、または、チロシン（Ｙ）残基もしくはフェニルアラニン（Ｆ）残基等の類似の残基。
【請求項１１】
標的指向化ドメイン、好ましくは受容体ドメインもしくは受容体リガンド、または、抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項１２】
前記抗原結合ドメインが、抗体またはその抗原結合断片である、請求項１１に記載のタンパク質構築物。
【請求項１３】
前記抗体が、ＩｇＡ抗体もしくはその抗原結合断片、またはＩｇＧ抗体もしくはその抗原結合断片である、請求項１２に記載のタンパク質構築物。

【請求項１４】
前記標的指向化ドメインが、癌細胞上または感染性病原体上の標的分子に結合する、請求項１１から１３のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項１５】
前記癌細胞が、固形腫瘍もしくは血液癌由来である、または前記感染性病原体が、細菌である、請求項１４に記載のタンパク質構築物。
【請求項１６】
請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物をコードするヌクレオチド配列を含む、１つ以上の核酸分子；または
そのような核酸分子を含む１つ以上の発現ベクター；または
前記発現ベクター、前記核酸分子、もしくは請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物を含む、１つ以上の宿主細胞。
【請求項１７】
請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物の製造方法であって、
（ｉ）請求項１６に記載の、１つ以上の発現ベクターまたは１つ以上の核酸配列を含む宿主細胞を、コードされたタンパク質構築物の発現に適した条件下で培養する工程、および任意選択的に、（ｉｉ）発現されたタンパク質構築物を、前記宿主細胞から、または、増殖培地／上清から、単離または取得する工程、を含む方法。
【請求項１８】
タンパク質産物を精製する工程、および／または、タンパク質産物を少なくとも１つの追加成分を含む組成物へと製剤化する工程をさらに含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物、または請求項１６に記載の１つ以上の核酸分子もしくは発現ベクターを含む、組成物、好ましくは、薬学的に許容可能な組成物。
【請求項２０】
治療における使用のための、請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物。
【請求項２１】
請求項２０に記載の使用のためのタンパク質構築物であって、
前記タンパク質構築物が、標的または抗原に結合する、標的指向化ドメイン、好ましくは受容体ドメインもしくは受容体リガンド、または、抗原結合ドメインを含み、
前記タンパク質構築物が、前記標的または抗原の発現によって特徴付けられる疾患の治療または予防に使用するためのものであり、
好ましくは、前記疾患が、癌であるか、または前記標的もしくは前記抗原を発現する病原体に起因する感染症である、タンパク質構築物。
【請求項２２】
標的または抗原の発現によって特徴付けられる疾患を治療または予防する方法であって、
好ましくは、前記疾患が、癌または前記標的または前記抗原を発現する病原体に起因する感染症であり、
前記方法が、治療有効量の請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、
前記タンパク質構築物が、標的または抗原に結合する標的指向化ドメイン、好ましくは受容体ドメインもしくは受容体リガンド、または標的または抗原に結合する抗原結合ドメインを含む、方法。
【請求項２３】
請求項１から１５のいずれか一項に記載のタンパク質構築物の使用であって、
前記タンパク質構築物が、標的または抗原の発現によって特徴付けられる疾患の治療または予防に使用するための医薬品の製造において、当該標的または抗原に結合する、標的

指向化ドメイン、好ましくは受容体ドメインもしくは受容体リガンド、または抗原結合ドメインを含み、
好ましくは、前記疾患が、癌または前記標的または前記抗原を発現する病原体に起因する感染症である、使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、全体としてタンパク質構築物の分野に関するものであり、より詳細には、タンデムに結合されたＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域とを含むタンパク質構築物の分野に関するものである。本発明はまた、標的指向化ドメインまたは標的指向化リガンド、例えば、抗原結合ドメインをさらに含む、このようなタンパク質構築物に関する。さらに本発明は、このようなタンパク質構築物を含む組成物、このようなタンパク質構築物の製造方法、ならびに、このようなタンパク質構築物を採用した治療方法および使用に関する。
【０００２】
モノクローナル抗体は、ますます広い範囲の疾患の治療に適用されつつあり、２０２０年の承認率は過去２番目に高く、癌を標的とする抗体がその大半を占めている。
【０００３】
例を挙げると、免疫グロブリン（Ｉｇ）Ｇをベースとする治療薬、例えば、ＩｇＧ抗体は、Ｆｃ媒介エフェクター機構により癌細胞を除去し得るが、このような機構としては、古典的なＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）の関与により、それに続く抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および／または抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）等のエフェクター機能を誘導することが挙げられる。さらに、ＩｇＧ抗体は、標的に結合すると補体系をリクルートし、続いて補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導し得る。
【０００４】
これが動機付けとなりＦｃ工学操作戦略が開発され、エフェクター機能を強化したＩｇＧバリアントが創出された。ＩｇＧ抗体を使用するさらなる利点はその血漿中半減期の長さであり、それゆえにＩｇＧ異化の恒常性調節因子として作用する胎児性Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）によって細胞内分解からレスキューされ、生物学的利用能が確保されることである。血漿中半減期は、ＦｃＲｎ結合を向上させるようなＦｃ工学操作により、さらに延長され得る。
【０００５】
しかしながら、最適なエフェクター機能特性および良好な薬物動態の両方に特化した、より強力なフォーマットが必要とされている。
【０００６】
本発明は、ＩｇＡの構造要素とＩｇＧの構造要素とを組み合わせ、ＦｃγＲおよびＦｃαＲの両方に効率的に関与できるように工学操作された抗体フォーマットを提供する。具体的には、驚くべきことに、ＩｇＧ　Ｆｃ領域に結合させたＩｇＡ　Ｆｃ領域であって、当該ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端が当該ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合しているものは、有利なエフェクター機能、ならびに複数のエフェクター分子の効率的な関与を示す。特に、本発明の構築物は、補体活性化における重要な工程であるＣ１ｑへの結合が向上している。加えて、本発明のタンパク質構築物は、効果的なＦｃＲｎ結合により良好な血漿中半減期を示し、それゆえに細胞内分解から効率的にレスキューされる。
【０００７】
さらに本発明では、驚くべきことに、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合された本発明が提供するタンパク質構築物は、逆の配向（ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎ）となるように工学操作された構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合された構築物と比べて、特性が向上することが実証されている。
【０００８】

よって、第一の態様では、本発明は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域、好ましくは、ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域と、ＩｇＧ　Ｆｃ領域、好ましくはヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域とを含むタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されたタンパク質構築物を提供する。

【０００９】

本明細書中で使用するＦｃ領域（またはＦｃ断片もしくはフラグメント結晶化可能領域）という用語は、Ｆｃ受容体と相互作用する能力を有するか、または抗体エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害）をもたらす（または付与する）抗体の一部を含むか、またはこれに該当する。天然に存在するＦｃ領域（またはＦｃ断片）は、抗体のＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインのアミノ酸配列を含有する（またはそれを含むか、もしくはそれからなる）二本の同一鎖で構成される（二量体である）。Ｆｃ断片の二本の鎖は、一般的には、少なくとも１つのシステインブリッジ（システイン残基間のジスルフィド結合）によって、互いに結合されている。

【００１０】

切断、変異導入、もしくは改変されたＦｃ領域（またはＦｃ断片）、例えば、断片Ｆｃ領域またはバリアントＦｃ領域、特に、ＩｇＧ－Ｆｃ領域またはＩｇＡ－Ｆｃ領域の断片またはバリアントを使用してもよく、これらは、例えば、出発材料である（ｓｔａｒｔｉｎｇ）変異導入していない、もしくは野生型のＦｃ領域と比べて、Ｆｃ受容体、例えば、ＦｃＲｎと相互作用する能力および／またはエフェクター機能を付与する能力が、維持される、または存在している、または向上することを条件として含まれている。例を挙げると、ＦｃＲ、例えば、ＦｃＲｎへの結合が向上した適切な変異体、あるいは、向上もしくは増加した半減期または向上もしくは増加したエフェクター機能を有する（または付与する）適切な変異体は、当該技術分野においては周知されかつ報告されており、これらのいずれを使用してもよい。

【００１１】

このように、本発明のタンパク質構築物は、ＩｇＡ抗体のＦｃ領域（またはＦｃ断片）を含む。このようなＩｇＡ　Ｆｃ領域（またはフラグメント結晶化可能領域）は、ＦｃαＲＩ受容体に対する結合能を有する、および／または、適切なＩｇＡ抗体エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害ＡＤＣＣまたは抗体依存性細胞貪食ＡＤＣＰ）をもたらす（または付与する）ことができる。先に概略を述べたように、このようなＦｃ領域は、典型的にはＩｇＡ抗体のＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む。

【００１２】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物において使用されるＩｇＡ　Ｆｃ領域は、尾部（ｔａｉｌｐｉｅｃｅ）が改変（または変異導入、不活性化、もしく切断）されているか、または尾部を含まない（もしくは尾部が除去されている）。

【００１３】

よって、ＩｇＡ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）には、尾部が改変、変異導入、不活性化、切断、または除去されたものが含まれる。しかしながら、このようなＩｇＡ　Ｆｃ領域にも、ＩｇＡ抗体のＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインは依然として含まれる。好ましいＩｇＡ　Ｆｃ領域は、ＩｇＡヒンジ領域の全部または一部をさらに含み、例えば、少なくともＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む二本のポリペプチド鎖を連結するジスルフィド結合の形成に関与する部分および／またはＦｃエフェクター機能に関与する部分をさらに含む。

【００１４】

尾部とは、典型的には、ＩｇＡ重鎖定常領域のＣ末端側終端部（Ｃ－ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｅｎｄ）における１８アミノ酸からなる領域（または伸長部）であるか、または重合（例えば、二量体の形成）に必須のシステイン残基を含むＦｃ領域である。

【００１５】

よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物において、ＩｇＡ尾部は改変、変異導入、不活性化、切断、または除去されている。一部のこのような実施形態では、重合に必須のシステイン残基は、改変、変異導入、不活性化、切断、または除去されて

いる。尾部のこのような除去または改変等は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端とＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端との結合を可能にする上でも好都合である。

【００１６】

ＩｇＡ尾部は、当業者にはよく知られている（例えば、Ｊａｎｅｗａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｉｎ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ，５ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｇａｒｌａｎｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）。ＩｇＡ１尾部の一例は、配列ＰＴＨＶＮＶＳＶＭＡＥＶＤＧＴＣＹ（配列番号３０）によって表すことができる。

【００１７】

典型的には、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む二本のポリペプチド鎖間には、少なくとも１つの結合（好ましくは、少なくとも１つのジスルフィド結合）が存在する。例えば、ＩｇＡ抗体重鎖間には、典型的には、ジスルフィド結合が存在する。

【００１８】

本発明の構築物に使用されるＩｇＡ　Ｆｃ領域は、ＩｇＡ抗体の任意のサブタイプ由来、例えば、ＩｇＡ１由来またはＩｇＡ２由来、好ましくは、ＩｇＡ２由来とすることができる。

【００１９】

よって、本発明は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域がＩｇＡ１　Ｆｃ領域またはＩｇＡ２　Ｆｃ領域、好ましくはＩｇＡ２　Ｆｃ領域であるタンパク質構築物を提供する。

【００２０】

一部の実施形態では、前記ＩｇＡ　Ｆｃ領域を工学操作または改変し、強化または改変された特性、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）もしくは抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）の誘導を含み得るエフェクター機能の強化もしくは改変、あるいは、例えば、ＦｃＲαＩのようなＦｃα受容体への共関与または結合の増加を含むようにしてもよい。これらの特徴を有する（または付与する）適切なＦｃ変異体は、当該技術分野においては周知されかつ報告されており、これらのいずれを使用してもよい。

【００２１】

上述のように、本発明の構築物に使用する適切なＦｃ領域（ＩｇＡ　Ｆｃ領域）は、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む。一部の実施形態では、ＣＨ１ドメインを含ませることができる。しかしながら、他の実施形態では、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメイン（あるいは、ＦｃαＲ、例えば、ＦｃαＲ１と相互作用する能力を保持もしくは有するその断片もしくはバリアント、またはＩｇＡ抗体エフェクター機能および好ましくは二量体化能をもたらすか、もしくは付与するその断片またはバリアント）のみが、構築物に含まれるＩｇＡ抗体の部分である。例えば、一部の実施形態では、軽鎖抗体ドメイン、例えば、ＩｇＡ抗体の軽鎖抗体ドメイン、特に、軽鎖定常ドメイン（ＣＬドメイン）または軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、構築物には含まれないであろう。他の例では、重鎖ＣＨ１ドメインまたは重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、例えば、ＩｇＡ抗体の重鎖ＣＨ１ドメインまたは重鎖可変ドメイン（ＶＨ）は、構築物には含まれないであろう。他の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載されているように、ヒンジ領域、例えば、ＩｇＡヒンジ領域またはＩｇＧヒンジ領域が、構築物に含まれるであろう。ヒンジ領域が含まれる場合、これらのヒンジ領域は、好都合なことに、その本来の位置に含ませることができる、すなわち、例えば、ＩｇＡ　ＣＨ２領域とＣＨ１領域との間（このようなＣＨ１領域が存在する場合）において、当該ＩｇＡ　ＣＨ２領域のＮ末端に連結または結合させることができる。あるいは、このようなヒンジ領域は、本明細書中の他の箇所に記載されているように、構築物のＩｇＡ　ＣＨ２ドメインを標的指向化ドメインに連結させるために使用することができる。

【００２２】

しかしながら、一部の実施形態、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域がＩｇＡ抗体の一部である実施形態では、軽鎖定常ドメイン（ＣＬドメイン）および／または軽鎖可変領域（ＶＬ）、および／または重鎖定常ドメイン（ＣＨ１ドメイン）および／または重鎖可変領域（Ｖ

Ｈ）が含まれるであろう。換言すれば、一部の実施形態では、ＶＬドメインおよび／またはＶＨドメインを任意選択的にＣＬドメインおよび／またはＣＨ１ドメインと共に含む抗原結合ドメインが、構築物中に存在するであろう。好ましい実施形態では、このような抗原結合ドメインは、ＩｇＡ抗体に由来するであろう。他の好ましい実施形態では、このような抗原結合ドメインは、ＩｇＧ抗体に由来するであろう。好ましい実施形態では、ヒンジ領域、例えば、ＩｇＡヒンジ領域またはＩｇＧヒンジ領域を使用して、前記抗原結合ドメイン、例えば、ＣＨ１ドメインにＩｇＡ　ＣＨ２領域を連結させることができる。

【００２３】

好ましい実施形態では、ＩｇＡ　Ｆｃ領域は、ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域である。ＩｇＡ抗体およびＩｇＡ　Ｆｃ領域の定常領域をコードする配列、ならびに、ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインの位置は、当業者であれば容易に入手可能である。例えば、ヒト免疫グロブリン重定常アルファ（ｈｕｍａｎ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　ｈｅａｖｙ　ｃｏｎｓｔａｎｔ　ａｌｐｈａ）１をコードする遺伝子は、ＩＧＨＡ１として知られており（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８７６参照）、ヒト免疫グロブリン重定常アルファ２をコードする遺伝子は、ＩＧＨＡ２として知られている（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８７７を参照）。

【００２４】

例えば、例示的なＩｇＡ１重鎖定常領域アミノ酸配列は、本明細書において配列番号５として記載され、例示的なＩｇＡ２重鎖定常領域アミノ酸配列は、本明細書において配列番号６として記載されており、これらの配列から、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、および／またはＣＨ３ドメインの例示的な配列、適宜、好ましくはＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの例示的な配列を、任意選択的にヒンジ領域と共に構築物に含ませるために得ることができる。例示的な配列を、表１に示している。

【００２５】

ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む本発明のタンパク質構築物の一部の実施形態において、ＩｇＡ　Ｆｃ領域の最後（Ｃ最末端）のアミノ酸残基は、Ｂｕｒナンバリングで４５２位に対応する残基（例えば、Ｂｕｒナンバリングで４５２位におけるＡ）である。表１に示す種々の配列の例示参照。ＢｕｒナンバリングスキームについてはＬｉｕら（Ｓｃｉｅｎｃｅ．１９７６　Ｓｅｐ　１０；１９３（４２５７）：１０１７－２０）に記載されており、これは、本明細書に記載のＩｇＡ分子およびＩｇＡ断片に好適な番号付けシステムである。

【００２６】

本発明のタンパク質構築物は、ＩｇＧ抗体のＦｃ領域（またはＦｃ断片）をさらに含む。このようなＩｇＧ　Ｆｃ領域（またはフラグメント結晶化可能領域）は、ＩｇＧ　Ｆｃγ受容体もしくはＦｃＲｎもしくはＣ１ｑに対する結合能を有し、かつ／または、適切なＩｇＧ抗体エフェクター機能（例えば、ＡＤＣＣもしくはＡＤＣＰ、または補体依存性細胞傷害ＣＤＣ）をもたらす（または付与する）ことができる。先に概略を述べたように、このようなＦｃ領域は、典型的にはＩｇＧ抗体のＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む。

【００２７】

典型的には、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む二本のポリペプチド鎖間には、少なくとも１つの結合（好ましくは、少なくとも１つのジスルフィド結合）が存在する。例えば、ＩｇＧ抗体重鎖間には、典型的には、ジスルフィド結合が存在する。好ましいＩｇＧ　Ｆｃ領域は、ＩｇＧヒンジ領域の全部または一部をさらに含むものであり、例えば、少なくともＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む二本のポリペプチド鎖を連結するジスルフィド結合の形成に関与する部分および／またはＦｃエフェクター機能に関与する部分をさらに含む。

【００２８】

本発明の構築物に使用されるＩｇＧ　Ｆｃ領域は、ＩｇＧ抗体の任意のサブタイプ由来、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４由来とすることができる。一部の実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域またはＩｇＧ２　Ｆｃ領域が使用される。一部の実施形態では、好ましくは、ＩｇＧ１　Ｆｃが使用される。一部の実施形態では、好まし

くは、ＩｇＧ２Ｆｃが使用される。
【００２９】
特定の一実施形態では、ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域が、
（ｉ）ＥＵナンバリングによる３１１位にアルギニン（Ｒ）残基；
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによる４２８位にグルタミン酸（Ｅ）残基；および
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによる４３４位にトリプトファン（Ｗ）残基；
を含み、ＩｇＧヒンジが前記ＩｇＡ２　Ｆｃ領域と前記ＩｇＧ２　Ｆｃ領域との間に位置するタンパク質構築物が提供される。
【００３０】
特定の一実施形態では、ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域が、
（ｉ）ＥＵナンバリングによる３１１位にアルギニン（Ｒ）残基；
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによる４２８位にグルタミン酸（Ｅ）残基；および
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによる４３４位にトリプトファン（Ｗ）残基；
を含み、ヒトＩｇＧ２ヒンジが前記ＩｇＡ２　Ｆｃ領域と前記ＩｇＧ２　Ｆｃ領域との間に位置するタンパク質構築物が提供される。
【００３１】
特定の一実施形態では、ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域が、
（ｉ）ＥＵナンバリングによる３１１位にアルギニン（Ｒ）残基；
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによる４２８位にアスパラギン酸（Ｄ）残基；および
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによる４３４位にトリプトファン（Ｗ）残基；
を含み、ＩｇＧヒンジが前記ＩｇＡ２　Ｆｃ領域と前記ＩｇＧ２　Ｆｃ領域との間に位置するタンパク質構築物が提供される。
【００３２】
特定の一実施形態では、ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ領域が、
（ｉ）ＥＵナンバリングによる３１１位におけるリシン（Ｋ）残基；
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによる４２８位にアスパラギン酸（Ｄ）残基；および
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによる４３４位にトリプトファン（Ｗ）残基；
を含み、ＩｇＧヒンジが前記ＩｇＡ２　Ｆｃ領域と前記ＩｇＧ２　Ｆｃ領域との間に位置するタンパク質構築物が提供される。
【００３３】
特定の一実施形態では、ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域およびヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域を含み、前記ヒトＩｇＡ２　Ｆｃ領域のＣ末端が前記ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されているタンパク質構築物であって、前記ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域が、
（ｉ）ＥＵナンバリングによる３１１位にアルギニン（Ｒ）残基；
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによる４２８位にグルタミン酸（Ｅ）残基；
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによる４３４位にトリプトファン（Ｗ）残基；および
（ｉｖ）ＥＵナンバリングによる４３５位にヒスチジン（Ｈ）残基；
を含み、ＩｇＧヒンジが前記ＩｇＡ２　Ｆｃ領域と前記ＩｇＧ３　Ｆｃ領域との間に位置するタンパク質構築物が提供される。
【００３４】
上述の具体的な実施形態の全てにおいて、ＩｇＧ２領域またはＩｇＧ３領域の代わりに、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域を対応する変異と共に使用してもよい。

【００３５】
よって、本発明は、前記ＩｇＧ　Ｆｃ領域がＩｇＧ１　Ｆｃ領域またはＩｇＧ２　Ｆｃ領域であり、好ましくはＩｇＧ１　Ｆｃ領域であるタンパク質構築物を提供する。
【００３６】
一部の実施形態では、前記ＩｇＧ　Ｆｃ領域を工学操作または改変し、強化または改変された特性、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）もしくは抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を含み得るエフェクター機能の強化もしくは改変、または半減期の増加もしくはＦｃγ受容体への共関与または結合の増加を含むようにしてもよい。
【００３７】
上述のように、本発明の構築物に使用する適切なＦｃ領域（ＩｇＧ　Ｆｃ領域）は、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む。ＣＨ１ドメインは、一般的にはＩｇＧ　Ｆｃ領域の一部として含まれないであろう。しかしながら、一部の実施形態では、ＣＨ１ドメイン、例えばＩｇＧ　ＣＨ１ドメインを、例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインのＮ末端に位置するように本発明の構築物に含ませることができ、例えば、当該構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域との間に位置するように含ませることができる。しかしながら、他の実施形態では、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメイン（あるいは、ＦｃｇＲまたはＦｃＲｎまたはＣ１ｑと相互作用する能力を保持もしくは有するその断片またはバリアント、またはＩｇＧ抗体エフェクター機能および好ましくは二量体化能をもたらすか、もしくは付与するその断片またはバリアント）のみが、構築物に含まれるＩｇＧ抗体の部分である。他の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載されているように、ヒンジ領域、例えば、ＩｇＧヒンジ領域が、構築物に含まれるであろう。ヒンジ領域が含まれる場合、これらのヒンジ領域は、好都合なことに、その本来の位置に含ませることができる、すなわち、本発明のタンデム型構築物中の、例えば、ＩｇＧ　ＣＨ２領域とＩｇＡ　ＣＨ３領域との間において、当該ＩｇＧ　ＣＨ２領域のＮ末端に連結または結合させることができる。したがって、好ましくは、このようなヒンジ領域は、当該構築物のＩｇＧ　ＣＨ２ドメインを当該構築物のＩｇＡ　ＣＨ３ドメインに連結するために使用することができる。換言すれば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域をＩｇＡ　Ｆｃ領域に連結するために使用することができる。
【００３８】
しかしながら、一部の実施形態、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域が抗原結合ドメインに結合される実施形態では、軽鎖定常ドメイン（ＣＬドメイン）および／または軽鎖可変領域（ＶＬ）、および／または重鎖定常ドメイン（ＣＨ１ドメイン）および／または重鎖可変領域（ＶＨ）を含ませることができる。換言すれば、一部の実施形態では、構築物中に、ＶＬドメインおよび／またはＶＨドメインを任意選択的にＣＬドメインおよび／またはＣＨ１ドメインと共に含む抗原結合ドメインが存在するであろう。一部の実施形態では、このような抗原結合ドメインは、ＩｇＧ抗体由来のものとすることができる。
【００３９】
好ましい実施形態では、ＩｇＧ　Ｆｃ領域は、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域である。ＩｇＧ抗体およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の定常領域をコードする配列、ならびに、ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインの位置は、当業者であれば容易に入手可能である。例えば、ヒト免疫グロブリン重定常ガンマ（ｈｕｍａｎ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　ｈｅａｖｙ　ｃｏｎｓｔａｎｔ　ｇａｍｍａ）１をコードする遺伝子は、ＩＧＨＧ１として知られ（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８５７を参照）、ヒト免疫グロブリン重定常ガンマ２をコードする遺伝子は、ＩＧＨＧ２として知られ（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８５９を参照）、ヒト免疫グロブリン重定常ガンマ３をコードする遺伝子は、ＩＧＨＧ３として知られ（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８６０を参照）、ヒト免疫グロブリン重定常ガンマ４をコードする遺伝子は、ＩＧＨＧ４として知られている（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔ：Ｐ０１８６１を参照）。
【００４０】

例えば、例示的なＩｇＧ１重鎖定常領域アミノ酸配列は、配列番号１として本明細書に記載され、例示的なＩｇＧ２重鎖定常領域アミノ酸配列は、配列番号２として本明細書に記載され、例示的なＩｇＧ３重鎖定常領域アミノ酸配列は、配列番号３として本明細書に記載され、例示的なＩｇＧ４重鎖定常領域アミノ酸配列は、配列番号４として本明細書に記載されており、これらの配列から、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、および／またはＣＨ３ドメインの例示的な配列を適宜、好ましくはＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの例示的な配列を、任意選択的にヒンジ領域と共に、構築物に含ませるために得ることができる。例示的な配列を、表１に示している。グリコシル化パターンおよび／または安定性が改変された工学操作ＩｇＧ重鎖定常領域およびＩｇＧ　Ｆｃバリアントもまた、周知である。前記周知のＥＵナンバリングスキームは、本明細書に記載のＩｇＧ分子およびＩｇＧ断片に好適な番号付けシステムである。

【００４１】

本発明の構築物では、Ｆｃ領域の配向（ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎ）が重要である。このため、ＩｇＡ　Ｆｃ領域は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に配置されている。具体的には、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端が、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている、すなわち、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を構成する２つのポリペプチドの各々のＣ末端またはＣ末端側終端部が、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を構成する２つのポリペプチドの各々のＮ末端またはＮ末端側終端部（Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｅｎｄ）に結合されている。ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に、直接、すなわち、リンカーなしで、結合させることができる。ただし、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に、間接的に、すなわち、以下に記載されているようなリンカーを用いて結合することが可能である。

【００４２】

本発明の構築物において、ＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域は、いずれも各Ｆｃ領域の機能性が少なくとも保持されるように、好ましくは、向上されるように配置されている。比較のための適切な分子および構築物は、当業者に周知であろう。例を挙げると、保持または向上については、例えば、適切な全長ＩｇＧ抗体または全長ＩｇＡ抗体（例えば、図１ａまたは１ｂ参照）におけるＩｇＡ　Ｆｃ領域単独またはＩｇＧ　Ｆｃ領域単独との比較、あるいは、ＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域の配向が逆である以外は本発明のタンパク質構築物と同等であるタンパク質構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物との比較で判断することができる。このような分子の一例を、図１ｃに示している。

【００４３】

よって、本発明の構築物は、例えばＦｃαＲもしくはＦｃγＲ等の適切なＦｃＲ、またはＦｃＲｎに結合可能であり、かつ／または、Ｆｃエフェクター機能、例えば、ＡＤＣＣ誘導能、ＣＤＣ誘導能、およびＡＤＣＰ誘導能から選択される１つ以上のＦｃエフェクター機能が可能である。当該技術分野において周知であり記載されているように、ＡＤＣＣ誘導能およびＡＤＣＰ誘導能は、このような機能を発揮できる様々な種類の細胞上の適切なＦｃＲ、例えば、ＡＤＣＰの場合にはマクロファージ上、ＡＤＣＣに関してはＰＭＮ細胞またはＮＫ細胞上の適切なＦｃＲに適切なＦｃ領域が結合することによって生じる。ＣＤＣ誘導能は、一般的には、Ｆｃ領域がＣ１複合体の成分、好ましくはＣ１ｑに結合することによって起こる。ＦｃＲｎへの結合能は、血漿中半減期にとって重要である。

【００４４】

よって、本発明の構築物は、ＦｃＲに結合可能であるか、またはＦｃエフェクター機能が可能である。例を挙げると、前記構築物は、各種ＦｃαＲ、例えば、Ｆｃα１、各種ＦｃγＲ、例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩｃ、ＦｃγＲＩＩＩａ、もしくはＦｃγＲＩＩＩｂの１つ以上、および／またはＦｃＲｎへの結合が可能である。これに代わるものとして、またはこれに加えて、前記構築物は、ＣＤＣ誘導、ＡＤＣＣ誘導、および／またはＡＤＣＰ誘導が可能である。ＣＤＣを誘導するために、本発明の好ましい構築物は、Ｃ１ｑに結合可能である。

【００４５】

好ましくは、ＩｇＡ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）を含む本発明のタンパク質構築物は、ＦｃαＲ（例えば、ヒトＦｃαＲ）に対する結合能を有するか、または保持する。ＦｃαＲは、ＦｃαＲＩまたはＣＤ８９とも称される。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、ＦｃαＲＩの組換えバージョン（例えば、組換えヒトＦｃαＲＩ）に対する結合能を有する。例えば、多形核白血球（ＰＭＮ）上に発現されたＦｃαＲＩに結合する（またはＦｃαＲＩと架橋する）本発明のタンパク質構築物中のＩｇＡ　Ｆｃ領域は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）をもたらし得る。よって、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃαＲＩへの結合能に有意に影響を及ぼさないことが好ましい。本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃαＲＩへの結合能に有意に影響を及ぼさない、または当該結合能を低下させないことを、本明細書中で報告している（実施例１参照）。換言すれば、本発明の構築物は、ＦｃαＲＩに結合する（または、結合したままでいる）ことができる。

【００４６】

よって、一部の実施形態では、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む本発明のタンパク質構築物は、対照タンパク質のＦｃαＲＩへの結合能と比べて、有意に変化していない（もしくは変化していない）か、または実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）か、または向上したのＦｃαＲＩへの結合能を有し、前記対照タンパク質は、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＡ抗体であり、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される、ＩｇＡ１抗体もしくはＩｇＡ２抗体（図１ａ参照）等の適切なサブタイプの全長ＩｇＡ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）であるか、または、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を当該構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含まないことである。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物はＩｇＡ抗体を含み、一方、例示的な対照タンパク質は、同一のＩｇＡ抗体を含み、唯一の相違点（本発明のタンパク質と比べて）が、当該対照タンパク質が本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００４７】

適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。

【００４８】

機能的に有効となるようなＦｃαＲＩとの結合レベル、例えば、Ｆｃエフェクター機能、例えば、ＡＤＣＣを可能にするレベルでのＦｃαＲＩとの結合が所望される。本発明のタンパク質構築物のＦｃαＲＩへの結合能は、任意の適切な方法またはアッセイにより評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＦｃαＲＩ結合に関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイが使用される。本発明のタンパク質構築物のＦｃαＲＩ結合を決定するために特に好ましいアッセイが、本明細書の実施例１に記載されている。

【００４９】

ＩｇＧ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）を含む本発明のタンパク質構築物は、ＦｃγＲ（例えば、ヒトＦｃγＲ）への結合能を有する、または保持することが好ましい。白血球上に見られるヒトＩｇＧの受容体には、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩｃ（ＣＤ３２）、およびＦｃγＲＩＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩｂ（ＣＤ１６）の３つのクラスが存在するが、本発明のタンパク質構築物は、これらＦｃγ受容体の１つ以上に対する結合能、または好ましくは全てに対する結合能を有する。一部の実施形態において、本発明のタンパク質構築物は、ＦｃγＲの組換えバージョン（例えば

、組換えヒトＦｃγＲ）に対する結合能を有する。例えば、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、または好酸球等のエフェクター細胞上に発現したＦｃγＲに結合する（または当該ＦｃγＲと架橋する）本発明のタンパク質構築物中のＩｇＧ　Ｆｃ領域は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）をもたらし得る。よって、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃγＲへの結合能に有意に影響を及ぼさないことが好ましい。

【００５０】

本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃγＲへの結合能を、例えば、適切なサブタイプ（例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される）の全長ＩｇＧ抗体と比べて、有意に低下させないことを本明細書中で報告している（実施例１および実施例２参照）。前記３つのクラスのＦｃγＲのそれぞれに対する結合が試験されているが、本発明の構築物は、これらの１つ以上に対して良好な結合を示す。具体的には、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ（Ｒ１３１バリアントおよびＨ１３１バリアントの両方）、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩＩａ（Ｆ１５８バリアントおよびＶ１５８バリアントの両方）、およびＦｃγＲＩＩＩｂへの結合が試験されている。いずれの場合でも、ＦｃγＲに対する結合は、適切な全長ＩｇＧ抗体による当該結合と少なくとも同等である。驚くべきことに、一部の例では、具体的には、本発明の構築物のＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ（Ｒ１３１バリアントおよびＨ１３１バリアントの両方）、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩａ－Ｖ、およびＦｃγＲＩＩＩｂへの結合は、全長ＩｇＧ抗体による当該結合と比べて、向上（増加）しているか、または優れている。さらに、一部の例では、本発明の構築物の結合は、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物の結合と比べて、向上（増加）しているか、または優れている。

【００５１】

ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩａを発現し、ＩｇＧ抗体の架橋時にＡＤＣＣを媒介する主要な細胞集団であると考えられている。よって、本発明の構築物の向上したＦｃγＲＩＩＩａ結合能は、ＮＫ細胞への結合能の向上を可能にし、これにより効率的にＡＤＣＣを媒介するという点で特に有利と考えられる。

【００５２】

よって、一部の実施形態では、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む本発明のタンパク質構築物は、対照タンパク質の同等のＦｃγＲへの結合能と比べて、有意に変化していない（もしく変化していない）か、または実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）か、または向上（または増加）したのＦｃγＲへの結合能を有し、前記対照タンパク質は、例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＧ抗体であり、例えば、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、もしくはＩｇＧ４抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）であるか、または、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を当該構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＡ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００５３】

適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。

【００５４】

機能的に有効となるようなＦｃγＲとの結合レベル、例えば、上述のＦｃγＲのいずれかとの結合レベル、例えば、Ｆｃエフェクター機能、例えば、ＡＤＣＣを可能にするレベルでのＦｃγＲとの結合が所望される。本発明のタンパク質構築物のＦｃγＲへの結合能は、任意の適切な方法またはアッセイにより評価すればよく、当業者であれば適切なアッ

セイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＦｃγＲ結合に関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイが使用される。本発明のタンパク質構築物のＦｃγＲ結合を決定するための特に好ましいアッセイが、本明細書の実施例１に記載されている。

【００５５】

ＦｃＲｎはＩ型膜糖タンパク質であり、主としてエンドソーム等の酸性細胞内区画に発現する。ＦｃＲｎの既知の役割の一つは、エンドサイトーシス後にＩｇＧまたはアルブミン等の特定の分子を血清に戻すリサイクルにおける役割である。例えば、ＦｃＲｎはＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインの界面で、ＩｇＧのＦｃ領域と２：１の化学量論比で相互作用する（すなわち、１分子のＩｇＧ－Ｆｃが２分子のＦｃＲｎに結合する）。リサイクルは、ＩｇＧ－ＦｃのＦｃＲｎに対するｐＨ依存性の結合によって促進される。これに関し、ＩｇＧ－ＦｃはｐＨ６．０または６．５では高親和性でＦｃＲｎに結合するが、ｐＨ７．４では結合しない。このように、ＦｃＲｎは酸性化エンドソーム内で（ＩｇＧ－Ｆｃ領域を介して）ＩｇＧに結合するが、その後、生理的／中性ｐＨにおけるＦｃＲｎからのＩｇＧの解離が、例えば、ＦｃＲｎ－ＩｇＧ複合体を含むリサイクリングエンドソームが細胞膜と融合してＩｇＧを血清中に放出して戻す際に起こる。この機構により、ＩｇＧはリソソーム分解を回避し得るものであり、ＦｃＲｎを介したリサイクルが、循環におけるＩｇＧの長い半減期（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４の血清中半減期は約２１日であり、ＦｃＲｎとの結合効率がこれらより低いＩｇＧ３の血清中半減期は約７日である）の原因であると考えられている。ＩｇＡ抗体のＦｃ領域は、ＦｃＲｎへの結合能が良好でなく、このことが、比較的短い血清中半減期（約１日）の一因と考えられている。

【００５６】

好ましくは、ＩｇＧ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）を含む本発明のタンパク質構築物は、ＦｃＲｎ（例えば、ヒトＦｃＲｎ）に対する結合能、好ましくはｐＨ依存性の結合能を有するか、または保持する。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、ＦｃＲｎの組換えバージョン（例えば、組換えヒトＦｃＲｎ）に対する結合能を有する。本明細書中の他の箇所に記載されているように、ＩｇＧ　Ｆｃ領域はＦｃＲｎと結合するが、このことは、ＩｇＧ抗体が、ｐＨ依存性機構により分解からレスキューされ、比較的長い血清中半減期を有することを意味する。よって、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃＲｎに対するｐＨ依存性の結合能に有意に影響を及ぼさないことが好ましい。本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のＦｃＲｎへの結合能に対し、例えば、適切なサブタイプ（例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される）の全長ＩｇＧ抗体と比べて有意に影響を及ぼさない、または低下させないことを本明細書中で報告している（実施例１参照）。

【００５７】

よって、一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、ＦｃＲｎに対する好ましくはｐＨ依存性の結合能を有する。より具体的には、好ましくは、本発明のタンパク質構築物は、酸性ｐＨ（例えば、ｐＨ５．５）ではＦｃＲｎへの結合能を有するが、中性のｐＨ（例えば、ｐＨ７．４）ではＦｃＲｎへの有意な結合能（または結合能）を有さない（あるいは、有意な結合もしくは結合を示さない、または有意に低下した結合を示す、または弱親和性もしくは低親和性の結合を示す）。驚くべきことに、本発明者らは、本発明の構築物のＦｃＲｎへの結合能が、全長ＩｇＧ抗体の結合と比べて、向上（もしくは増加）しているか、または優れていることを示した（実施例１参照）。また、本発明の構築物のＦｃＲｎへの結合は、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物の結合と比べて、向上（もしくは増加）しているか、または優れていることが示されている。一部の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載されているようなＲＥＷ変異を含むことで、ＦｃＲｎ結合をさらに向上させることができる。

【００５８】

よって、一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎに対する結合能、好ましくはｐＨ依存性のＦｃＲｎに対する結合能は、対照タンパク質のＦｃＲｎへの結合能と比べて、有意に変化していない（もしく変化していない）か、または実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）か、または向上（増加）しており、前記対照タンパク質は、例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＧ抗体であり、例えば、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）であるか、または、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を当該構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＡ　Ｆｃ領域を含まないことである。適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。

【００５９】

機能的に有効となるようなＦｃＲｎとの結合レベル、例えば、構築物のリサイクルを可能にするレベル、および／または同等もしくは向上した血清中半減期を可能にするレベルでのＦｃＲｎへの結合が所望される。本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎとの結合能は、任意の適切な方法またはアッセイによって評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＦｃＲｎ結合に関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイが使用される。典型的には、そして好ましくは、ＦｃＲｎ結合のｐＨ依存性を評価するために、並列ＥＬＩＳＡアッセイを実施し、中性ｐＨ（例えばｐＨ７．４）でのアッセイと酸性ｐＨ（例えばｐＨ５．５）でのアッセイを行ってもよい。本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎ結合を決定するための特に好ましいアッセイが、本明細書の実施例１に記載されている。

【００６０】

好ましくは、本発明のタンパク質構築物は、ＦｃＲｎに依存して（またはＦｃＲｎの媒介によって）リサイクルされ、細胞内分解から（例えば、リソソーム分解から）レスキューされ得る。本明細書中の他の箇所に記載されているように、ＩｇＡ抗体は、典型的にはインビボ半減期が短い（例えば、約１日の半減期）という問題を有する。本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることにより、ＩｇＡ抗体（またはＩｇＡ　Ｆｃ領域が存在するか、当該ＩｇＡ　Ｆｃ領域が唯一のＦｃ領域である他の構築物）に対し、ＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能を付与（または能力を強化、もしくは能力を増加）できることを本明細書中で実証している（実施例１参照）。

【００６１】

加えて、本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、ＩｇＧ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）を含む当該構築物の、ＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能を低下させないことを本明細書中で実証している（実施例１参照）。実際、本発明者らは、ＦｃＲｎを介した本発明の構築物のリサイクルおよびレスキューは、適切な全長ＩｇＧ抗体、例えば、ＩｇＧ１抗体のリサイクルおよびレスキューと少なくとも同等であることを示している。驚くべきことに、ＦｃＲｎを介した本発明の構築物のリサイクルおよびレスキューは、全長ＩｇＧ抗体のリサイクルおよびレスキューと比べて向上（増加）しているか、または優れていることが示されている。また、ＦｃＲｎを介した本発明の構築物のリサイクルおよびレスキューは、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物のリサイクルおよびレスキューと比べて、向上（増加）しているか、または優れていることが示されている。理論に制約されることを望むものではないが、ＦｃＲｎに結合し、リサイクルおよびレスキ

ューされるこの能力が、（本明細書中の他の箇所にも記載されているように）本発明のタンパク質構築物において観察されるインビボ半減期の増加の原因であると考えられる。

【００６２】

好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能は、対照タンパク質のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能と比べて、維持されているか、または有意に変化していない（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ含有対照タンパク質と比べて）か、または増加（好ましくは有意に増加）している。

【００６３】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能は、対照タンパク質のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能と比べて、例えば、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも１１倍、少なくとも１２倍、少なくとも１３倍、少なくとも１４倍、または少なくとも１５倍増加している（例えば、最大１．５倍、最大２倍、最大３倍、最大４倍、最大５倍、最大６倍、最大７倍、最大８倍、最大９倍、最大１０倍、最大１１倍、最大１２倍、最大１３倍、最大１４倍、最大１５倍、最大２０倍、最大５０倍、または最大１００倍の増加があり、１．２倍または１．５倍～１００倍の増加、１．２倍または１．５倍～５０倍の増加、１．２倍または１．５倍～２０倍の増加、１．２倍または１．５倍～１０倍の増加、３倍～１００倍の増加、３倍～５０倍の増加、３倍～２０倍の増加、３倍～１０倍の増加、５倍～１００倍の増加、５倍～５０倍、５倍～２０倍、または５倍～１０倍の増加、１０倍～１００倍の増加、１０倍～５０倍、１０倍～２０倍、または１０倍～１５倍の増加等が挙げられる）。

【００６４】

リサイクルおよびレスキューにおける増加が達成される場合、適切な対照タンパク質は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＡ抗体であり、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される、ＩｇＡ１抗体またはＩｇＡ２抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＡ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）であるか、または、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、このような対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含んでいないことである。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物はＩｇＡ抗体を含み、一方、例示的な対照タンパク質は、同一のＩｇＡ抗体を含むが、唯一の相違点（本発明のタンパク質と比べて）が、当該対照タンパク質が本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００６５】

あるいは、リサイクルおよびレスキューにおける増加が達成される場合や、またはリサイクルおよびレスキューの維持が観察される場合、例えば、リサイクルおよびレスキューが有意に変化していない（もしくは変化していない）か、もしくは対照タンパク質のリサイクル能およびレスキュー能と実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）場合には、適切な対照タンパク質は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であってもよく、例えば、ＩｇＧ抗体であり、例えば、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）であるか、または、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物であってもよい。好ましくは、対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当

該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＡ　Ｆｃ領域を含まないことである。
【００６６】
適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。
本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能は、任意の好適なアッセイまたは方法で決定したものであればよく、当業者であれば好適なアッセイまたは方法に通じているであろう。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクルおよびレスキューに関するものであってもよい。
【００６７】
一部の実施形態では、ＦｃＲｎ依存性機構を介してリサイクルおよびレスキューされる本発明のタンパク質の能力は、ヒト内皮細胞に基づくリサイクルアッセイ（ＨＥＲＡ）において決定（または評価）されたものである。このようなＨＥＲＡを使用して、本発明のタンパク質構築物の、ＦｃＲｎに対するｐＨ依存性の結合能を評価することも可能である。好適なＨＥＲＡは、当該技術分野で公知である（例えば、Ｇｒｅｖｙｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９（１）：６２１）。本発明のタンパク質構築物のＦｃＲｎ依存性機構を介したリサイクル能およびレスキュー能を決定するための例示的なＨＥＲＡが、本明細書の実施例１に記載されている。
【００６８】
典型的には、そして好ましくは、本発明のタンパク質構築物は、治療上有用なインビボ半減期（例えば、哺乳動物での循環、好ましくは、ヒトでの循環における治療上有用な半減期、または、治療上有用な血清中半減期もしくは治療上有用な血漿中半減期）を有する。ＩｇＡ抗体は、典型的には、インビボ半減期が短い（例えば、約１日の半減期）という問題を有する。本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のインビボ半減期を有意に低下させないことを本明細書中で実証している（実施例１参照）。実際、本発明の構築物によれば、ＩｇＡをベースとするタンパク質、例えば、ＩｇＡ抗体（例えば、全長、例えば、野生型のＩｇＡ１またはＩｇＡ２抗体）またはＩｇＡをベースとする抗体（例えばＩｇＡ１またはＩｇＡ２に基づく抗体）のインビボ半減期が有意に延長される（または増加する）ことが示されている。
【００６９】
これは、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含むＩｇＡ抗体またはタンパク質構築物、特に、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を唯一のＦｃ領域として含むＩｇＡ抗体またはタンパク質構築物であって、当該ＩｇＡ　Ｆｃ領域がなければ、その短い半減期のためにインビボでの（例えば、治療目的の）使用はできない（または、使用に最適ではない）可能性がある構築物でも、本発明に従ってそれらを調製またはタンパク質構築物に組み込むことによりその半減期が延長するように改変できるという有利な特性である。
【００７０】
加えて、本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、当該構築物のインビボ半減期を有意に低下させないことを、本明細書中で実証している（実施例１参照）。実際、本発明者らは、本発明の構築物のインビボ半減期は、適切な全長ＩｇＧ抗体、例えば、ＩｇＧ１抗体のインビボ半減期と比べて有意な差はない、または同等である（もしくは、若干短いだけである）ことを示した。さらに、本発明の構築物のインビボ半減期は、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物のインビボ半減期と比べて、向上（増加）しているか、または優れていることが示されている。一部の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載されているようなＲＥＷ変異を含むことで、インビボ半減期をさらに向上させることができる。
【００７１】
好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のインビボ半減期は、対照タンパク

質のインビボ半減期と比べて、（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ含有対照タンパク質と比べて）維持されているか、または有意に変化していないか、または増加（好ましくは、有意に増加）している。

【００７２】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物のインビボ半減期は、少なくとも３日、または少なくとも４日、または少なくとも５日、または少なくとも６日、または少なくとも７日（例えば、最大４日、最大５日、最大６日、最大７日、最大８日、最大１０日、最大１５日、最大２０日、最大２２日、または最大２５日、例えば、３日～５日、３日～７日、４日～７日または５日～７日または６日～７日または４日～２２日または５日～２２日または６日～２２日）である。好ましい実施形態では、インビボ半減期は、哺乳動物におけるインビボ半減期であり、例えば、マウス等の実験動物において、またはヒトにおいて評価されるインビボ半減期である。インビボ半減期は、マウス、特に、マウスＦｃＲｎではなくヒトＦｃＲｎを発現するマウス等の実験動物またはヒトにおける血清中半減期または血漿中半減期（または循環もしくは血流における半減期）であってもよい。一部の実施形態では、インビボ半減期はβ相半減期である。

【００７３】

一部の好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物、例えば、ＩｇＡ抗体（例えば、ＩｇＡ１抗体またはＩｇＡ２抗体）を含むタンパク質は、対照タンパク質のインビボ半減期と比べて、インビボ半減期が増加（好ましくは有意に増加）している。

【００７４】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物（例えば、ＩｇＡ抗体（例えば、ＩｇＡ１抗体またはＩｇＡ２抗体）を含むタンパク質）のインビボ半減期は、対照タンパク質のインビボ半減期と比べて、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している（例えば、対照タンパク質のインビボ半減期と比べて、例えば、最大３倍、最大４倍、最大５倍、最大６倍、最大７倍、最大８倍、最大９倍、最大１０倍、最大１５倍、または最大２０倍の増加があり、３倍～５倍の増加、３倍～８倍の増加、３倍～１０倍の増加、３倍～２０倍の増加、５倍～８倍の増加、５倍～１０倍の増加、または５倍～２０倍の増加等が挙げられる）。

【００７５】

インビボ半減期の増加が達成される場合、適切な対照タンパク質は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＡ抗体であり、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される、ＩｇＡ１抗体またはＩｇＡ２抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＡ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）であるか、または、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、このような対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含んでいないことである。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物はＩｇＡ抗体を含み、一方、例示的な対照タンパク質は、同一のＩｇＡ抗体を含むが、唯一の相違点（本発明のタンパク質と比べて）が、当該対照タンパク質が本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００７６】

あるいは、インビボ半減期の維持または少なくとも維持が観察される場合、例えば、インビボ半減期が、対照タンパク質のインビボ半減期と比べて有意に変化していない（もしくは変化していない）か、または実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）場合には、適切な対照タンパク質は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であってもよく、例えば、ＩｇＧ抗体、例えば、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）であるか、または、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば

、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物であってもよい。好ましくは、対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＡ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００７７】

適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。

インビボ半減期（または血漿中半減期または血清中半減期）は、任意の好適な方法で決定すればよく、当業者であれば好適な方法に通じているであろう。一部の実施形態では、インビボ半減期は、実験動物（例えば、実験マウス）で決定したものであり、また一部の実施形態では、インビボ半減期に関連する前記考察および値は、（例えば、本明細書中の他の箇所に記載されているように）マウスモデルにおいて決定されたインビボ半減期に関するものである。他の実施形態において、インビボ半減期に関する前記考察および値は、ヒトにおいて観察されるインビボ半減期に関するものである。

【００７８】

インビボ半減期を決定するために好ましいこのような方法では、マウス、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現するが、マウスＦｃＲｎを発現しないマウス（ホモ接合体Ｔｇ３２マウス（Ｂ６．Ｃｇ－Ｆｃｇｒｔｔｍ１Ｄｃｒ　Ｔｇ（ＦＣＧＲＴ）３２Ｄｃｒ／ＤｃｒＪ；Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）等）を使用して、本発明のタンパク質構築物の半減期を決定する。好ましいマウスは、実施例１に記載されている。インビボ半減期を決定するための例示的な方法は、本明細書の実施例１に記載されている。

【００７９】

本発明者らは、有利なことに、本発明の構築物が、実際の生体内の状況または生理的に関連する状況をより忠実に表すようにしたマウスモデルにおいても良好に機能することを本明細書中で実証している（実施例１参照）。このマウスモデル、例えば、上述のマウスモデルを改変したものでは、プールされたヒトＩｇＧ分子の収集物を、例えば、ＩＶＩｇ製剤の形態でマウスに前投与（ｐｒｅ－ｌｏａｄｅｄ）している。このようなヒトＩｇＧ分子を過剰量存在させることで、このような分子が、例えば、内因性抗体の形で存在し、このような高レベルのＩｇＧが、ＦｃＲｎの結合およびリサイクルをめぐって競合するという生体内の状況をより正確に表していると考えられる。よって、ＦｃＲｎ上のＩｇＧ結合部位に対する競合が存在し得る。本発明者らは、有利なことに、本発明の構築物が、互いに競合するＩｇＧ分子の存在下であっても好ましい半減期を示すことを実証している。よって、このようなモデルでは、本発明の構築物のインビボ半減期は、本明細書中の他の箇所に記載されているような適切な対照タンパク質、例えば、ＩｇＧ１等の野生型全長ＩｇＧ抗体のインビボ半減期と比べて、有意に変化していない（もしくは変化していない）か、または実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）か、または若干短いだけである。この効果は、例えば、先に記載されているように、また実施例１に記載されているように、ヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおいて実証されている。一部の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載されているようなＲＥＷ変異を含ませることで、このようなモデルにおけるインビボ半減期をさらに向上させることができる。

【００８０】

一部の抗体が有する別の重要なエフェクター機能は、古典的補体経路を活性化する能力（補体依存性細胞傷害またはＣＤＣとして知られている）である。抗体または他の適切なタンパク質構築物のＣＤＣ誘導能は、一般的に、当該抗体または当該構築物のＦｃ領域が、Ｃ１複合体の成分、好ましくはＣ１ｑに結合することによって媒介される。そして、この相互作用により、ＣＤＣを介し、当該抗体（または当該構築物）が結合した標的細胞の溶解が誘導される。一般的に、ＣＤＣ誘導能は、対象のＦｃ領域、ならびに、当該Ｆｃ領域がＣ１ｑと結合できるか否か（またはどの程度結合できるか）によって変動する。例えば、野生型ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域および野生型ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域は、一般的に、Ｃ１ｑに結合してＣＤＣを誘導する能力が良好である。ＩｇＧ２　Ｆｃ領域またはＩｇＧ

４　Ｆｃ領域は、一般に、これを行う能力が弱いか、または低い。ヒトＩｇＡ　Ｆｃ領域は、一般的には、Ｃ１ｑに結合してＣＤＣを誘導する能力を有していないか、または、Ｃ１ｑに結合してＣＤＣを誘導する能力が弱い。

【００８１】

好ましくは、本発明のタンパク質構築物は、Ｃ１ｑ（例えば、ヒトＣ１ｑ）に対する結合能を有するか保持する、あるいは、Ｃ１ｑ（例えば、ヒトＣ１ｑ）に対する結合能の増加または向上を示す。

【００８２】

よって、この結果として、本発明のタンパク質構築物は、好ましくは、ＣＤＣ誘導能を有するか保持する、またはＣＤＣ誘導能の増加もしくは向上を示す。

【００８３】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、Ｃ１ｑの組換えバージョン（例えば、組換えヒトＣ１ｑ）に対する結合能を有する。本明細書中の他の箇所に記載されているように、ＩｇＧ　Ｆｃ領域、特に、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域およびＩｇＧ３　Ｆｃ領域は、Ｃ１ｑへの結合が良好であるが、このことは、これらの血清型の抗体が、一般的に良好なＣＤＣ活性を示すことを意味している。よって、一部の実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域またはＩｇＧ３　Ｆｃ領域を含むタンパク質構築物、特に、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域を含むタンパク質構築物が好ましい。しかしながら、ＩｇＡ　Ｆｃ領域、例えば、ＩｇＡ１Ｆｃ領域およびＩｇＡ２　Ｆｃ領域は、一般的に、ＣＤＣ活性が良好でないか、またはＣＤＣ活性を有していない。よって、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を介した当該構築物のＣ１ｑへの結合能に有意に影響を及ぼさないことが好ましい。さらに、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、ＩｇＡ抗体（またはＩｇＡ　Ｆｃ領域が存在するか、当該ＩｇＡ　Ｆｃ領域が唯一のＦｃ領域である他の構築物）に、Ｃ１ｑに対する結合能を付与（または当該能力を強化、もしくは当該能力を増加）できることが好ましい。

【００８４】

本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることにより、ＩｇＡ抗体に対し（よって、ＩｇＡ　Ｆｃ領域が存在するか、当該ＩｇＡ　Ｆｃ領域が唯一のＦｃ領域である他の構築物に対し）、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される適切なサブタイプの、例えば、全長ＩｇＡ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）と比べて、Ｃ１ｑへの結合能を付与できる（もしくは当該能力を強化できる、もしくは当該能力を増加できる）ことを本明細書中で実証している（実施例１参照）。

【００８５】

加えて、本発明者らは、本発明の構築物中にＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の両方が含まれることが、ＩｇＧ　Ｆｃ領域（またはＦｃ断片）を含む当該構築物のＣ１ｑへの結合能を、例えば、前記適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）と比べて低下させないことを本明細書中で実証している（実施例１参照）。実際、本発明者らは、本発明の構築物のＣ１ｑへの結合能は、適切な全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）、例えば、ＩｇＧ１抗体またはＩｇＧ２抗体のＣ１ｑへの結合能と少なくとも同等であることを示している。驚くべきことに、かつ有利なことに、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域を含む本発明の構築物のＣ１ｑへの結合能は、全長ＩｇＧ１抗体のＣ１ｑへの結合能と比べて向上しているか、または優れていることが示されている。（例えば、全長ＩｇＧ１抗体における）単独のＩｇＧ１　Ｆｃ領域と比べて、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域とＩｇＡ　Ｆｃ領域とを有する本発明の構築物について観察されたこの向上は予測し得なかったものであり、かつ、このＣ１ｑへの結合能の向上は、本発明のタンパク質構築物のＣＤＣ誘導能の向上にもつながっているはずと考えられる。実際、このことは、本発明のタンパク質構築物（実施例１および実施例２参照）において、当該構築物が、例えば、適切な全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）、例えば、ＩｇＧ１抗体または

ＩｇＧ２抗体と比べて、これらのＣＤＣ誘導能に匹敵するか、または向上もしくは増加したＣＤＣ誘導能を示していることで証明されている。本明細書中の他の箇所に記載されているようなＲＥＷ変異を含むことで、ＣＤＣ誘導をさらに向上させることができる。加えて、ＲＥＷ変異の有無にかかわらず、本明細書中の他の箇所および実施例２に記載される本発明の伸長型構築物もまた、ＣＤＣ誘導能のこのような向上を示す。

【００８６】

また、本発明の構築物のＣ１ｑへの結合能は、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわち、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている構築物のＣ１ｑへの結合能と比べて、向上しているか、または優れていることが示されている。本発明の構築物のＣＤＣ誘導能は、本発明の構築物における配向とは逆の配向を備えた構築物、すなわちＩｇＧ　Ｆｃ領域のＣ末端がＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合された構築物のＣＤＣ誘導能よりも向上（増加）しているか、または優れていることが示されている。

【００８７】

よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＣ１ｑへの結合能は、（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ含有対照タンパク質と比べて）維持されている、もしくは有意に変化していないか、または、対照タンパク質のＣ１ｑへの結合能と比べて増加（好ましくは、有意に増加）している。

【００８８】

よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＣＤＣ誘導能は、（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ含有対照タンパク質と比べて）維持されている、もしくは有意に変化していないか、または、対照タンパク質のＣＤＣ誘導能と比べて増加（好ましくは、有意に増加）している。

【００８９】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、使用される標的指向化ドメインに応じて、ある種の細胞、例えば、癌細胞、例えば、ＣＤ２０またはＨＥＲ２を発現する細胞または癌細胞のＣＤＣを誘導することが可能である。あくまで例示目的であり、網羅的な列挙を意図するものではないが、本発明のタンパク質構築物は、ＣＤ２０を発現する癌細胞、例えば、Ｒａｊｉ細胞、ＷＳＵ－ＮＨＬ細胞、またはＳＵ－ＤＨｌ４細胞を含む癌性Ｂ細胞株のＣＤＣを誘導可能であることが示された。

【００９０】

ＣＤＣの誘導は、適切な標的細胞の溶解率％を求めることにより簡便に測定できる。溶解率％の値は、当然のことながら、対象とする細胞の種類によって異なる。しかしながら、例示する本発明の構築物によれば、癌細胞の溶解率％レベルは良好であり、例えば、異なる種類の癌細胞に対し、少なくともまたは最大４０％の溶解が見られ、少なくともまたは最大４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、または８５％の溶解レベルが観察される。あくまで例示目的であるが、ＣＤ２０標的指向化ドメインを有する本発明のタンパク質構築物は、少なくともまたは最大４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、または８５％のＲａｊｉ細胞（ＣＤ２０発現癌細胞株）の溶解を誘導することができる。

【００９１】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＣ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）は、対照タンパク質のＣ１ｑに対する結合能と比べて、例えば、少なくとも１．１倍、少なくとも１．２倍、少なくとも１．３倍、少なくとも１．４倍、少なくとも１．５倍、少なくとも１．６倍、少なくとも１．７倍、少なくとも１．８倍、少なくとも１．９倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、または少なくとも１０倍増加している（例えば、最大１．１倍、最大１．２倍、最大１．３倍、最大１．４倍、最大１．５倍、最大１．６倍、最大１．７倍、最大１．８倍、最大１．９倍、最大２倍、最大３倍、最大４倍、最大５倍、最大６倍、最大７倍、最大８倍、最大９倍、最大１０倍、最

大１５倍、または最大２０倍の増加があり、１．２倍～２０倍の増加、１．２倍～１０倍、１．２倍～８倍、１．３倍～２０倍の増加、１．３倍～１０倍の増加、１．３倍～８倍の増加等が挙げられる）。

【００９２】

Ｃ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）の増加が達成される場合、適切な対照タンパク質は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質であって、例えば、ＩｇＡ抗体であり、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される、ＩｇＡ１抗体またはＩｇＡ２抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＡ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体）であるか、または、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＡ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物である。好ましくは、このような対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含んでいないことである。一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物はＩｇＡ抗体を含み、一方、例示的な対照タンパク質は、同一のＩｇＡ抗体を含むが、唯一の相違点（本発明のタンパク質と比べて）が、当該対照タンパク質が本発明で規定されるＩｇＧ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００９３】

あるいは、Ｃ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）の増加が達成される場合や、またはＣ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）の維持が観察される場合、例えば、Ｃ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）が有意に変化していない（もしくは変化していない）か、もしくは対照タンパク質のＣ１ｑに対する結合能（またはＣＤＣ誘導能）と実質的に同等である（もしくは同等である、もしくは匹敵する）場合には、適切な対照タンパク質は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む対照タンパク質、例えば、ＩｇＧ抗体であり、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体等の適切なサブタイプの全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＧ抗体）であってもよいし、または、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む別の適切な構築物、例えば、単一のＩｇＧ　Ｆｃ領域を構築物中の唯一のＦｃ領域として含む別の適切な構築物であってもよい。好ましくは、このような対照タンパク質は、それが比較される本発明のタンパク質構築物と実質的に同一（もしくは同一）または同等であるが、例外（または相違）は、当該対照タンパク質構築物が、本発明で規定されるＩｇＡ　Ｆｃ領域を含まないことである。

【００９４】

適切な対照タンパク質は、好ましくは、本発明のタンパク質構築物と同一もしくは同等の標的指向化ドメインまたは同一もしくは同等の抗原結合ドメインを含む。

【００９５】

機能的に有効となるようなＣ１ｑとの結合レベル、例えば、ＣＤＣ活性の誘導を可能にするレベルでのＣ１ｑとの結合が所望される。本発明のタンパク質構築物のＣ１ｑとの結合能は、任意の適切な方法またはアッセイによって評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）Ｃ１ｑ結合に関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイが使用される。本発明のタンパク質構築物のＣ１ｑ結合を決定するための特に好ましいアッセイは、本明細書の実施例１に記載されている。同様に、本発明のタンパク質構築物のＣＤＣ誘導能は、任意の適切な方法またはアッセイによって評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＣＤＣ誘導能に関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、標的細胞（すなわち、本発明の構築物によって認識される標的抗原を発現する細胞が使用される）のＣＤＣ誘導溶解を測定可能なアッセイが使用され、例えば、クロム放出アッセイ、またはカルセインＡＭに基づくＣＤＣアッセイ等の蛍光放出アッセイが使用される。適切な細胞、例えば、癌細胞、例えば、癌性Ｂ細胞の

例としては、本明細書の実施例に記載されている通りであり、Ｒａｊｉ細胞、ＷＳＵ－ＮＨＬ細胞、またはＳＵ－ＤＨＬ４細胞が挙げられる。本発明のタンパク質構築物のＣＤＣ活性を決定するための特に好ましいアッセイは、本明細書の実施例１に記載されている。

【００９６】

一部の抗体が持つもう一つの重要なエフェクター機能は、ＡＤＣＣ誘導能である。抗体または他の適切なタンパク質構築物のＡＤＣＣ誘導能は、一般的に、抗体または構築物のＦｃ領域がエフェクター細胞上の適切なＦｃＲに結合することによって媒介される。そして、この相互作用が引き金となってエフェクター細胞におけるシグナル伝達カスケードを誘発することができ、その結果、様々な因子が分泌され、最終的には抗体（または構築物）が結合した標的細胞が破壊される。一般的に、ＡＤＣＣの誘導能およびＡＤＣＣ誘導の効力は、対象のＦｃ領域、ならびに、当該Ｆｃ領域がエフェクター細胞上のＦｃＲと結合できるか否か（またはどの程度結合できるか）によって変動する。ＡＤＣＣの誘導は、活性化受容体と抑制性受容体との比率にも左右される。例えば、ＩｇＧ抗体は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、単球、および好酸球等のエフェクター細胞上のＦｃγＲとの結合を介してＡＤＣＣを誘導することができる）。野生型ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域および野生型ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ領域は、一般的に優れた（高い）ＡＤＣＣ誘導能を有し、ＩｇＧ２　Ｆｃ領域またはＩｇＧ４　Ｆｃ領域は、一般的に、より弱いまたはより低いＡＤＣＣ誘導能を有する。一方、ＩｇＡ抗体（例えば、ＩｇＡ１抗体およびＩｇＡ２抗体）は、一般的に、多形核白血球（ＰＭＮ）上、主として好中球上のＦｃαＲ（ＦｃαＲＩ）との結合を介して良好な（高い）ＡＤＣＣ誘導能を有する。

【００９７】

よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）誘導能を有するか、または保持する。よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＡＤＣＣ誘導能は、（例えば、適切なＦｃ含有対照タンパク質、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域および／またはＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択されるサブタイプの、例えば、全長ＩｇＡ抗体または全長ＩｇＧ抗体（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体または野生型全長ＩｇＡ抗体）と比べて）維持されている、または有意に変化していない、または有意に低下していないか、あるいは、前記ＡＤＣＣ誘導能は、例えば、適切なＦｃ含有対照タンパク質（例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡＦｃ領域および／またはＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される適切なサブタイプの、例えば、全長ＩｇＡまたは全長ＩｇＧ、例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体または野生型全長ＩｇＧ抗体）のＡＤＣＣ誘導能と比べて、増加（好ましくは、有意に増加）している。

【００９８】

ＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む本発明の構築物について、当該構築物は、好中球の関与を介してＡＤＣＣを誘導可能であることが好ましい。ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む本発明の構築物について、当該構築物は、ＮＫ細胞の関与を介してＡＤＣＣを誘導可能であることが好ましい。よって、ＩｇＧ　Ｆｃ領域およびＩｇＡ　Ｆｃ領域の両方を含む本発明の好ましい構築物は、好中球およびＮＫ細胞の両方の関与を介してＡＤＣＣを誘導可能であることが好ましい。

【００９９】

有意レベルのＡＤＣＣ活性が、本発明の構築物において、維持されているか、または保持されているか、または存在する。例えば、機能的に有効となるようなＡＤＣＣレベル、例えば、適切な標的細胞の殺傷を可能にするレベルでのＡＤＣＣが所望される。本発明のタンパク質構築物のＡＤＣＣ誘導能は、任意の適切な方法またはアッセイによって評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＡＤＣＣに関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、標的細胞（すなわち、本発明の構築物によって認識される標的抗原を発現する細胞が使用される）のＡＤＣＣ誘導溶解を測定可能なアッセイが使用され、例えば、クロム放出アッセイが使用される。典型的には、そして好ましくは、ＡＤ

ＣＣ活性は、特異的溶解または特異的細胞溶解の量（例えば、特異的溶解率％または特異的細胞溶解率％）で表してもよい。

【０１００】

一部の抗体が持つもう一つの重要なエフェクター機能は、ＡＤＣＰ誘導能である。抗体または他の適切なタンパク質構築物のＡＤＣＰ誘導能は、一般的に、抗体または構築物のＦｃ領域がエフェクター細胞上の適切なＦｃＲに結合することによって媒介され、当該エフェクター細胞は、これにより貪食が可能であり、したがって、当該抗体（または構築物）が結合した標的細胞を破壊することが可能である。一般的に、ＡＤＣＰの誘導能およびＡＤＣＰ誘導の効力は、対象のＦｃ領域、ならびに、当該Ｆｃ領域が、貪食が可能なエフェクター細胞上のＦｃＲと結合できるか否か（またはどの程度結合できるか）によって変動する。例えば、ＩｇＧ抗体は、マクロファージ等のエフェクター細胞上のＦｃγＲに結合することでＡＤＣＰを誘導することができる。野生型ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域および野生型ヒトＩｇＧ２領域は、一般的に優れた（高い）ＡＤＣＰ誘導能を有する。一方、ＩｇＡ抗体（例えば、ＩｇＡ１抗体およびＩｇＡ２抗体）は、マクロファージ等の適切なエフェクター細胞上のＦｃαＲ（ＦｃαＲＩ）との結合を介したＡＤＣＰ誘導能が中程度に過ぎない。

【０１０１】

よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）の誘導能を有するか、または保持する。よって、好ましい実施形態では、本発明のタンパク質構築物のＡＤＣＰ誘導能は、（例えば、適切なＦｃ含有対照タンパク質、例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡ　Ｆｃ領域および／またはＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択されるサブタイプの、例えば、全長ＩｇＡまたは全長ＩｇＧ（例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体または野生型全長ＩｇＡ抗体）と比べて）維持されている、または有意に変化していない、または有意に低下していないか、あるいは、前記ＡＤＣＰ誘導能は、例えば、適切なＦｃ含有対照タンパク質（例えば、本発明の構築物に含まれるＩｇＡＦｃ領域および／またはＩｇＧ　Ｆｃ領域のサブタイプに応じて選択される適切なサブタイプの、例えば、全長ＩｇＡまたは全長ＩｇＧ、例えば、野生型全長ＩｇＡ抗体または野生型全長ＩｇＧ抗体）のＡＤＣＰ誘導能と比べて、増加（好ましくは、有意に増加）している。

【０１０２】

本発明の構築物において、有意レベルのＡＤＣＰ活性が、維持されているか、または保持されているか、または存在している。例えば、機能的に有効となるようなＡＤＣＰレベル、例えば、適切な標的細胞の貪食を可能にするレベルでのＡＤＣＰが所望される。本発明のタンパク質構築物のＡＤＣＰ誘導能は、任意の適切な方法またはアッセイによって評価すればよく、当業者であれば適切なアッセイに通じている。前記考察は、任意の適切なアッセイによって決定された（または評価された）ＡＤＣＰに関するものであってもよい。典型的には、そして好ましくは、標的細胞（すなわち、本発明の構築物によって認識される標的抗原を発現する細胞が使用される）のＡＤＣＰ誘導溶解を測定可能なアッセイが使用され、例えば、マクロファージを使用して標的細胞の貪食を誘導するアッセイが使用される。

【０１０３】

好ましくは、ＩｇＧ　Ｆｃ領域に結合されたＩｇＡ　Ｆｃ領域を含む本発明のタンパク質構築物は、本明細書に記載される機能的特性の１つ以上、好ましくは全てを有する。

【０１０４】

好ましくは、上述の能力および特性は、適切な対照（例えば、対照タンパク質）と比べた場合に、測定可能レベルまたは有意レベルで、より好ましくは、統計的に有意なレベルで観察される。本明細書中に記載のあらゆる統計解析において、関連する対照、またはその他の比較対象の実体もしくは測定値との統計的有意差は、０．１未満の確率値、好ましくは０．０５未満（もしくは０．０５以下）の確率値を有することが好ましい。適切な統計的有意性の決定方法は、当該技術分野において周知であり、文書化されており、これら

のいずれを用いてもよい。

【０１０５】

本発明のタンパク質構築物において、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている。このような結合は、任意の好都合な手段で行うことができ、例えば、中間物を伴わない直接的なものであっても、または中間物を介した間接的なものであってもよく、前記中間物としては、リンカー、またはタンパク質もしくはポリペプチドの配列、単位、もしくはドメイン、例えば、構造的な配列、単位、もしくはドメイン、例えば、本明細書中の他の箇所で記載されているＣＨ１ドメイン等が挙げられる。このように、ＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域は、各Ｆｃ領域が変わらずその機能を実行できるような任意の適切な方法により、互いに繋ぎ合わせる、または連結することができる。本発明の一部の実施形態では、タンパク質構築物は、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域とを結合するため、および／または、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を、本明細書中の他の箇所に記載されているような標的指向化ドメインまたは抗原結合ドメイン等、構築物の他の部分に結合するために、構築物の異なる部分間にリンカー（物理的なリンカーまたはリンカー分子）を含むであろう。

【０１０６】

よって、本発明の好ましい構築物では、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端は、リンカーによって、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合されている。任意の適切なリンカー分子を使用することができるが、このようなリンカー分子は当業者に周知であろう。例えば、ペプチド（もしくはポリペプチド）リンカーまたは化学リンカーまたは他の共有結合リンカーを、適宜使用することができる。

【０１０７】

ペプチドまたはタンパク質（ポリペプチド）リンカーが、一般的には好ましい。このようなペプチドリンカーは、非天然もしくは天然のアミノ酸を含み得る、またはネイティブもしくは非ネイティブ（例えば、合成）の配列を含み得るものであるが、当該技術分野では周知であり、よって、当業者であれば、本発明のタンパク質構築物の各種構成要素を安定的に、ただし、正しい空間定位または空間最適化をもって互いに結合するために、適切な配列、長さ、および／または柔軟性／剛性を有する適切なリンカーを容易に選択することができ、これにより、個々の構成要素が互いに繋ぎ合わせまたは結合されると、上述の所要の機能的特性（すなわち、各構成要素、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域の機能的特性、または本明細書中の他の箇所に記載されているような標的指向化ドメインまたは抗原結合ドメインの機能）が保持される。

【０１０８】

よって、リンカーまたはスペーサーは、結合されたタンパク質の折り畳みを助けることができ、スペーサーまたはリンカーの長さおよび／または柔軟性／剛性は、各構成要素の最良または十分な機能的折り畳みを可能にするように適宜調整できる。当業者であれば適切な長さを容易に決定することができ、任意の適切なアミノ酸数とすることができる。ただし、例示的な長さとして、少なくとも５個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、もしくは４５個のアミノ酸長（例えば、少なくとも６個、７個、８個、もしくは９個のアミノ酸長、または少なくとも１１個、１２個、１３個、もしくは１４個のアミノ酸長）、または５個もしくは１０個のアミノ酸～５０個もしくは６０個もしくは７０個のアミノ酸、例えば、５個もしくは１０個のアミノ酸～１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、もしくは７０個のアミノ酸、または１５個～２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、もしくは７０個のアミノ酸、または２０個～２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、もしくは７０個のアミノ酸、または２５個～３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、もしくは７０個のアミノ酸、または３０個～３５個、４０個、４５個、５０個、６０個、もしくは７０個のアミノ酸が挙げられる。好ましいリンカーは、１５個～３０個のアミノ酸長とすることができ、例えば、最大１５個、２０個、２５個、もしくは３０アミノ酸長（または、最大４０個もしくは５０個もしくは６０個もしくは７０個

のアミノ酸長）とすることができる。

【０１０９】

本発明の構築物のいくつかは、本明細書において伸長型構築物（ｅｘｔｅｎｄｅｄ　ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｓ　）と記載されるが、これは、これらの構築物におけるタンデムなＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域が、伸長型ではない本発明の構築物におけるこれらの領域と比べて、より離れているためである。本明細書中の他の箇所に記載されているように、特定の一実施形態では、これは、ＣＨ１ドメイン（または代替の構造的なタンパク質配列、単位、もしくはドメイン）と、任意選択的に、例えば、本明細書中に記載されているような、抗体ヒンジ領域等のさらなるリンカーを１つ以上含むことによって達成される。しかしながら、他の実施形態では、上述のものよりも長い（伸長された）リンカーまたはスペーサーを含めることによって、これを達成することができる。よって、このような実施形態では、本発明の構築物においてタンデムなＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域との間に存在する（または、前記領域を結合する）これらのリンカーは、８０個、９０個、１００個、１０５個、１１０個、１１５個、１２０個、１２５個、１２８個、１２９個、１３０個、１３５個、１４０個、１４５個、または１５０個のアミノ酸長、例えば、９０個、１００個、または１２０個～１５０個のアミノ酸長であるか、少なくともこれらのアミノ酸長であるか、最大でこれらのアミノ酸長とすることができる。

【０１１０】

先に概略を述べたように、適切なリンカーは、ネイティブまたは非ネイティブ（例えば、合成）配列を含む（またはそれらからなる）ものとしてもよい。例示的な非ネイティブまたは合成のリンカーは、当該技術分野において報告されており、グリシン残基および／またはセリン残基を含む（またはそれからなる）リンカー、例えば、ＧＳリンカーを挙げることができ、前記ＧＳリンカーは、１つ以上のＧ４Ｓリンカー（ＧＧＧＧＳ（配列番号４４））の反復等、ＧＳ配列の反復を１つ以上含んでもよい。

【０１１１】

リンカーとして使用可能な、例示的なネイティブまたは天然に存在するペプチドまたはポリペプチド配列もまた、当業者には周知であろう。例えば、本発明のタンパク質構築物においてＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端をヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合するために使用されるペプチド（またはポリペプチド）リンカーは、抗体ヒンジ領域を含むことが、好都合であり、かつ好ましい。このようなヒンジ領域の配列は、当該技術分野において周知であり、文書化されており、例示的な配列を表１に示している。例えば、適切なヒンジ領域は、ＩｇＡ抗体ヒンジ領域またはＩｇＧ抗体ヒンジ領域を含む。本明細書中の他の箇所でも説明されているように、本発明の構築物では、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端をＩｇＧ　ＦｃのＮ末端に連結するために、ＩｇＧヒンジ領域、例えば、当該構築物のＩｇＧ　Ｆｃ領域に使用されるＩｇＧサブタイプ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）由来のＩｇＧヒンジ領域を使用することが、特に好都合である。このような抗体ヒンジ領域は、その全てまたは一部（例えば、断片）を使用し得るものであり、これらは、構築物の構成要素の機能的特性が保持されること、好ましくは、ヒンジ領域の機能的特性が保持されることを条件として、構築物に含まれる。

【０１１２】

リンカーの性質、および適切なリンカー長等の他の特性を選択し、例示された構築物で使用されている、例えば、ヒンジ領域等のリンカーについて観察されるものと同一（または類似）の効果を達成することは、当業者にとって標準的かつ日常的な手順であろう。好ましい長さの例示が、本明細書中の他の箇所に示されている。

本発明の他の好ましい実施形態では、特に、本発明の伸長型構築物において、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端は、ＣＨ１ドメインによって、ＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合することができる。換言すれば、ＣＨ１ドメインを中間物として使用し、ＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域とを結合することができる。このような実施形態では、任意のＣＨ１ドメインを使用することができ、例えば、ＩｇＧまたはＩｇＡのＣＨ１ドメイン等、いくつかの例を表１に示している。好ましい実施形態では、ＣＨ１ドメインはＩｇＧ　ＣＨ１ドメ

インであり、例えば、ＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインである。このような好ましい中間物は、ＣＨ１ドメインを含んでもよく、例えば、前記および本明細書中の他の箇所に記載されているような他のリンカーまたはスペーサー要素をさらに含んでもよい。例を挙げると、１つ以上のリンカー、例えば、ペプチドリンカーが存在してもよく、例えば、１つ以上の抗体ヒンジ領域が存在してもよい。このような実施形態では、ＣＨ１ドメインは、構築物のタンデム部分においてＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域との間に位置しており、リンカーを使用することにより、ＣＨ１ドメインのＮ末端をＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端に、および／またはＣＨ１ドメインのＣ末端をＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端に、簡便に連結することができる。本明細書中の他の箇所に記載されているように、このようなリンカーとして、抗体ヒンジ領域を使用することができる。他の実施形態と同様に、ＣＨ１ドメインの性質に一致するヒンジ領域を使用することが特に簡便である。よって、ＣＨ１ドメインがＩｇＧ　ＣＨ１ドメインである場合、一部の実施形態では、前記リンカーは、当該ＩｇＧ　ＣＨ１ドメインに使用されているＩｇＧサブタイプ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）由来のＩｇＧヒンジ領域であろう。好ましい実施形態では、ＣＨ１ドメインは、ＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインである。このような実施形態および他の実施形態では、好ましいリンカーは、ＩｇＧ１ヒンジ領域である。このような伸長型構築物として好ましいものが、実施例２に示されており、当該伸長型構築物は、例えば、Ｎ末端からＣ末端に向かう方向に、ＩｇＡ　Ｆｃ領域（例えば、ＩｇＡ２）、ＩｇＧヒンジ領域（例えば、ＩｇＧ１ヒンジ領域）、ＣＨ１ドメイン（例えば、ＩｇＧ１　ＣＨ１ドメイン）、さらなるＩｇＧヒンジ領域（例えば、ＩｇＧ１ヒンジ領域）、およびＩｇＧ　Ｆｃ領域（例えば、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域）を含んでいる。

【０１１３】

本発明の伸長型構築物に関するこのような実施形態および他の実施形態において、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＣ末端とＩｇＧ　Ｆｃ領域のＮ末端とを結合する（これらの間にある）構築物の領域の好ましい全長は、本発明の構築物で使用されるリンカーまたはスペーサーに関して本明細書中の他の箇所に記載されている通りであり、例えば、少なくともまたは最大１５０個のアミノ酸長である。

【０１１４】

ペプチド（またはポリペプチド）リンカーを使用する利点は、当該構築物における複数のポリペプチド鎖を単一のポリペプチドとして、例えば、融合タンパク質または融合ポリペプチドとして製造することが可能となることである。

【０１１５】

「融合タンパク質」、「融合ポリペプチド」等の用語は、本明細書では、同一ポリペプチド配列または同一オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）中の２つ以上のタンパク質成分の機能的接合を表すために使用される。このような融合タンパク質のある例は、遺伝子融合物と記載することもできるが、これは、これら融合タンパク質が同一核酸配列によってコードされるからである（「融合遺伝子」または「融合ヌクレオチド配列」と呼ばれることもある）。このような融合タンパク質では、２つ（またはそれ以上）のタンパク質成分（または、これらをコードする核酸配列）を直接隣接させることができるが、同様にかつ好ましくは、当該成分を、例えば、上述のように、適切なペプチドもしくはポリペプチドからなるスペーサーまたはリンカーで接合することができる。

【０１１６】

本発明の構築物は、２つのＦｃ二量体をタンデムに、または互いに隣接するように含んでいるため、このような実施形態では、タンパク質構築物は、２つの融合ポリペプチド（または融合ポリペプチド鎖）を簡便に含んでいる。このような実施形態では、各融合ポリペプチドは、（ｉ）ＩｇＡ　Ｆｃ領域の一方の鎖を構成するポリペプチド（すなわち、ＩｇＡ　Ｆｃ二量体の一方の鎖）、および（ｉｉ）ＩｇＧ　Ｆｃ領域の一方の鎖を構成するポリペプチド（すなわち、ＩｇＧ　Ｆｃ二量体の一方の鎖）を含み、ＩｇＧ　Ｆｃ領域の前記ポリペプチド鎖は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域の前記ポリペプチド鎖に対し、Ｃ末端に配置される（または位置している）。

【０１１７】
よって、このような実施形態では、ポリペプチド鎖（融合ポリペプチド）は、典型的には、Ｎ末端側終端部からＣ末端側終端部にわたって、ＩｇＡ　Ｆｃ二量体の半分を含むポリペプチドおよびＩｇＧ　Ｆｃ二量体の半分を含むポリペプチドを含んでいる。本明細書中の他の箇所に記載されているように、ＩｇＡ　Ｆｃ領域（または二量体）を構成するポリペプチドのＮ末端側終端部は、適切な標的指向化ドメインまたは抗原結合ドメイン等の他の実体に結合（または融合）してもよい。よって、本発明のタンパク質構築物（または当該構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域構成要素およびＩｇＧ　Ｆｃ領域構成要素）を使用し、他の適切な実体とのＦｃ融合体またはＦｃ融合タンパク質を創出することができる。換言すれば、互いに結合された当該構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域構成要素およびＩｇＧ　Ｆｃ領域構成要素は、例えば、目的とする任意のポリペプチドまたはタンパク質に融合させることが可能なポリペプチド単位とすることができる。

【０１１８】
当業者であれば融合ポリペプチドを生成する方法に通じており、このような方法としては、例えば、融合ポリペプチドをコードする核酸分子を（例えば、宿主細胞中で）発現させることが挙げられる。このような核酸分子は、典型的には、融合ポリペプチドの各種成分をフレーム内でコードする連続したヌクレオチド配列を含む。本件の場合、このような核酸分子は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域の一方の鎖を構成するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、ＩｇＧ　Ｆｃ領域の一方の鎖を構成するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とを含む連続したヌクレオチド配列であって、ＩｇＧ　Ｆｃ領域の前記鎖をコードする前記ヌクレオチド配列が、ＩｇＡ　Ｆｃ領域の前記鎖をコードする核酸分子の３’末端に位置しているヌクレオチド配列を含み得る。そして、発現されると、前記二本のポリペプチド鎖間で二量体化が起こり、完全なＩｇＡ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域（二量体）を形成することができる。

【０１１９】
先の記載は、構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域との間のリンカーまたはスペーサーの存在に焦点を当てているが、リンカー配列は、本発明の構築物中の他の箇所に適宜含まれてもよく、例えば、構築物中に存在し得る他の構成要素の間に含まれてもよい。よって、本発明のいくつかの構築物では、リンカーは、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端またはＮ末端側終端部と、その位置に存在する任意の他の所望の実体、本明細書中の他の箇所に記載されているような標的指向化ドメインまたは抗原結合ドメイン等との間に含まれてもよい。このようなリンカーは、上述のような形態とすることができ、例えば、ネイティブまたは非ネイティブ（合成）ペプチドリンカーとすることができる。この連結に好都合かつ好ましいペプチド（ポリペプチド）リンカーは、抗体ヒンジ領域の形態とすることができ、ＩｇＡ抗体ヒンジ領域、例えば、構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域に使用されているＩｇＡサブタイプ（ＩｇＡ１、ＩｇＡ２）由来のＩｇＡヒンジ領域とすれば好都合である。しかしながら、本明細書中の他の箇所に記載されているように、他の実施形態では、ＩｇＧヒンジ領域、例えば、ＩｇＧ１ヒンジ領域を使用することができる。このような抗体ヒンジ領域の全てまたは一部（例えば、断片）を、構築物の構成要素の機能的特性が保持されること、好ましくは、ヒンジ領域の機能的特性が保持されることを条件として使用し得る。

【０１２０】
ペプチド（ポリペプチド）リンカーは、一部の態様では好都合かつ好ましいが、連結される各種構成要素の機能的特性（本明細書中の他の箇所に記載）が、個々の構成要素が互いに繋ぎ合わせまたは結合されると保持されることを条件として、その他あらゆる適切な繋ぎ合わせまたは結合の手段を使用してもよく、例を挙げると、化学リンカーを含む他の任意の形態のリンカー、例えば、化学的架橋剤を使用してもよい。異なるタンパク質またはポリペプチド同士を繋ぎ合わせ（または結合または接合または連結またはコンジュゲート）させるための好適な架橋剤および方法が、当該技術分野で公知である。

【０１２１】

よって、一部の実施形態では、本発明の構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域を別々に製造し、その後、これらを互いに結合（または繋ぎ合わせまたは接合または連結またはコンジュゲート）してもよい。

【０１２２】

一部の実施形態では、リンカーは存在しない。よって、例えば、一部の実施形態では、ＩｇＡ　Ｆｃ領域を構成するポリペプチドは、本発明に基づいて、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を構成するポリペプチドに直接繋ぎ合わせてもよい。このような直接的な繋ぎ合わせにより、融合ポリペプチドに関しては、ＩｇＧ　Ｆｃ領域の第１の（すなわち、Ｎ末端の）アミノ酸が、ＩｇＡ　Ｆｃ領域の最終の（すなわち、Ｃ末端の）アミノ酸に直接（ペプチド結合によって）融合されてもよい（すなわち、間にリンカーがない）。

【０１２３】

本発明のタンパク質構築物では、任意のＩｇＧ　Ｆｃ領域またはＩｇＡ　Ｆｃ領域を使用することができる。よって、一部の実施形態では、これらの領域は、野生型の配列またはネイティブ配列を含むか、またはこれらに相当するであろう。しかしながら、他の実施形態では、ＩｇＧ　Ｆｃ領域および／またはＩｇＡ　Ｆｃ領域は、変異または改変、特に、Ｆｃ領域のエフェクター機能を増加もしくは強化させる変異または改変、あるいは、血漿中半減期を増加もしくは強化させる変異または改変を含むことができる。適切な変異Ｆｃ領域または改変Ｆｃ領域は、当該技術分野において周知されかつ報告されており、これらのいずれを使用してもよい。

【０１２４】

好ましい変異または改変としては、Ｆｃ受容体への結合を増加もしくは強化するものであり、好ましくはＦｃＲｎへの結合を増加もしくは強化するもの、またはＣ１ｑ結合を増加または強化するものである。

【０１２５】

一部の実施形態では、本発明の構築物での使用に好ましいＦｃ領域（ＩｇＧ　Ｆｃ領域、例えば、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域、ＩｇＧ２　Ｆｃ領域、ＩｇＧ３　Ｆｃ領域、またはＩｇＧ４　Ｆｃ領域）は、下記改変の１つ以上を含むことを特徴とする改変ＩｇＧ　Ｆｃ領域である：

（ｉ）３１１位（またはこれに対応する位置）に、アルギニン（Ｒ）残基、または、類似の残基（リジン（Ｋ）残基等）；

（ｉｉ）４２８位（またはこれに対応する位置）に、グルタミン酸（Ｅ）残基、または、類似の残基（アスパラギン酸（Ｄ）残基等）；および

（ｉｉｉ）４３４位（またはこれに対応する位置）に、トリプトファン（Ｗ）残基、または、類似の残基（チロシン（Ｙ）残基もしくはフェニルアラニン（Ｆ）残基等）。

【０１２６】

これらの位置は、ＣＨ１ドメインのＡＳＴＫが１１８位から始まるＩｇＧ領域の標準的なＥＵナンバリングを用いて定義される（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＨＧｎｂｅｒ．ｈｔｍｌ＃ｒｅｆｓ参照）。よって、本発明の様々な構築物におけるこれら残基の位置（またはこれらに対応する位置）は、容易に決定できる。実際、これら改変ＩｇＧ　Ｆｃ領域は、本明細書ではＲＥＷ変異とも称され、例示的な配列のいくつかを表１に示している。３１１位、４２８位、および４３４位における野生型の残基は、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２では、それぞれＱ、Ｍ、およびＮである。

【０１２７】

本発明の好ましい実施形態では、前記改変の２つ以上が存在し、最も好ましくは前記３つの改変が全て存在する。このような改変が国際公開第２０１７／１５８４２６号にさらに記載されているが、これらは、ＦｃＲｎに対するｐＨ依存性結合を増加または強化する効果を有する変異または改変の例である。本発明者らは、このような改変がＣ１ｑへの結合を増加できることについても、本明細書中に示している。また、ＣＤＣ誘導の増加についても示している。一部の実施形態では、このような改変は、ＩｇＧ２　Ｆｃ領域に使用

することが好ましい。一部の実施形態では、このような改変は、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域に使用することが好ましい。一部の実施形態では、このような改変は、ＩｇＧ３　Ｆｃ領域に使用することが好ましく、任意選択的に下記Ｒ４３５Ｈ変異と共にＩｇＧ３　Ｆｃ領域に使用することが好ましい。一部の実施形態では、このような改変は、ＩｇＧ４　Ｆｃ領域に使用することが好ましい。一部の実施形態では、ＲＥＷ置換が好ましい。

【０１２８】

本発明の構築物におけるＩｇＧ　Ｆｃ領域で使用可能な、別の好ましい、考えられる追加の改変としては、Ｓｔａｐｌｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１，　Ｎａｔ．　Ｃｏｍｍ．　２０（２）：５９９に記載されているようなＲ４３５Ｈ変異が挙げられる。このような改変には、ＦｃＲｎへの結合を増加させる効果もあり、構築物がＩｇＧ３　Ｆｃ領域を含む場合に使用することが好ましい。ここでも、この位置は、上述のようにＥＵナンバリングシステムを用いて定義されている。

【０１２９】

好ましい実施形態では、本発明の構築物は、標的指向化ドメイン（または標的指向化単位）をさらに含むものであり、例えば、標的指向化ドメイン（または標的指向化単位）にさらに結合される。このような標的指向化ドメインは、所望の標的分子または標的実体に結合可能な、例えば、特異的に結合可能な、任意の実体とすることができる。よって、このような標的指向化ドメインは、受容体、好ましくは受容体ドメイン（例えば、リガンドに対する受容体もしくは受容体ドメイン）もしくは受容体リガンド（例えば、受容体もしくは受容体リガンドに対するリガンド）、または抗原結合ドメインとすることができる。好ましい標的指向化ドメインおよび標的分子は、タンパク質またはポリペプチドである。よって、好ましい標的指向化ドメインは、結合性タンパク質である。

【０１３０】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物の標的指向化ドメインは、抗原結合ドメインであるか、または抗原結合ドメインを含む。

【０１３１】

本発明のタンパク質構築物における使用に好ましい抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片であり、例えば、抗体の抗原結合断片が挙げられる。

【０１３２】

よって、本発明の好ましい実施態様では、タンパク質構築物は、抗体（もしくは免疫グロブリン）、またはその抗原結合断片を含む。

【０１３３】

本発明のタンパク質構築物のＮ末端領域はＩｇＡ　Ｆｃ領域を含むため、特に好ましい抗体は、ＩｇＡ抗体またはその抗原結合断片であり、この場合、Ｆｃ領域は前記構築物中に既に備えられている。一部の実施形態では、前記ＩｇＡ抗体は、ＩｇＡ１抗体である。一部の実施形態では、前記ＩｇＡ抗体は、ＩｇＡ２抗体である。他の実施形態では、ＩｇＧ抗体またはその抗原結合断片が、抗原結合ドメインとして使用される。一部の実施形態では、前記ＩｇＧ抗体は、ＩｇＧ１抗体である。一部の実施形態では、前記ＩｇＧ抗体は、ＩｇＧ２抗体である。一部の実施形態では、前記ＩｇＧ抗体は、ＩｇＧ３抗体である。一部の実施形態では、前記ＩｇＧ抗体は、ＩｇＧ４抗体である。異なるクラスの抗体のサブユニット構造および三次元配置が周知である。

【０１３４】

本明細書中で使用する「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、抗原結合ドメインを含むあらゆる免疫学的結合剤を広く指す。この用語は、抗原結合ドメインを含む抗体断片を包含する。

【０１３５】

当業者であれば理解すると思われるが、「抗体」という用語に包含される免疫学的結合試薬は、あらゆる抗体およびその抗原結合断片を含むか、またはその範囲がこれらにまで及ぶものであり、全抗体（すなわち全長抗体）、二量体抗体、三量体抗体、および多量体抗体；二特異性抗体；キメラ抗体；組換え抗体および工学操作抗体、ならびにこれらの断

片が挙げられる。

【０１３６】

抗体をベースとする様々な構築物および断片を調製して使用する技術は、当該技術分野において周知である。モノクローナル抗体が特に好ましい。

【０１３７】

前記抗体または抗体断片は、３つのＣＤＲドメインを含む抗体軽鎖可変領域（V_L）と、３つのＣＤＲドメインを含む抗体重鎖可変領域（V_H）とを含むことが好ましい。まとめると、一般的に、前記６つのＣＤＲによって抗体に対する抗原結合特異性が付与されるものではあるが、３つのＣＤＲのみを有する単一ドメイン抗体を同様に使用することができ、特に、低程度または中程度の親和性での結合しか所望されない場合には、１つまたは２つのＣＤＲ領域であっても抗原結合を媒介することが可能である。また、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、４つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端にかけてＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を有する。これらのフレームワーク領域は、ＣＤＲを離間させている。一般的には前記ＶＬおよび前記ＶＨが抗原結合部位を形成するが、一般的に３つのＣＤＲドメインのみを含む、例えば、抗原に結合可能なＶＬ領域またはＶＨ領域を含む単一ドメイン抗体を使用することも可能である。

【０１３８】

本発明の構築物に使用される抗体のＣＤＲは、天然に存在する抗体および／または有効に工学操作された抗体に見られるような適切なフレームワーク領域によって、互いに離間されていることが好ましい。よって、ＣＤＲ配列は、抗原結合を可能にするため、適切なフレームワークまたは足場（ｓｃａｆｆｏｌｄ）内に設けられるか、または組み込まれることが好ましい。このようなフレームワーク配列またはフレームワーク領域として、適宜、天然に存在するフレームワーク領域であるＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、および／またはＦＲ４を用いて適切な足場を形成してもよいし、あるいは、例えば、種々の天然に存在するフレームワーク領域を比較することによって同定される、コンセンサスフレームワーク領域を用いてもよい。あるいは、非抗体足場または非抗体フレームワーク、例えば、Ｔ細胞受容体フレームワークを使用することができる。

【０１３９】

本発明の構築物に使用するための抗体または抗体断片は、抗原結合部位を構成するＣＤＲ配列およびＦＲ配列を含む適切な可変ドメインに加えて、抗体定常領域、例えば、重鎖定常領域および／または軽鎖定常領域をさらに含んでもよい。重鎖の定常領域は、３つの定常ドメインＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３を含み、軽鎖の定常領域は、ＣＬ定常ドメインを含む。本発明の一部の実施形態では、抗体（または断片）は、ＣＨ１ドメインおよび／またはＣＬドメインをさらに含むであろう。好ましい実施形態では、これらのドメインはＩｇＡ抗体由来であろう。よって、本発明の好ましい構築物は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域と、ＶＬ領域および／またはＶＨ領域とに加えて、ＣＨ１領域およびＣＬ領域、好ましくは、ＩｇＡ抗体に対応または由来するＣＨ１領域およびＣＬ領域を備えている。他の好ましい実施形態では、これらのドメインは、ＩｇＧ抗体に由来するであろう。よって、本発明の好ましい構築物は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域と、ＶＬ領域および／またはＶＨ領域とに加えて、ＣＨ１領域およびＣＬ領域、好ましくは、ＩｇＧ抗体に対応または由来するＣＨ１領域およびＣＬ領域を備えている。

【０１４０】

このような定常領域のための適切な配列は、当該技術分野において周知であり、文書化されている。

【０１４１】

重鎖および軽鎖由来の定常領域の完全な相補体が本発明の構築物に含まれる場合、このような構築物は、典型的には「全長」抗体または「全」抗体を含むものと称される。好ましい実施形態では、タンパク質構築物は、全（または全長）抗体、好ましくは、全（または全長）ＩｇＡ抗体を含む。二本の重鎖および二本の軽鎖を含む「全」または「全長」抗体は、一部の実施形態において好ましい。全長ＩｇＡ抗体が含まれる場合、当該全長Ｉｇ

Ａ抗体のＩｇＡ　Ｆｃ領域により、請求項に記載の構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域を提供できる。

【０１４２】

しかしながら、一部の実施形態では、タンパク質構築物の抗原結合ドメインは、全抗体または全長抗体を含まない。一部の実施形態では、タンパク質構築物は、抗体の抗原結合断片、好ましくは、ＩｇＡ抗体の断片を含む。他の好ましい実施形態では、ＩｇＧ抗体の断片を使用することができる。このような抗原結合断片は、３つまたは６つのＣＤＲを含んでもよく、例えば、ｓｄＡｂ抗体またはｓｃＦｖ抗体またはＦｖ抗体であってもよいし、また、ＣＨ１領域および／またはＣＬ領域を含んでもよく、例えば、Ｆａｂ断片であってもよい。抗体の適切な抗原結合断片およびフォーマットが当該技術分野において公知であり、これらのいずれを使用してもよい。好都合なことに、本発明のタンパク質構築物は２つの抗原結合ドメイン（または他の標的指向化ドメイン）を含み、これらは１つずつＩｇＡ　Ｆｃ領域／ＩｇＡ　Ｆｃ断片の各鎖に繋ぎ合わせまたは結合されているため、例えば、抗原結合ドメインは、Ｆａｂ２断片の形態とすることができる。実際、一部の実施形態、例えば、本明細書中の他の箇所に記載されているような本発明の伸長型構築物では、例えば、当該構築物のＩｇＡ　Ｆｃ領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域とを結合する中間物として、本明細書中の他の箇所に記載されているＣＨ１ドメイン（または代替の構造的なタンパク質配列、単位、もしくはドメイン）または伸長リンカー配列の存在と併用する場合、ＩｇＧのＦａｂ２断片、例えば、ＩｇＧ１のＦａｂ２断片の使用が好ましい。これら２つの抗原結合ドメイン（または他の標的指向化ドメイン）は、同一であっても異なっていてもよい。同様に、１つの抗原結合ドメイン（または他の標的指向化ドメイン）のみを使用することが可能であり、例えば、これをＩｇＡ　Ｆｃ領域／断片の一方の鎖にのみ結合することができる。

【０１４３】

タンパク質構築物が、例えば、ｓｄＡｂ（例えば、ナノボディ抗体もしくはV_HH抗体、またはＶＨ抗体もしくはＶＬ抗体）またはｓｃＦｖ断片のような、単一のポリペプチド鎖で構成される抗原結合断片または標的指向化ドメインを含む一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、二本のポリペプチド鎖を含む（またはそれらからなる）ことができる。

【０１４４】

タンパク質構築物が、二本のポリペプチド鎖で構成される抗原結合断片または標的指向化ドメイン、例えば、Ｆａｂ断片を含むか、あるいは、例えば、全長抗体によって提供される一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、四本のポリペプチド鎖を含む（またはそれらからなる）ことができる。

【０１４５】

よって、本発明によれば、タンパク質構築物は、ＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域を構成（または形成）する、例えば、本発明の構築物中に存在する、隣接する、または融合されたタンデムなＦｃ領域を構成（または形成）する、二本のポリペプチド鎖を含む（またはそれらからなる）。

【０１４６】

一部の実施形態では、本発明の構築物に使用するための抗体（または抗原結合断片）は、（例えば、ＩｇＧ抗体または他のクラスの抗体から）ＩｇＡフォーマット（例えば、ＩｇＡ１またはＩｇＡ２フォーマット）へと再フォーマットされている。よって、一部の実施形態では、前記抗体（または抗原結合断片）は、非ＩｇＡ抗体の抗原結合ドメイン（例えば、非ＩｇＡ抗体の抗原結合ドメイン、例えば、ＩｇＧ抗体の抗原結合ドメインから得られた、もしくはそれに由来する、もしくはそれをベースとするもの）を含むＩｇＡ抗体である。抗体をＩｇＡフォーマットに再フォーマットする方法は、当該技術分野においては周知であり、当業者であればそのような方法に通じているであろう。

【０１４７】

一部の実施形態では、本発明の構築物に使用するためのＩｇＡ抗体（またはその抗原結

合断片）は、単量体の形態を維持するため（例えば、二量体化を防ぐため）に改変（または変異導入）されている。この観点から適切な改変としては、本明細書中の他の箇所に記載されているように、改変（または変異導入または不活性化または切断）された尾部を有するＩｇＡ抗体、または尾部を含まない（または尾部が除去された）ＩｇＡ抗体が挙げられる。

【０１４８】

好ましい実施形態では、本発明の構築物に使用するための標的指向化ドメイン、例えば、受容体、受容体ドメイン、リガンド、受容体リガンド、抗原結合ドメイン、抗体（またはその抗原結合断片）を構成する配列は、ヒト配列である。これに関し、ヒト配列、例えば、ヒト抗体は、一般的にヒトの療法に使用する上で有望な利点を有し、例えば、ヒト免疫系は、当該抗体を異物として認識しないはずである等が挙げられる。

【０１４９】

他の好ましい実施形態では、本明細書中の他の箇所に示すように、好ましいＩｇＡ　Ｆｃ領域および／またはＩｇＧ　Ｆｃ領域は、ヒトＦｃ領域である。

【０１５０】

抗体分子に関連して本明細書中で使用する「ヒト」という用語は、可変領域（例えば、V_H領域、V_L領域、ＣＤＲ領域、またはＦＲ領域）および好ましくは定常抗体領域を有する抗体であって、ヒトレパートリーから単離された、もしくはヒトレパートリーに由来する、または、ヒトもしくはヒトレパートリー中、例えば、ヒト生殖細胞もしくはヒト体細胞中、または体液中、またはファージディスプレイライブラリ等のヒト抗体ライブラリー中に見出される配列に由来または対応するものを指す。同様に、標的指向化ドメイン（または結合性タンパク質）またはＦｃ領域に関連して本明細書中で使用する「ヒト」という用語は、ヒトから単離された、もしくはヒトに由来する、または、ヒト中、例えば、ヒト生殖細胞もしくはヒト体細胞中に見出される配列に対応するタンパク質配列を指す。よって、このようなヒト配列は、ヒト試料、例えば、ヒト体液またはヒト細胞から取得可能である。また、ヒト化配列、例えば、ヒト化標的指向化ドメイン、抗原結合ドメイン、抗体もしくは抗体断片、またはヒト化Ｆｃ領域も、構築物に使用することができる。

【０１５１】

非抗体または非免疫グロブリンベースの標的指向化ドメインまたは結合性タンパク質もまた、本発明の構築物に使用することができ、それ自体で特定の標的分子または標的抗原に特異的に結合する能力のために選択することができる。このような分子は、抗体ミミック（または抗体ミメティック）とも称される。適切な非免疫グロブリンベースの標的指向化ドメインまたは結合性タンパク質の例は、当該技術分野で公知でありかつ報告されており、以下が挙げられる：Ａｄｎｅｃｔｉｎ（例えば、Ｃｏｍｐｏｕｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，　Ｉｎｃ．社，ウォルサム、マサチューセッツ州）等の、例えば、フィブロネクチンタイプＩＩＩドメインの１０番目のモジュールに基づくフィブロネクチン（またはフィブロネクチンをベースとする分子）；ａｆｆｉｍｅｒ（例えば、Ａｖａｃｔａ社）；アンキリン反復タンパク質（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐａｒｔｎｅｒｓ　ＡＧ社、チューリッヒ、スイス）；リポカリン、例えば、アンティカリン（ａｎｔｉｃａｌｉｎ）（例えば、Ｐｉｅｒｉｓ　Ｐｒｏｔｅｏｌａｂ　ＡＧ社、フライジング、ドイツ）；ヒトＡドメイン（例えば、Ａｖｉｍｅｒｓ社）；ブドウ球菌プロテインＡ（例えば、Ａｆｆｉｂｏｄｙ　ＡＧ社、スウェーデン）；チオレドキシン；およびガンマ－Ｂ－クリスタリンまたはユビキチンをベースとする分子、例えば、アフィリン（ａｆｆｉｌｉｎ）（例えば、Ｓｃｉｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ＧｍｂＨ社、ハレ、ドイツ）。上述のように、このような分子は、標的抗原結合を媒介する適切なＣＤＲをグラフトする足場としても使用できる。例えば、適切な免疫グロブリンベースの標的指向化ドメインまたは結合性タンパク質のＣＤＲは、適切な非免疫グロブリンの足場にグラフトすることができる。

【０１５２】

一般的には、前記標的指向化ドメインは、本発明の構築物のＮ末端側終端部またはＮ末端領域に位置する。よって、好ましい実施形態では、前記標的指向化ドメインは、構築物

のＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端側に結合されており、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端またはＮ末端側終端部に結合されている。このような結合は、直接的な結合、または、本明細書中の他の箇所に記載されているように、例えば、リンカーを介した、好ましくは抗体ヒンジ領域を介した、間接的な結合とすることができる。もちろん、標的指向化ドメインのその標的への結合能が、本発明の構築物に組み込まれても保持される（または有意に影響されない）ことが重要である。

【０１５３】

標的指向化ドメインが結合する好ましい標的分子は、治療的（または臨床的）に関連する標的タンパク質（または標的抗原）である。よって、一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、標的指向化ドメインによって疾患関連標的タンパク質（または標的抗原）に結合する。疾患関連標的タンパク質（または標的抗原）は、その発現（例えば、望ましくない発現または異常発現または過剰発現）が疾患に関連する標的タンパク質（または抗原）であってもよい。一部の実施形態では、前記疾患は、癌（または腫瘍）であり、例えば、乳癌のような固形腫瘍、または血液癌である。あるいは、前記疾患は、病原体によって、例えば、細菌等の感染性病原体によって引き起こされる。

【０１５４】

よって、一部の実施形態では、前記標的指向化ドメインは、所定の癌（または腫瘍）タンパク質または抗原（例えば、癌特異的タンパク質もしくは癌特異的抗原、または癌関連タンパク質もしくは癌関連抗原、または腫瘍特異的タンパク質もしくは腫瘍特異的抗原、または腫瘍関連タンパク質もしくは腫瘍関連抗原）に結合する。一部の実施形態において、前記癌は、乳癌である。他の実施形態において、前記標的指向化ドメインは、感染性因子、例えば、細菌に関連するタンパク質または抗原に結合する。

【０１５５】

よって、一部の実施形態では、前記標的指向化ドメイン、例えば、前記抗原結合ドメインは、癌細胞上または感染性病原体上の標的分子に結合する。好ましくは、前記癌細胞は、固形腫瘍または血液癌由来である、または、前記感染性病原体は、細菌である。一部の実施形態では、前記癌または固形腫瘍は、乳癌である。

【０１５６】

例示的な癌関連標的は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体のメンバーである。よって、一部の実施形態では、本発明の構築物、例えば、標的指向化ドメイン（例えば、抗原結合ドメイン）を含む構築物は、ＨＥＲ２に結合する。ＨＥＲ２タンパク質の過剰発現は、ある種の乳癌の発症および進行において、重要な役割を果たし得る。

【０１５７】

一部の実施形態では、本発明の構築物は、抗ＨＥＲ２抗体の抗原結合ドメインを含み、例えば、抗体トラスツズマブを含む。

【０１５８】

さらに別の例示的な癌関連標的であり、例えば、癌性Ｂ細胞株と関連し、よって血液癌の治療に適切な癌関連標的として、ＣＤ２０が挙げられる。よって、一部の実施形態では、本発明の構築物、例えば、標的指向化ドメイン（例えば、抗原結合ドメイン）を含む構築物は、ＣＤ２０に結合する。よって、好ましい構築物は、抗ＣＤ２０抗体またはその抗原結合断片を含む。ＣＤ２０タンパク質の過剰発現は、ある種の血液癌、特に、Ｂ細胞が関与する癌の発症および進行において、重要な役割を果たし得る。

【０１５９】

別の態様では、本発明は、タンパク質（好ましくは、ＩｇＡ抗体もしくはその断片、または本明細書に記載の代替の標的指向化ドメイン）のインビボ半減期（例えば、血漿中半減期または血清中半減期）を延長する方法であって、当該タンパク質等を、本発明のタンパク質構築物に組み込む（好ましくは、例えば、ＩｇＡ　Ｆｃ領域のＮ末端に結合している当該構築物のＮ末端側終端部に組み込む）こと、または、本発明のタンパク質構築物（または上述のようなポリペプチド単位）を、前記タンパク質等に（好ましくは、前記タンパク質のＣ末端側終端部に）繋ぎ合わせることを含む。本発明の他の態様および好ましい

実施形態のタンパク質およびタンパク質構築物の種々の特徴に関する記載は、本発明のこの態様にも、必要な変更を加えて適用される。

【０１６０】

本発明の構築物に使用するＦｃ領域は、任意の供給源または種から取得できるか、由来するか、または任意の供給源または種からのＦｃ領域に対応することができ、あるいは、Ｆｃ受容体への結合能またはエフェクター機能の誘導能が保持されることを条件として、その断片またはバリアントとすることができる。哺乳動物の供給源または種が好ましく、任意の適切な哺乳動物の供給源または種を使用すればよく、例えば、ヒトまたは任意の畜産動物、家畜、もしくは実験動物が使用できる。具体例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、および非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）が挙げられる。ただし、前記哺乳動物は、ヒトであることが好ましい。様々な種由来のＦｃ領域の配列が当該技術分野で公知であり、よって、本発明で使用するための適切なＦｃ領域は、標準的な技術、例えば、組換え技術により容易に生成または製造できる。

先の記載は、本発明のタンパク質構築物を説明することに焦点を当てているが、前記タンパク質構築物は、このようなタンパク質構築物の全部または一部をコードする適切な核酸分子を使用して簡便に調製または製造されるであろう。

【０１６１】

よって、本発明のタンパク質構築物、例えば、本明細書中で定義される組換えタンパク質構築物、またはその部分（例えば、タンパク質構築物の単鎖または第１鎖もしくは第２鎖）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、例えば、１つ以上の核酸分子（例えば、核酸分子のセット）は、本発明のさらに別の態様を成すことがわかるであろう。このような核酸分子を、例えば、１つ以上含む発現ベクター、および前記発現ベクターまたは核酸分子またはタンパク質構築物を含む宿主細胞は、さらに別の態様を成す。

【０１６２】

典型的には、本発明のタンパク質構築物をコードする前記１つ以上の核酸断片が、当該タンパク質構築物、例えば、組換えタンパク質構築物の製造を容易にするために、１つ以上の適切な発現ベクターに組み込まれる。

【０１６３】

したがって、本発明は、本発明の１つ以上（またはセットの）核酸分子と、本発明の当該核酸分子によってコードされるタンパク質配列の転写および翻訳に必要な調節配列とを含有する、もしくは含む、発現ベクター、例えば、１つ以上の発現ベクター、例えば、１つ以上の組換え発現ベクターを企図している。前記ベクターは、抗生物質耐性および当該ベクターの複製を可能にする配列をさらに含んでもよい。好適なベクターおよび調節配列は、当業者には周知であろう。

【０１６４】

本発明の発現ベクター、例えば、組換え発現ベクター、または本発明の核酸分子は、宿主細胞に導入することで形質転換された宿主細胞を製造することができる。「で形質転換された」、「でトランスフェクトされた」、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、当該技術分野で公知の多くの可能な技術の１つによる細胞への核酸（例えば、ベクター）の導入を包含することを意図している。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクトするための好適な方法が、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９）およびその他の実験用テキストに記載されている。

【０１６５】

好適な宿主細胞としては、多種多様な真核宿主細胞および原核細胞が挙げられる。例えば、本発明の分子は、酵母細胞、または哺乳動物細胞、または大腸菌もしくはピキア・パストリス等の原核細胞において発現させることができる。

【０１６６】

本発明のタンパク質構築物および核酸分子は、一般的には「単離された」または「精製された」ものである。「単離された」または「精製された」という用語は、典型的には、それが由来する、または産生される供給源からの細胞物質または他のタンパク質（もしくは他の核酸）を実質的に含まないタンパク質または核酸を指す。

【０１６７】

本発明のタンパク質構築物は当該技術分野で周知の記載されている数種類の方法のいずれで調製してもよいが、組換え法を用いた調製が最も好ましいことを、当業者であれば理解するであろう。例えば、構築物の各種構成要素は、単一のポリペプチド鎖または複数のポリペプチド鎖上に適宜コードすることができ、その後、前記各種構成要素を接合または連結するか、または前記複数のポリペプチド鎖が他の方法で互いに会合して本発明のタンパク質構築物を形成する。

【０１６８】

よって、本発明のさらに別の態様は、本発明のタンパク質構築物を製造する方法であって、本発明の宿主細胞を培養する工程を含む方法を提供する。好ましい方法は、（ｉ）本発明の１つ以上の発現ベクターまたは本発明の１つ以上の核酸配列を含む宿主細胞を、コードされたタンパク質構築物の発現に適した条件下で培養する工程と、（ｉｉ）発現されたタンパク質構築物を、前記宿主細胞または増殖培地／上清から単離または取得する任意の工程、とを含む。このような製造方法は、タンパク質産物を精製する工程および／またはタンパク質産物を薬学的に許容可能な担体または賦形剤等の追加成分を少なくとも１つ含む組成物へと製剤化する工程をさらに含んでもよい。

【０１６９】

本発明の好ましいタンパク質構築物は、一般的に、二本の同一ポリペプチド鎖（例えば、標的指向化ドメインが、存在しないか、または単鎖抗体等の単一のポリペプチド鎖である場合）または一対の同一ポリペプチド鎖（例えば、前記標的指向化ドメインが、別個の重鎖および軽鎖を有する抗体または抗体断片等、二本のポリペプチド鎖で構成される場合）を含むため、よって、このような実施形態では、単一または二本のポリペプチド鎖が、適宜、宿主細胞内で発現され、本発明の完全なタンパク質構築物を当該宿主細胞内で構築し、そこから単離または精製することができる。本発明のタンパク質構築物は、当業者に周知の標準的な方法によって製造、精製、または単離することができる。

【０１７０】

本発明はまた、本発明のタンパク質構築物を、本発明の構築物中に存在するいずれの標的指向化ドメインとも異なる少なくとも１つの他の薬剤（例えば、治療剤）に機能的に有効となるように繋ぎ合わせた様々な複合タンパク質およびその断片を提供する。「免疫複合体」という用語は、タンパク質構築物と他の有効な薬剤（例えば、治療剤）との機能的に有効な関連を定義するために広く使用される。組換え融合タンパク質が、特に企図されている。標的指向化ドメインが標的に結合可能であり、他の薬剤が送達時に十分に機能する限り、繋ぎ合わせの様式は好適であろう。

【０１７１】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質構築物は、免疫複合体化していないその「裸の」形態、例えば、標的指向化ドメインを、タンデムなＩｇＡ　Ｆｃ領域およびＩｇＧ　Ｆｃ領域と共に含む形態で使用（例えば、治療的に使用）される。

【０１７２】

本発明のタンパク質構築物（または本発明の１つ以上の核酸分子、または本発明の発現ベクター、または本発明の免疫複合体）を含む組成物は、本発明のさらに別の態様を成す。１つ以上の本発明のタンパク質構築物（または１つ以上の本発明の核酸分子、または１つ以上の本発明の発現ベクター、または１つ以上の本発明の免疫複合体）を、好適な希釈剤、担体、または賦形剤との混合物中に含む製剤（組成物）は、本発明の好ましい実施態様を構成する。このような製剤は、医薬用であってもよく（医薬組成物であり）、よって、本発明の組成物は、薬学的に許容可能な組成物であることが好ましい。好適な希釈剤、賦形剤、および担体は、当業者に公知である。

【０１７３】
本発明の組成物は、例えば、経口投与、経鼻投与、非経口投与、静脈内（ｉｎｔｒａｖｅｎａｌ）投与、局所投与、または直腸投与に好適な形態としてもよい。特に記載しない限り、投与は典型的には非経口経路で行われ、好ましくは、皮下注射、筋肉内注射、嚢内注射、髄腔内注射、腹腔内注射、腫瘍内注射、経皮注射、または静脈注射によって行われる。一部の実施形態では、皮下投与が好ましい。
【０１７４】
本明細書中で定義する本発明の組成物は、被覆錠剤、鼻腔スプレーもしくは肺スプレー、溶液、リポソーム、粉末、カプセル、または徐放性形態等、従来の薬学的投与形態としてもよい。これらの形態の調製には、従来の製薬用賦形剤、ならびに通常の製造方法を使用すればよい。
【０１７５】
注射液は、例えば、好適な保存剤または安定剤の添加等、従来の方法で製造すればよい。その後、前記溶液を注射用のバイアルまたはアンプルに充填する。
【０１７６】
点鼻薬も、同様に水溶液で製剤化すればよく、エアゾール噴射剤と共にスプレー容器に充填するか、または手動圧縮手段を備えたスプレー容器に充填する。
【０１７７】
非経口投与は、注射器、任意選択的にペン型注射器を用いて、皮下注射、筋肉内注射、または静脈注射により行ってもよい。あるいは、非経口投与は、輸液ポンプにより行うことができる。別の選択肢としては、分子またはタンパク質構築物を鼻腔スプレーまたは肺スプレーの形態で投与するための、粉末または液体であってもよい組成物が挙げられる。さらに別の選択肢として、本発明の分子またはタンパク質構築物は、例えば、パッチから、任意選択的にイオン導入パッチから経皮投与することも可能であるし、または、経粘膜投与、例えば、頬側投与（ｂｕｃａｌｌｙ）することも可能である。
【０１７８】
好適な投与単位は、当業者が決定できる。
【０１７９】
前記医薬組成物は、同時投与レジメンまたは併用レジメンに関しては、さらに別の有効成分（例えば、本明細書中の他の箇所に記載されているもの）を追加で含んでもよい。
【０１８０】
本明細書で定義される本発明のタンパク質構築物は、インビトロまたはインビボでの適用およびアッセイのための分子ツールとして使用してもよい。よって、本発明のさらなる態様は、本明細書で定義される本発明のタンパク質構築物（または他の分子）を含む試薬、およびそのようなタンパク質構築物（または他の分子）の、例えば、インビトロまたはインビボでのアッセイにおける分子ツールとしての使用を提供する。
【０１８１】
本発明のさらなる態様は、療法に使用するための本発明のタンパク質構築物（例えば、標的指向化ドメインを含む構築物、例えば、ＩｇＡ抗体またはその断片を含む構築物）を提供する。療法には、治療（例えば、既存の疾患の治療）または予防（予防処置（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ））が含まれる。一部の実施形態では、既存の疾患の積極的治療が好ましい。
【０１８２】
一部の実施形態では、本発明は、所定の標的または抗原に結合する標的指向化ドメイン、例えば、受容体、受容体ドメイン、リガンド、受容体リガンド、または抗原結合ドメインを含む本発明のタンパク質構築物（例えば、ＩｇＡ抗体もしくはＩｇＧ抗体またはその断片を含む構築物）であって、例えば、細胞表面における前記標的または抗原の発現（例えば、前記標的または抗原の望ましくないまたは異常な発現）によって特徴付けられる（またはこれに関連する）疾患の治療に使用するためのタンパク質構築物を提供する。
【０１８３】

例えば、一部の実施形態では、本発明は、所定の癌（または腫瘍）抗原（例えば、癌特異的抗原または癌関連抗原または腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原）に結合する標的指向化ドメイン、例えば、受容体、リガンド、または抗原結合ドメインを含む、本発明のタンパク質構築物（例えば、ＩｇＡ抗体もしくはＩｇＧ抗体またはその断片を含む構築物）であって、癌（または腫瘍）の治療に使用するためのタンパク質構築物を提供する。一部の実施形態では、癌または腫瘍抗原は、ＣＤ２０であり、使用される標的指向化ドメインは、ＣＤ２０に結合するものである。

【０１８４】

例えば、一部の実施形態では、本発明は、病原体によって発現される所定の分子または抗原（例えば、病原体特異的抗原または病原体関連抗原）に結合する標的指向化ドメイン、例えば、受容体、リガンド、または抗原結合ドメインを含む本発明のタンパク質構築物（例えば、ＩｇＡ抗体もしくはＩｇＧ抗体またはその断片を含む構築物）であって、前記病原体に起因または関連する感染症の治療に使用するためのタンパク質構築物を提供する。好ましい感染性病原体は、細菌である。

【０１８５】

一部の実施形態では、本発明は、Ｈｅｒ２タンパク質に結合する標的指向化ドメイン、例えば、受容体、受容体ドメイン、リガンド、受容体リガンド、または抗原結合ドメインを含む、本発明のタンパク質構築物（例えば、ＩｇＡ抗体もしくはＩｇＧ抗体またはその断片を含む構築物）であって、Ｈｅｒ２陽性癌、例えば、Ｈｅｒ２陽性乳癌の治療に使用するためのタンパク質構築物を提供する。一部の実施形態では、抗原結合ドメイン（ＶＬドメインおよびＶＨドメイン）は、抗体トラスツズマブであるか、または抗体トラスツズマブをベースとする。

【０１８６】

他の実施形態では、本発明は、経粘膜送達に使用するための本発明のタンパク質構築物を提供するものであり、例えば、本明細書に記載されているような治療目的での使用は、適切な投与経路による、例えば、鼻腔内投与または肺内投与による本発明のタンパク質構築物の経粘膜送達によって行われる。

【０１８７】

別の態様において、本発明は、療法、例えば、本明細書中の他の箇所に記載されているような療法に使用するための本発明の免疫複合体を提供する。

【０１８８】

本発明はさらに、療法に使用するため、または上述の疾患もしくは状態のいずれかの治療もしくは予防に使用するための医薬品または組成物の製造における、本発明のタンパク質構築物の使用、好ましくは、本発明の組換えタンパク質構築物の使用を提供する。

【０１８９】

本発明はさらに、上述の疾患または状態のいずれかの治療または予防の方法であって、治療有効量の本発明のタンパク質構築物、好ましくは組換えタンパク質構築物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法を提供する。

【０１９０】

本明細書中の他の箇所に記載されているような、本発明の代替的かつ好ましい実施形態および特徴は、特に治療的使用に関し、これら本発明の治療方法および使用にも同様に当てはまる。

【０１９１】

本発明の核酸分子または発現ベクターは、本明細書に記載の治療方法または使用においても、同様に使用できる。

【０１９２】

本発明による疾患または状態の治療（例えば、既存の疾患の治療）には、前記疾患または状態の治癒、あるいは、疾患の何らかの軽減もしくは緩和（例えば、疾患の重症度の軽減）または疾患の症状の何らかの軽減もしくは緩和が含まれる。

【０１９３】

本明細書中の他の箇所の開示から明らかとなるように、本発明の方法および使用は、疾患の予防、ならびに疾患の積極的治療（例えば、既存疾患の治療）に好適である。よって、予防的治療もまた、本発明に包含される。このため、本発明の方法および使用において、治療には、適切な場合、予防処置または予防も含まれる。

このような予防的（または保護的）な態様は、健康もしくは正常な、またはリスクのある対象に対し、簡便に実施することができ、完全な予防および有意な予防の両方を含むことができる。同様に、有意な予防とは、疾患の重症度または疾患の症状が、治療が施されなかった場合に予想される重症度または症状と比べて軽減される（例えば、測定可能または有意に軽減される）シナリオを含み得る。

【０１９４】

本発明のタンパク質構築物および組成物および方法および使用は、他の治療薬または治療剤と併用することができる。

【０１９５】

よって、本発明の「併用」実施形態には、例えば、本発明のタンパク質構築物を、当該タンパク質構築物に機能的に有効となるように繋ぎ合わせられていない薬剤または治療剤と併用する場合が含まれる。本発明の他の「併用」実施形態では、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質構築物自体を、併用する薬剤または治療剤に、機能的に有効となるように関連させた、または組み合わせた免疫複合体である。機能的に有効となるような繋ぎ合わせには、本明細書中に記載され、かつ当該技術分野で公知である直接および間接的なあらゆる繋ぎ合わせの形態が含まれる。

【０１９６】

したがって、本発明は、生物学的有効量の少なくとも本発明の第１のタンパク質構築物と、生物学的有効量の少なくとも第２の生物学的薬剤とを、任意選択的に少なくとも第１の組成物または容器中に含む、組成物、医薬組成物、治療用キット、および医薬品カクテルを提供する。前記「少なくとも第２の生物学的薬剤」は、多くの場合、治療剤であるが、そうである必要はない。

【０１９７】

前記少なくとも第２の生物学的薬剤として治療剤が含まれる場合、このような治療薬は、典型的には、前記で定義した障害の１つ以上の治療に関連した使用のためのものであろう。

【０１９８】

よって、特定の実施形態では、「少なくとも第２の治療剤」は、前記治療用キットまたはカクテルに含まれるであろう。当該用語は、本発明のタンパク質構築物が第１の治療剤であることに鑑みて選択されている。

【０１９９】

本発明の特定の実施形態において、前記第２の治療剤は、放射線治療剤、化学療法剤、血管新生阻害剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン剤、抗細胞剤もしくは細胞傷害性剤、ステロイド、サイトカイン拮抗剤、サイトカイン発現阻害剤、ケモカイン拮抗剤、ケモカイン発現阻害剤、ＡＴＰアーゼ阻害剤、抗炎症剤、シグナル経路阻害剤、チェックポイント阻害剤、抗癌剤、その他の抗体、または凝固剤であってもよい。

【０２００】

一般的に言えば、前記少なくとも第２の治療剤は、本発明のタンパク質構築物と実質的に同時に対象に投与してもよく、例えば、単一の薬学的組成物からの投与、または、隔たりなく一緒に投与される２つの薬学的組成物からの投与等が挙げられる。

【０２０１】

あるいは、前記少なくとも第２の治療剤は、本発明のタンパク質の投与と順次的に対象に投与することができる。本明細書中で使用する「順次的に」とは、少なくとも第２の治療剤が、本発明のタンパク質構築物の投与とは異なる時間に対象に投与されるように「ずらして（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ）」投与することを意味する。一般的に、前記２つの薬剤は、当該２つの薬剤がそれぞれの治療効果を発揮することを可能にするために効果的な時間

間隔で投与される、すなわち、これらは「生物学的に有効な時間間隔」で投与される。前記少なくとも第２の治療剤は、本発明のタンパク質の投与前の生物学的に有効な時期、または本発明のタンパク質投与後の生物学的に有効な時期に対象に投与すればよい。

【０２０２】

本明細書に記載されるインビボでの方法および使用（例えば、治療目的での使用）は、一般的に、哺乳動物で実施される。例えば、ヒトおよび畜産動物、家畜、または実験動物等、あらゆる哺乳類を治療し得る。具体例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、およびサル（例えば、カニクイザル）が挙げられる。ただし、前記哺乳動物は、ヒトであることが好ましい。よって、本明細書で使用される用語「患者」または「対象」は、そのような哺乳動物を含む。よって、本発明により治療される対象または患者は、ヒトが好ましいであろう。

【０２０３】

治療有効量は、臨床的評価に基づいて決定されるであろうし、かつ、容易に監視できる。

【０２０４】

本発明の組成物および方法および使用は、他の治療薬または診断薬と併用してもよい。

【０２０５】

本発明はさらにキットを含み、当該キットは、本発明のタンパク質構築物（もしくは免疫複合体）もしくは組成物を１つ以上、または本発明のタンパク質構築物をコードする核酸分子を１つ以上、または本発明の核酸分子を含む発現ベクター、例えば、組換え発現ベクターを１つ以上、または前記発現ベクター、例えば、組換え発現ベクター、もしくは本発明の核酸分子を含む宿主細胞を１つ以上を含む。好ましくは、前記キットは、本明細書に記載の方法および使用、例えば、本明細書に記載の治療方法に使用するためのキットであるか、または本明細書に記載のインビトロアッセイもしくはインビトロ方法に使用するためのキットである。好ましくは、前記キットは、キットの構成品の使用説明書を含む。好ましくは、前記キットは、本明細書中の他の箇所に記載されているような疾患の治療または予防のためのものであり、任意選択的に、このような疾患の治療または予防のためのキットの構成品の使用説明書を含む。

【０２０６】

本出願全体を通して使用される「ａ」および「ａｎ」という用語は、当該用語の後に上限が具体的に記載されている場合を除き、言及されている構成要素または工程の「少なくとも１つ」、「少なくとも第１の」、「１つ以上」、または「複数」を意味するものとして使用されている。

【０２０７】

さらに、「ｃｏｍｐｒｉｓｅ（含む）」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ（含む）」、「ｈａｓ（有する）」もしくは「ｈａｖｉｎｇ（有する）」、または他の同等の用語が本明細書中で使用される場合、一部のより具体的な実施形態では、これらの用語には、「ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｏｆ（からなる）」もしくは「ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ（本質的に～からなる）」または他の同等の用語が包含される。特定の工程を含む方法は、適切な場合、これらの工程からなる方法も含む。

【０２０８】

本明細書に記載の「増加（ｉｎｃｒｅａｓｅ）」または「強化（ｅｎｈａｎｃｅ）」または「向上（ｉｍｐｒｏｖｅ）」という用語（または同等の用語）には、適切な対照と比較した場合におけるあらゆる測定可能な増加または上昇が含まれる。適切な対照は、当業者であれば容易に特定すると考えられ、適切な例が本明細書に記載されている。前記増加は、適切な対照でのレベルまたは値と比べた場合に、有意、例えば、臨床的または統計的に有意とされ、例えば、確率値０．０５未満または０．０５以下で、有意、例えば、臨床的または統計的に有意とされることが好ましい。

【０２０９】

本明細書に記載の「減少（ｄｅｃｒｅａｓｅ）」または「低下／軽減（ｒｅｄｕｃｅ）

」という用語（または同等の用語）には、適切な対照と比べた場合に測定可能な減少または低下／軽減が含まれる。適切な対照は、当業者であれば容易に特定すると考えられ、適切な例が本明細書に記載されている。前記減少は、適切な対照でのレベルまたは値と比べた場合に、有意、例えば、臨床的または統計的に有意とされ、例えば、確率値０．０５未満または０．０５以下で、有意、例えば、臨床的または統計的に有意とされることが好ましい。

【０２１０】

特定のパラメーターのレベルまたは値の差の統計的有意性を決定する方法は、当該技術分野において周知であり、文書化されている。例えば、本明細書では、減少または増加が一般的に統計的に有意であるとみなされるのは、スチューデントｔ検定、マン・ホイットニーＵ順位和検定、カイ二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定、一元配置分散分析検定または二元配置分散分析検定等の有意性検定を適宜用いた統計的比較が、０．０５未満または０．０５以下の確率値を示す場合である。

【０２１１】

本明細書に開示されるアミノ酸配列の一部のリストおよびそれらの配列ＩＤ（配列番号）

【表１－１】

表1

配列番号	説明	配列
重鎖配列		
1	IgG1 重鎖(ヒト)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
2	IgG2 重鎖(ヒト)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
3	IgG3 重鎖(ヒト)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLS PG
4	IgG4 重鎖(ヒト)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCSAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
5	IgA1 重鎖(ヒト), 尾部なし	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWS ESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSV TCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHP RLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSG KSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAY PESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCL ARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTF AVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA
6	IgA2 重鎖(ヒト), 尾部なし	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWS ESGQNVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSV TCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLL LGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDL CGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITK SGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVR WLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAED WKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA

【表１－２】

7	IgG1 重鎖(ヒト) - REW	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVEHEALHWHYTQKSLSLSPG
8	IgG2 重鎖(ヒト) - REW	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHRDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVEHEALHWHYTQKSLSLSPG
9	IgG3 重鎖(ヒト) - REW	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHRDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVEHEALHWRYTQKSLSLS PG
10	IgG3 重鎖(ヒト) - REWH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHRDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVEHEALHWHYTQKSLSLS PG
11	IgG4 重鎖(ヒト) - REW	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCSAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVEHEALHWHYTQKSLSLSLG
Fc 領域(CH2 及び CH3)		
12	IgG1 ヒト Fc 領域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
13	IgG2 ヒト Fc 領域	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE

【表１－３】

		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
14	IgG3 ヒト Fc 領域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQK SLSLSPG
15	IgG4 ヒト Fc 領域	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLG
16	IgA1 ヒト Fc 領域	HPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPS SGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTA AYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLT CLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTT TFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA
17	IgA2 ヒト Fc 領域	HPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPS SGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCT AAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLT CLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTT TFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA
ヒンジ領域		
18	IgG1 ヒンジ領域	EPKSCDKTHT**C**PP**C**P
19	IgG2 ヒンジ領域	ERK**CC**VE**C**PP**C**P
20	IgG3 ヒンジ領域	ELKTPLGDTTHT**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP **C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**P
21	IgG4 ヒンジ領域	ESKYGPP**C**PP**C**S
22	IgA1 ヒンジ領域	PVPSTPPTPSPSTPPTPSPS**CC**
23	IgA2 ヒンジ領域	RVPPPPP**CC**
CH1 領域		
24	IgG1 ヒト CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKV
25	IgG2 ヒト CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTV
26	IgG3 ヒト CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRV
27	IgG4 ヒト CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRV
28	IgA1 ヒト CH1	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWS ESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSV TCHVKHYTNPSQDVTVPC
29	IgA2 ヒト CH1	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWS ESGQNVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSV TCHVKHYTNPSQDVTVPC

【表１－４】

30	IgA 尾部	PTHVNVSVVMAEVDGTCY
ジスルフィド結合に関与するシステインは太字の下線で示す		
REW＝Q311R、M428EおよびN434W置換、太字で示す		
REWH＝Q311R、M428E、N434WおよびR435H置換、太字で示す		

【０２１２】

本発明の伸長型構築物で使用するためのいくつかのＩｇＡ　Ｆｃ－ＩｇＧ　Ｆｃ融合体の例示的配列を以下に示す。これらはすべて、ＩｇＧ　ＣＨ１、ＩｇＧヒンジ、ＩｇＡ　ＣＨ２、ＩｇＡ　ＣＨ３、ＩｇＧヒンジ、ＩｇＧ　ＣＨ１、ＩｇＧヒンジ、ＩｇＧ　ＣＨ２、ＩｇＧ　ＣＨ３のフォーマットをとる。

【表２】

>IgA1-IgG1-WT (配列番号 31)
ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDASG
DLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTPSPS**C**
CHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCY
SVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNEL
VTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWK
KGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK-

【表３】

>IgA1-IgG1-REW (配列番号 32)
ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDASG
DLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTPSPS**C**
CHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCY
SVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNEL
VTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWK
KGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH**R**
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**E**HEAL
H**W**HYTQKSLSLSPGK-

【表４】

>IgA2-IgG1-WT (配列番号 33)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK-

【表 5】

>IgA2-IgG1-REW (配列番号 34)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH**R**DWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**E**HEALH**W**HYTQKSLSLS
PGK-

【表 6】

>IgA2.0-IgG1-REW (配列番号 35)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGSAQP
WNHGETFTCTAAHPELKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH**R**DWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**E**HEALH**W**HYTQKSLSLS
PGK-

【表 7】

>IgA2-IgG2-WT (配列番号 36)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAERK**CC**VE**C**PP**C**PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K-

【表 8】

>IgA2-IgG2-REW (配列番号 37)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAERK**CC**VE**C**PP**C**PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV**H**RDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**E**HEALH**W**HYTQKSLSLSPG
K-

【表９】

>IgA2-IgG4-WT (配列番号 38)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAESKYGPP**C**PP**C**SAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GK-

【表１０】

>IgA2-IgG4-REW (配列番号 39)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAESKYGPP**C**PP**C**SAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH**R**DWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV**E**HEALH**W**HYTQKSLSLSL
GK-

【表１１】

>IgA2-IgG3-WT (配列番号 40)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**CC**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAELKTPLGDTTHT**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**
PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPP
MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK-

【表１２】

>IgA2-IgG3-REWH (配列番号 41)
ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPSQDAS
GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCRVPPPPP**C**C**C**HPRLSLHRPAL
EDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAELKTPLGDTTHT**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**
PEPKS**C**DTPPP**C**PR**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH**R**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPP
MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV**E**HEALH**WH**YTQKSLSLSPGK-

【０２１３】

本発明の伸長型構築物において使用するためのいくつかのＩｇＡ　Ｆｃ－ＩｇＧ　Ｆｃ融合体の例示的配列を以下に示す。これらはすべて、ＩｇＡ　ＣＨ１、ＩｇＡヒンジ、ＩｇＡ　ＣＨ２、ＩｇＡ　ＣＨ３、ＩｇＧヒンジ、ＩｇＧ　ＣＨ２、ＩｇＧ　ＣＨ３というフォーマットをとる。

【表１３】

>IgG1Fab2-IgA2 Fc-H1-CH1-H1-IgG1Fc-WT (配列番号 42)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT**C**PP**C**PHPRLSLHRPA
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【表１４】

> IgG1Fab2-IgA2 Fc-H1-CH1-H1-IgG1Fc-REW (配列番号 43)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT**C**PP**C**PHPRLSLHRPA
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQ
PWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
KDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGH
EALPLAFTQKTIDRLAEPKSCDKTHT**C**PP**C**PASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH**R**DWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**E**HEALH**W**HYTQKSLSLSPGK

【０２１４】

次に、本発明を、以下の非限定的な実施例において、以下の図面を参照しながらさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【０２１５】
【図１】図１：抗Ｈｅｒ２抗体フォーマットの設計。ＩｇＧ１およびＩｇＡ２をベースに、４種類の抗体バリアントを製造した。ａ）尾部のないＩｇＡ２は、ＦｃαＲＩに対するＦｃ結合部位を有する。ｂ）ＩｇＧ１は、ＦｃγＲおよびＣ１ｑに対する重複結合部位を下部ヒンジおよびC_H2ドメインに有し、ＦｃＲｎに対する結合部位をC_H2-C_H3エルボー領域に有する。Ｆｃ工学操作ＩｇＧ１バリアントには、低親和性ＦｃγＲおよびＣ１ｑへの結合を消失させるが、ＦｃＲｎへの結合は消失させないＰＧＬＡＬＡ置換が含まれていた。ｃ）タンデムＩｇＧ１－ＩｇＡ２バリアントは、尾部のない、ヒンジ領域を含むＩｇＡ２－Ｆｃに融合した全長ＩｇＧ１からなる。ｄ）タンデムＩｇＡ２－ＩｇＧ１バリアントは、ヒンジ領域を含むＩｇＧ１－Ｆｃに融合した、尾部のない全長ＩｇＡ２からなる。当図はＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成した。
【図２】図２：ｐＨ依存性のヒトＦｃＲｎ結合および延長された血漿中半減期。ａ）ｐＨ５．５とｐＨ７．４で行ったＥＬＩＳＡセットアップであり、滴定量の抗体バリアントでウェルをコーティングし、続いて、ＡＬＰコンジュゲートストレプトアビジン（ＳＴＶ）と共にプレインキュベートしたビオチン化ヒトＦｃＲｎを添加した。図をわかりやすくするため、一つのタンデム配向のみを示している。当図はＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成した。ｂ）ＥＬＩＳＡの結果であり、ｐＨ５．５およびｐＨ７．４における、滴定量の抗体バリアントに対するヒトＦｃＲｎの結合を示す。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。ｃ）ＨＥＲＡの結果であり、リサイクル工程後、ＥＬＩＳＡにより培地中で検出された抗体バリアントの量を示す。各抗体をＨＭＥＣ－１細胞に３時間添加し、続いて、徹底的に洗浄し、さらに３時間インキュベートしてから、培地を回収した。代表的な実験の三連平均±標準偏差で示している。ｄ）ヒトＦｃＲｎトランスジェニック（Ｔｇ）マウスにおける血漿中半減期試験において、抗体フォーマットを静脈内投与し、血液試料の採取を１日目から２３日目まで行った。当図はＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成した。ｅ）平均値±ＳＤで示した抗体フォーマットの血漿中半減期（％）（ｎ＝５）。両側不対Ｔ検定、ｎｓ＞０．０５、＊＊＊＝ｐ＜０．００１
【図３】図３：ＩｇＡ２－ＩｇＧ２フォーマットおよびＦｃγＲＩＩＩｂの結合。ａ）ＩｇＧ２は、ＦｃγＲ、Ｃ１ｑ、およびＦｃＲｎに対する異なる結合部位を有する。ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、ヒンジ領域を含むＩｇＧ２－Ｆｃに融合した、尾部のない全長ＩｇＡ２からなる。ｂ）ｐＨ７．４で行ったＥＬＩＳＡの結果であり、ウェルに直接コーティングした滴定量の抗体バリアントに対するヒトＦｃγＲＩＩＩｂの結合を示す。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。
【図４】図４：ＩｇＡ２－ＩｇＧ１の強化されたオンターゲットＣ１ｑ結合。ａ）Ｈｅｒ２捕捉抗体バリアントへのＣ１ｑの結合を測定するために用いたＥＬＩＳＡセットアップ。結合したＣ１ｑは、ウサギ抗Ｃ１ｑ抗体を一次抗体、抗ウサギＨＲＰコンジュゲート抗体を二次抗体として用いて検出した。ｂ～ｄ）ＥＬＩＳＡの結果であり、滴定量の抗Ｈｅｒ２　ＩｇＧベースの抗体バリアントへのＣ１ｑ結合を示す。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。
【図５－１】図５：Ｈｅｒ２抗体バリアントのＦｃγＲおよびＦｃαＲＩへの結合。ａ）組換えＨｅｒ２をウェルにコーティングしてＥＬＩＳＡセットアップを行い、続いて、滴定量の抗体フォーマットを添加した。His_6×タグ付きヒトＦｃαＲＩまたは部位特異的ビオチン化ヒトＦｃγＲを添加し、抗His_6×－ＡＬＰまたはＡＬＰコンジュゲートストレプトアビジン（ＳＴＶ）でそれぞれ検出した。図をわかりやすくするため、一つのタンデム配向のみを示している。当図はＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成した。ｐＨ７．４における、ｂ）ＦｃαＲＩ、ｃ）ＦｃγＲＩ、ｄ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｒ１３１、ｅ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ１３１、ｆ）ＦｃγＲＩＩｂ、ｇ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｆ１５８、ｈ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ１５８、およびｉ）ＦｃγＲＩＩＩｂについてのＥＬＩＳＡの結果。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。
【図５－２】図５のつづき
【図６－１】図６：抗Ｈｅｒ２　ＩｇＧ２ベースの抗体フォーマットのＦｃ受容体結合能

。ＥＬＩＳＡの結果であり、当該受容体の滴定量の抗体バリアントへの結合を示す。ｐＨ７．４での、ａ）$Ｈｉｓ_{6}$×タグ付きヒトＦｃαＲＩ、部位特異的ビオチン化したもの、ｂ）ＦｃγＲＩ、ｃ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｒ１３１、ｄ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ１３１、ｅ）ＦｃγＲＩＩｂ、ｆ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｆ１５８、ｇ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ１５８、およびｈ）ＦｃγＲＩＩＩｂ。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図６－２】図６のつづき

【図７】図７：ＵＭＡＢ２　ＩｇＧ２ベースの抗体フォーマットのタンパク質の完全性（ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ）および結合特性。ａ）アフィニティー精製およびサイズ排除精製した抗体の非還元（ＮＲ）および還元（Ｒ）ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析。ｂ～ｄ）ＥＬＩＳＡにおける、抗カッパ抗体、抗Ｆｃ抗体、および抗ＩｇＡ抗体への抗体の結合。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図８】図８：カルセインＡＭに基づくアッセイにおけるＣ１ｑ結合およびＣＤＣ活性。ＥＬＩＳＡの結果であり、滴定量のａ）抗ＣＤ２０抗体バリアントおよびｂ）抗Ｈｅｒ２抗体バリアントに対するＣ１ｑ結合を示す。ｃ）ＣＤ２０発現標的細胞にカルセインＡＭを負荷し、ついでＮＨＳおよび抗体バリアントと混合し、そしてカルセイン放出によって細胞の溶解を測定するＣＤＣアッセイの概略図。図をわかりやすくするため、一つのタンデム配向のみを示している。当図はＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成した。ｄ～ｅ）ＷＳＵ－ＮＨＬおよびＳＵ－ＤＨＬ４を標的細胞とした、抗体バリアントおよびＮＨＳ存在下における、カルセイン負荷ＣＤ２０発現細胞株の特異的溶解率（％）。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図９－１】図９：抗ＣＤ２０抗体フォーマットのＦｃ受容体結合能。ＥＬＩＳＡの結果であり、当該受容体の滴定量の抗体バリアントへの結合を示す。ｐＨ７．４での、ａ）$Ｈｉｓ_{6}$×タグ付きヒトＦｃαＲＩ、部位特異的ビオチン化したもの、ｂ）ＦｃγＲＩ、ｃ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｒ１３１、ｄ）ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ１３１、ｅ）ＦｃγＲＩＩｂ、ｆ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｆ１５８、ｇ）ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ１５８、およびｈ）ＦｃγＲＩＩＩｂ。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図９－２】図９のつづき

【図１０－１】図１０：抗体バリアントのｐＨ依存性ヒトＦｃＲｎ結合。ａ～ｂ）ＥＬＩＳＡの結果であり、ｐＨ５．５およびｐＨ７．４における、滴定量の抗Ｈｅｒ２抗体バリアントに対するヒトＦｃＲｎの結合を示す。ｃ～ｄ）ＥＬＩＳＡの結果であり、ｐＨ５．５およびｐＨ７．４における、滴定量の抗ＣＤ２０抗体バリアントに対するヒトＦｃＲｎの結合を示す。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図１０－２】図１０のつづき

【図１１】図１１：カルセイン－ＡＭに基づくアッセイにおけるＲａｊｉ標的細胞に対するＣＤＣ活性。ａ～ｂ）ＵＭＡＢ２抗体バリアントおよび正常ヒト血清（ＮＨＳ）存在下でのＣＤ２０発現Ｒａｊｉ標的細胞の特異的溶解率（％）。３回の独立した実験における二連平均±標準偏差で示している。

【図１２】図１２：抗Ｈｅｒ２抗体フォーマットのＦｃγＲＩＩＩａ結合能。ＥＬＩＳＡの結果であり、Ｈｅｒ２特異的ＩｇＡ２－ＩｇＧ１およびＩｇＧ１－ＩｇＡ２タンデムフォーマットに対するＦｃγＲＩＩＩａ（Ｖ１５８アロタイプ）の結合を示している。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図１３】図１３：抗Ｈｅｒ２抗体バリアントのｐＨ依存性のＦｃＲｎ結合。ａ～ｂ）ＥＬＩＳＡの結果であり、ｐＨ５．５およびｐＨ７．４における、滴定量の抗Ｈｅｒ２抗体バリアントに対するヒトＦｃＲｎの結合を示す。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【図１４】図１４：競合の存在下でのヒトＦｃＲｎ発現マウスにおける抗体フォーマットの血漿中半減期。試験抗体の投与の２日前に、５００ｍｇ／ｋｇのＩＶＩｇを前投与したヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおける抗体バリアントの血漿中半減期。抗体バリアントを０日目に静脈内投与し、続いて、血液試料の採取を１日目から２３日目まで行った。平均±標準偏差で示している（ｎ＝５）。

【図１５】図１５：新規ＩｇＧ１／ＩｇＡ２抗体フォーマットの設計。ＣＤ２０（ＵＭＡＢ２）に特異的なＩｇＧ１およびＩｇＡ２をベースとし、２つの追加の抗体バリアントを設計した。当該フォーマットは、ＩｇＡ２　Ｆｃ（Ｃα２およびＣα３）に融合したＩｇＧ１　Ｆａｂ$_2$と、これに続くＩｇＧ１ヒンジ、ＩｇＧ１　C_H１、第３のＩｇＧ１ヒンジ、およびＣ末端ＩｇＧ１　Ｆｃ（C_H２およびC_H３）を含む。Ｃ末端のＩｇＧ１　Ｆｃは、野生型（ＷＴ）であるか、またはＲＥＷ技術によるアミノ酸置換で改変されている。

【図１６】図１６：カルセイン－ＡＭに基づくアッセイにおける、新規なＩｇＧ１／ＩｇＡ２タンデムフォーマットのＲａｊｉ標的細胞に対するＣＤＣ活性。新規なＵＭＡＢ２　ＩｇＧ１／ＩｇＡ２タンデムフォーマットおよびＮＨＳ存在下でのＣＤ２０発現Ｒａｊｉ標的細胞の特異的溶解率（％）。代表的な実験の二連平均±標準偏差で示している。

【実施例】

【０２１６】

実施例１：タンデムＩｇＡ　Ｆｃ－ＩｇＧ　Ｆｃ融合タンパク質の調製

ここでは、ＩｇＡ由来およびＩｇＧ由来、具体的にはＩｇＡ　ＦｃおよびＩｇＧ　Ｆｃ由来の構造要素を組み合わせた抗体設計パネルであって、ＦｃγＲおよびＦｃαＲＩの両方の効率的な関与を可能にする抗体設計パネルについて報告する。同時に、ＦｃＲｎによる細胞内分解から効率的にレスキューされ、このことがヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおける長い血漿中半減期につながるＩｇＡ－ＩｇＧタンデムフォーマットを特定した。このフォーマットは、全長ＩｇＡ２をＩｇＧ１－Ｆｃと組み合わせたものであり、ＣＤ２０発現Ｒａｊｉ細胞のＣＤＣ誘導殺傷の良好な誘導、およびＦｃＲｎへの良好なｐＨ依存性の結合をもたらすことが判明している。加えて、抗ＣＤ２０　ＩｇＡ２－ＩｇＧ２を、オンターゲットな六量体形成の強化のためのＦｃ工学操作戦略と組み合わせると、当該タンデムフォーマットは、ＣＤ２０発現癌Ｂ細胞株のＣＤＣ誘導殺傷の強力な誘導を生じさせた。

【０２１７】

材料および方法

抗体産生および精製

抗ＨＥＲ２トラスツズマブまたは抗ＣＤ２０　ＵＭＡＢ２由来の可変配列をコードするＤＮＡセグメント（Ｍｅｙｅｒ，　Ｓ．　ｅｔ　ａｌ．　Ｂｒｉｔｉｓｈ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｙ　１８０，　８０８－８２０　（２０１８））を、先に記載したベクターｐＥＥ１４．４－ｋａｐｐａＬＣ、ｐＥＥ１４．４－ＩｇＡ１、およびｐＥＥ１４．４－ＩｇＡ２（ｍ１）に、ＩｇＡ２－ＨＣおよびカッパＬＣコード配列と共に、フレーム内でサブクローニングした。タンデムバリアントについては、全長ＩｇＧ１－ＨＣをコードするｃＤＮＡを、前記ヒンジドメインおよび前記ＩｇＡ２－C_H２－C_H３ドメインをコードする配列と共に、フレーム内でサブクローニングした。ＩｇＡ２の尾部をコードするＤＮＡセグメントは欠失させた。前記ＩｇＡ２－ＩｇＧ１／２－Ｆｃタンデムバリアントについては、対応するヒンジ領域を含むＩｇＧ１－Ｆｃ、ＩｇＧ２－Ｆｃ、およびＩｇＧ２－Ｆｃ－ＲＥＷをコードするｃＤＮＡを、前記ＩｇＡ２－ＨＣに対応するＤＮＡと共に、フレーム内でサブクローニングした。実施例２で使用するＩｇＧ１　Ｆａｂ$_2$－ＩｇＡ２　Ｆｃ－Ｈ１－ＣＨ１－Ｈ１－ＩｇＧ１　Ｆｃ伸長型タンデムバリアントについては、全定常領域をコードするｃＤＮＡを合成し、トラスツズマブまたはＵＭＡＢ２可変領域と共に、フレーム内でサブクローニングした。

付着性のＨＥＫ２９３Ｅ懸濁細胞株およびＥｘｐｉ２９３懸濁細胞株を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００またはＥｘｐｉｆｅｃｔａｍｉｎｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）を用いて、前記ＨＣおよびＬＣをコードするベクターでそれぞれ一過性にコトランスフェクトした。回収した上清を、ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ　ＩｇＧ－C_H１を予め充填したカラム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）、またはカラム（Ａｔｏｌｌ社）に充填したＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ　ＩｇＡ親和性マトリックス（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）上に、メーカーの記載に従って供した。溶出した精製タンパク質を、リン酸緩衝生理食

塩水（ＰＢＳ）（Ｍｅｒｃｋ社）に緩衝液交換し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５ｍｌ　１００Ｋスピンカラム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用いて濃縮し、次いで、ＡＥＫＴＡ　Ａｖａｎｔ装置（Ｃｙｔｉｖａ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ社）に連結したＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００ＧＬカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を使用したサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。溶出した単量体タンパク質は、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－５　ｍｌ　１００Ｋカラム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を用いて濃縮し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）を用いて分析した。

【０２１８】

ＥＬＩＳＡ

ＥＬＩＳＡは、ＰＢＳ（１００μｌ）で希釈した抗原または抗体バリアントをＥＩＡ／ＲＩＡ　９６ウェルプレート（ＣｏｒｎｉｎｇＣｏｓｔａｒ社）にコーティングし、４℃で一晩（ＯＮ）インキュベートすることにより行った。翌日、プレートを、４％脱脂乳（Ｓ）（ＩＴＷ試薬）を含有する２５０μｌのＰＢＳ（Ｍｅｒｃｋ社）で室温（ＲＴ）で１時間ブロッキングした。その後形成される全ての層間で、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０（Ｔ）（Ｍｅｒｃｋ社）を含有する２５０μｌのＰＢＳを用いてプレートを４回洗浄した。特に記載のない限り、試料は全て、ＰＢＳ／Ｓ／Ｔで希釈した総量１００μｌを添加し、室温で１～２時間インキュベートした。

抗原結合を調べるために、組換えヒトＨｅｒ２（１．０　μｇ／ｍｌ；Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社）をウェルにコーティングし、そして、翌日に滴定量の抗体（７．０～０．００３２ｎＭ）を添加した。ＡＬＰコンジュゲート抗ヒトカッパＬＣ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）、抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃ抗体（Ｍｅｒｃｋ社）、または抗ＩｇＡ－Ｆｃ抗体（Ｍｅｒｃｋ社）を第二層として用い、当該第二層において、ジエタノールアミン緩衝液（ｐＨ９．８）に溶解したＡＬＰ基質（Ｍｅｒｃｋ社）を添加して結合を可視化した。Ｓｕｎｒｉｓｅ分光光度計（ＴＥＣＡＮ社）を用いて、４０５ｎｍで吸光度を測定した。同一のセットアップを用いてHis_6×タグ付きヒトＦｃαＲＩ（２μｇ／ｍｌ；Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社製）の結合を測定し、ＡＬＰコンジュゲートHis_6×タグ抗体（Ａｂｃａｍ社製）（１：５０００）で検出した。さらに、部位特異的ビオチン化ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ１３１、ＦｃγＲＩＩａ－Ｒ１３１、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ１５６、ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｆ１５６、およびＦｃγＲＩＩＩｂ（０．２５μｇ／ｍＬ；Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社）に対する結合を、ＡＬＰコンジュゲートストレプトアビジン（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ社）（１：１のモル比）を用いて室温で２０分間プレインキュベートさせてから、前記プレートに添加することによって行った。結合したタンパク質は、上述の方法で検出した。また、セットアップは、抗体バリアント（６６．８７ｎＭ～１．０４ｎＭ）を直接コーティングし、続いてＡＬＰコンジュゲートストレプトアビジン（１：１のモル比）でプレインキュベートしたビオチン化ＦｃγＲＩＩＩｂ（０．５　μｇ／ｍｌ）を添加することによって行った。

ヒトＦｃＲｎの結合を調べるため、滴定量（７．０ｎＭ～０．００３２ｎＭ）の抗体フォーマットをウェルにコーティングした。部位特異的ビオチン化ヒト可溶性ＦｃＲｎ（０．２５μｇ／ｍｌ；Ｉｍｍｕｎｉｔｒａｃｋ社）およびＡＬＰコンジュゲートストレプトアビジン（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）の１：１複合体を、室温で２０分間インキュベートしてから、前記プレートに添加した。結合したタンパク質を、上述の方法で可視化した。このセットアップは、ｐＨ５．５または７．４のＰＢＳ／ＴおよびＰＢＳ／Ｓ／Ｔを用いて行った。

ヒトＣ１ｑ結合を調べるため、組換えヒトＨｅｒ２（５．０μｇ／ｍｌまたは１０．０μｇ／ｍｌ：Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社製）をコーティングし、滴定量の抗体フォーマットをそれぞれ添加した（４２．０ｎＭ～０．３２ｎＭまたは６６．８７ｎＭ～１．０４　ｎＭ）。また、抗体バリアント（２００．０ｎＭ～３．１２ｎＭ）を直接コーティングすることによって、Ｃ１ｑ結合を行った。ベロナール緩衝液（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社）で希釈したヒトＣ１ｑ（０．３３６μｇ／ｍＬまたは０．

５μｇ／ｍＬ；Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社）を添加し、３７℃で３０分間インキュベートした後、ウサギ由来の抗Ｃ１ｑ抗体を添加した（１：５０００または１：１００００、Ｄａｋｏ社）。最後に、抗ウサギ－ＨＲＰ（１：５０００；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）をプレートに添加し、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質液（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を添加して可視化した。吸光度を、６２０ｎｍで測定するか、または、１Ｍ　ＨＣｌを５０μｌ添加して反応を停止させ、Ｓｕｎｒｉｓｅ分光光度計（ＴＥＣＡＮ社）を用いて４５０ｎｍで測定した。

【０２１９】

ＨＥＲＡ

ＨＥＲＡは、若干の変更を加えた上で、従前の方法（Ｇｒｅｖｙｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１８，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．，９（１）：６２１）により行った。ＨＡ－ｈＦｃＲｎ－ＥＧＦＰを安定的に発現している（＞１００倍）ＨＭＥＣ－１細胞を、７．５×10^4細胞／ウェルとなるように４８ウェルプレート（ＣｏｒｎｉｎｇＣｏｓｔａｒ）に播種し、増殖培地（Ｇｉｂｃｏ　ＭＣＤＢ　１３１培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）、１０％加熱不活性化ＦＣＳ（Ｍｅｒｃｋ社）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）、１％　Ｐｅｎｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｍｅｒｃｋ社）、１０ｎｇ／ｍｌ　マウス上皮成長因子（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）、１μｇ／ｍｌ　ヒドロコルチゾン（Ｍｅｒｃｋ社））中で１日培養した。５μｇ／ｍｌ　ブラストサイジン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）および１００μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）を添加することにより、前記細胞の安定的なＦｃＲｎ発現を確保した。前記細胞をＨａｎｋ’ｓ平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）で洗浄し、１時間飢餓状態にしてから、１２５μｌのＨＢＳＳ（ｐＨ７．４）で希釈した８００ｎＭの抗体フォーマットを前記細胞に添加し、次いで３時間インキュベートした。そして、細胞を氷冷ＨＢＳＳ（ｐＨ７．４）で洗浄してから、ＦＣＳを含有しないが、ＭＥＭ非必須アミノ酸（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）を添加した増殖培地を細胞に添加し、さらに３時間インキュベートした。その後、培地試料を回収し、存在する抗体の量をＥＬＩＳＡにより定量した。これは、上述のようにＨｅｒ２をコーティングし、続いてブロッキング（ＰＢＳ／Ｓ）および洗浄（ＰＢＳ／Ｔ）を行ってから前記ＨＥＲＡ試料を添加することにより行った。前記抗体の結合を、抗Ｆｃ－ＡＬＰ抗体（Ｍｅｒｃｋ社）をＰＢＳ／Ｓ／Ｔで希釈したもの（１：５０００）を用いて検出し、上述の方法で測定した。

【０２２０】

ＣＤＣ

カルセインＡＭ放出ＣＤＣアッセイを行った。１×10^7個のＷＳＵ－ＮＨＬ細胞、ＳＵ－ＤＨＬ４細胞、またはＲａｊｉ細胞を、１μｌのカルセインＡＭ（Ｍｅｒｃｋ社）で３０分間染色した。そして、前記細胞をＨＢＳＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ社）で洗浄し、ＲＰＭＩ（Ｍｅｒｃｋ社）中に細胞密度が１×10^6となるように再懸濁した。その後、５×10^4個の細胞を、滴定量の抗ＣＤ２０抗体（１４０ｎＭ～０．７２９ｎＭ）およびＮＨＳ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）（最終濃度２５％）と共にＶ字型９６ウェルプレートに添加した。ＲＩＰＡ緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）を、抗体およびＮＨＳの代わりに用い、１：１の希釈率で標的細胞の最大溶解率を測定した。基礎遊離は、抗体および／またはＮＨＳの非存在下で測定した。前記プレートを３７℃で１時間インキュベートし、２０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。上清を黒色透明底の光学９６ウェルＶｉｅｗｐｌａｔｅ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社）に移し、Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社）を用いて蛍光強度を４８５ｎｍ励起／５１０ｎｍ発光で測定してから、各抗体フォーマットの溶解活性率を算出した。

【０２２１】

インビボ半減期調査

実験は、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ社の動物実験委員会（Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）による承認を受け、承認され

たガイドラインおよび規則に従い、Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ社（ＪＡＸ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）内で行った。簡単に説明すると、ヒトＦｃＲｎを発現しているが、マウスＦｃＲｎを発現していないヘミ接合体Ｔｇ３２マウス（Ｂ６．Ｃｇ－Ｆｃｇｒｔ^{tm1Dcr} Ｔｇ（ＦＣＧＲＴ）３２Ｄｃｒ／ＤｃｒＪ；Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ社）を使用して、抗体フォーマットの血漿中半減期を求めた。記載がある場合には、マウスに対し、Ｈｅｒ２特異的抗体フォーマットを投与する４８時間前に、５００ｍｇ／ｋｇの静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩｇ）（ピリヴィジェン；ＣＳＬ Ｂｅｈｒｉｎｇ社）を前投与した。各試験物を、雄マウス（年齢：８週～９週、体重：２２ｇ～２７ｇ）のみを用いた、５匹のマウスで構成される複数の群において調べた。マウスに等モル量の試験物（１．０ｍｇ／ｋｇのＩｇＡ２およびＩｇＧ１、１．３ｍｇ／ｋｇのタンデムバリアント）を静脈注射し、注射後１日目、２日目、３日目、４日目、５日目、７日目、１０日目、１２日目、１６日目、１９日目、および２３日目に血液試料を後眼窩洞から採取した。採血直後に血液試料を処理し、血漿を単離させ、５０％グリセロール／ＰＢＳで希釈して－２０℃で保存した。ＥＬＩＳＡで定量する場合、血漿試料を１：５０～１：４００（または１：２５、１：５０、１：１００、もしくは１：４００）の希釈率でＰＢＳ／Ｓ／Ｔで希釈した。半減期のデータは、１日目と比較した注射後所定の時点における残存タンパク質に基づいて算出したパーセンテージで示している。Ｐｒｉｓｍ ８を用いて非線形回帰分析を行い、次の式を用いて半減期を算出した：

【数１】

$$t_{1/2} = \frac{\log 0.5}{(\log Ae/A0)} \times t$$

式中、$t_{1/2}$は、所定の抗体の半減期、A_eは抗体の残存量、A_0は１日目の抗体量、ｔは経過時間である。

【０２２２】

統計解析

図の作成および統計解析は、Ｍａｃ用ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ８（バージョン８．１．２；ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．社）、Ｍａｃ用マイクロソフトエクセル（バージョン１６．３５）およびＢｉｏＲｅｎｄｅｒ．ｃｏｍを用いて行った。

【０２２３】

結果

タンデム抗体の設計および製造

タンデム抗体フォーマットを設計するため、トラスツズマブ由来のＨｅｒ２特異性を有する、ＩｇＧ１およびＩｇＡ２重鎖（ＨＣ）コード発現ベクター（Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ ８９，４２８５－４２８９（１９９２））を、対応するヒンジ配列が含まれるＩｇＡ２－Ｆｃ（尾部なし）またはＩｇＧ１－Ｆｃをコードする配列と、それぞれ組み合わせた。野生型ＩｇＧ１に加え、低親和性ＦｃγＲおよびＣ１ｑに関与する能力を消失させた工学操作バージョン（Ｐ３２９Ｇ、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ；ＰＧＬＡＬＡ）も組み込んだ（Ｓｃｈｌｏｔｈａｕｅｒ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｄｅｓｉｇｎ ＆ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ：ＰＥＤＳ ２９，４５７－４６６（２０１６））。前記抗体を産生するため、構築したベクターを、抗Ｈｅｒ２ヒトカッパ軽鎖（ＬＣ）をコードするベクターと組み合わせた（Ｍｅｙｅｒ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ｍＡｂｓ ８，８７－９８（２０１６）およびＭｅｓｔｅｒ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ｍＡｂｓ １３，１８９３８８８（２０２１））。前記抗体バリアントの模式図を、図１ａ～１ｄに示す。

精製したタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により分析したところ、タンデムバリアントは親抗体の分子量より約５０ｋＤａ大きい分子量で移動した。還元条件下では、前記バリアントは、それらのＨＣ（５０ｋＤａ～７５ｋＤａ）およびＬＣ（２５ｋＤａ）にそれぞれ対応する２つの異なるバンドで移動した（データは示さず）。タンデムバリアントは、その親である対応物と同程度の量（１～２ｇ／Ｌ）で産生され、酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）において、組換えヒトＨｅｒ２に結合した（データは示さず）。

【０２２４】

タンデム設計は、ＦｃＲｎと結合し、血漿中半減期を延長した

設計した抗体のヒトＦｃＲｎへの結合能を比較するため、ＥＬＩＳＡを行った（図２ａ）。ＦｃＲｎは、ＩｇＧ１のC_H2－C_H3エルボー領域に酸性ｐＨでは結合し、中性ｐＨでは結合も遊離もしないという、厳密にｐＨ依存性の結合を示す（図１ｂ）ため、当該アッセイはｐＨ５．５およびｐＨ７．４で行った。その結果、両タンデムバリアントは、ＩｇＧ１と同様のｐＨ依存性で受容体に結合するが、ＩｇＡ２は結合しないことが実証された（図２ｂ）。

次に、ヒトＦｃＲｎを安定的に過剰発現する付着性ヒト微小血管内皮細胞（ＨＭＥＣ－１）を使用し、ヒト内皮細胞に基づくリサイクルアッセイ（ＨＥＲＡ）（Ｇｒｅｖｙｓ，Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ９，６２１（２０１８））を用いてＦｃＲｎによる細胞内分解からの抗体のレスキュー能を調べた。簡単に説明すると、前記抗体を前記細胞に添加し、続いてインキュベーション工程を行ってから、培地を除去して交換した。さらなるインキュベーションの後、前記培地を回収し、細胞内分解からのレスキューの測定値として、存在する抗体の量を定量した。ＨＥＲＡの結果は、予想した通り、ＩｇＧ１は細胞内分解からレスキューされるが、ＩｇＡ２は細胞内分解からレスキューされないことを示していた。加えて、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１は、ＩｇＧ１－ＩｇＡ２という逆の配向のタンデムフォーマットよりも効率的にレスキューされ、さらにはＩｇＧ１よりも若干多くレスキューされた（図２ｃ）。

これがどのようにインビボでの血漿中半減期につながるかを検討するため、前記抗体フォーマットをヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスに静脈内投与し、続いて血液試料を経時的に採取してから、ＥＬＩＳＡによる定量を行った（図２ｄ）。ＩｇＡ２の血漿中半減期はわずか０．９日であったが、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１は最も大幅な半減期の増加を示し（６．８日）、これに対し、ＩｇＧ１－ＩｇＡ２の半減期はＩｇＡ２と比べて中程度に過ぎなかった（２．７日）。このように、タンデムバリアント間で明確な２．５倍の差を測定し、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１は、ＩｇＧ１の半減期（９．２日）に最も近い半減期を示した（図２ｅ）。

【０２２５】

タンデムバリアントはＦｃエフェクター結合を示す

ＦｃαＲＩはＩｇＡ２のC_H2－C_H3エルボー領域と結合する（Ｈｅｒｒ，Ａ．Ｂ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４２３，６１４－６２０（２００３））が、ＩｇＧ１は、C_H2ドメインの下側ヒンジおよび上部において、種々のＦｃγＲに関与する（Ｓｏｎｄｅｒｍａｎｎ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４０６，２６７－２７３（２０００）およびＲａｄａｅｖ，Ｓ ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２７６，１６４６９－１６４７７（２００１））（図１ｂ）。同族Ｈｅｒ２抗原に捕捉された場合のタンデムバリアントのＦｃエフェクター分子結合特性を調べるために、一セットのＥＬＩＳＡを実施した（図５ａ）。その結果、ＦｃαＲＩはＩｇＡ２よりわずかに弱いものの、両タンデムバリアントに結合するが、ＩｇＧ１には結合しないことが明らかとなった（図５ｂ）。ＦｃγＲへの結合を調べたところ、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１がＦｃγＲＩＩｂおよびＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ、特にデコイ受容体ＦｃγＲＩＩＩｂに若干強く結合した以外は、いずれのタンデムバリアントもＩｇＧ１と同様の結合反応を示すことが確認された（図５ｃ～図５ｉ）。各種ＦｃγＲは、ＦｃγＲＩを除き、いずれもＰＧＬＡＬＡ含有ＩｇＧ１バリアン

トと結合しなかったが、これは公開されているデータと一致している（Ｓｃｈｌｏｔｈａｕｅｒ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｄｅｓｉｇｎ ＆ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ：ＰＥＤＳ ２９，４５７－４６６（２０１６））。ＩｇＡ２は、予想通り、いずれのＦｃγＲとも結合しなかった。

【０２２６】

ＩｇＧ１由来またはＩｇＧ２由来のＦｃと組み合わせたＩｇＡ２はＦｃ受容体結合を示す

好中球はＦｃγＲＩＩＩｂを発現し、これはＩｇＧ１媒介ＡＤＣＣを妨害するデコイ受容体として作用することがわかっている（Ｂｒａｎｄｓｍａ，Ａ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １０，７０４（２０１９），ａｎｄ Ｔｒｅｆｆｅｒｓ，Ｌ．Ｗ．ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ９，３１２４（２０１８））。しかしながら、ＩｇＧ２サブクラスはこの特定の受容体に関与しない（Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｔ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｊ ７９，１８５８－１８６６（２０００），ａｎｄ Ｂｒｕｈｎｓ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ １１３，３７１６－３７２５（２００９））。したがって、我々は、ＩｇＧ１－ＦｃをＩｇＧ２－Ｆｃに置き換えて、好ましいタンデム配向を再設計した（図３ａ）。生成された抗Ｈｅｒ２ ＩｇＧ２ベースのバリアントは良好に産生され、組換えＨｅｒ２と結合した（データは示さず）。Ｆｃ受容体への結合に関し、ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、ここでもやはりＦｃαＲＩに関与する能力を有することが示されたが、ここでも、ＩｇＡ２と同程度ではなかった。一方、ＩｇＧ２およびＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、いずれもＦｃγＲＩＩａに対する結合を示したが、ＦｃγＲＩＩＩｂに対する結合は示さなかった（図６）。ＩｇＧ２ベースのバリアントがＦｃγＲＩＩＩｂに関与しないことを確認するため、ＥＬＩＳＡウェルに多量の抗体を直接コーティングし、その後、前記受容体を添加した。その結果、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１はＩｇＧ１と同程度に良好に結合するが、ＩｇＧ２、ＩｇＡ２－ＩｇＧ２、およびＩｇＡ２は全く結合しないという厳密な差異が明らかとなった（図３ｂ）。

【０２２７】

ＩｇＡ２－ＩｇＧ１はＣ１ｑ結合を強化することを示す

補体因子Ｃ１ｑは、ＦｃγＲと部分的にオーバーラップする結合部位である、C_H2ドメインの下側ヒンジおよび上部を介してＩｇＧと結合する（図１ｂ）。しかしながら、補体カスケードを開始しＣＤＣを誘導するＣ１ｑの能力は、細胞表面抗原への結合時におけるＦｃ：Ｆｃ接触を介したＩｇＧ六量体形成に依存している（Ｄｉｅｂｏｌｄｅｒ，Ｃ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．）３４３，１２６０－１２６３（２０１４））。前記設計した抗体フォーマットのＣ１ｑ結合を測定するため、これら抗体フォーマットを、ＥＬＩＳＡにおいてコーティングした組換えＨｅｒ２に捕捉させた（図４ａ）。際だったことに、Ｃ１ｑは、ＩｇＧ１に対するよりも強くＩｇＡ２－ＩｇＧ１に結合し、ＩｇＧ１に次いでＩｇＧ１－ＩｇＡ２タンデムバリアントに結合した（図４ｂ～図４ｃ）。ＩｇＧ１－ＰＧＬＡＬＡでは、Ｃ１ｑ結合は全く測定されないか、または弱い結合しか測定されず（図４ｂ～図４ｄ）、一方、ＩｇＡ２では結合しなかった（図４ｂ～図４ｃ）。このように、ＩｇＧ１－ＦｃをＩｇＡ２に融合させるとＣ１ｑ結合が強化されたが、このことは、このタンデム設計が、Ｈｅｒ２との結合時にＦｃ：Ｆｃ相互作用および六量体形成に有利に働くことを強く裏付けている。加えて、ＩｇＧ２のＣ１ｑ[69]の結合は弱いものに過ぎず（図４ｄ）、タンデムＩｇＡ２－ＩｇＧ２バリアントはＣ１ｑに関与しなかった（図４ｄ）。

【０２２８】

ＩｇＡ２－ＩｇＧ２のＦｃ工学操作がＣＤＣ活性を高める

関連する系におけるタンデムフォーマットのオンターゲットＣ１ｑ結合活性強化の効果を探るため、我々は、悪性ＣＤ２０発現Ｂ細胞株のＣＤＣ誘導殺傷に使用可能な、最近開発されたキメラ抗ＣＤ２０特異的抗体（ＵＭＡＢ２）（Ｅｖｅｒｓ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．ｍＡｂｓ １２，１７９５０５（２０２０）およびＭｅｙｅｒ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｂｒｉｔｉｓｈ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｙ １８０，

８０８－８２０（２０１８））を利用した。この抗体の可変配列を、ＩｇＡ２、ＩｇＧ２、および前記ＩｇＡ２－ＩｇＧ２タンデムバリアントをコードするベクターに導入した。Ｃ１ｑに対するＩｇＧ２の結合は弱いものに過ぎない（図４ｄ）にもかかわらず、このようにした根拠は、３つのアミノ酸置換（Ｑ３１１Ｒ、Ｍ４２８Ｅ、およびＮ４３４Ｗ：ＲＥＷ）をＩｇＧ２ベースのバリアントに導入し、その効果を評価するためであった。産生された抗ＣＤ２０抗体は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥでは予想通りの分子量で移動し、ＥＬＩＳＡではインタクトな結合完全性を示した（図７）。

可溶性組換えＣＤ２０は存在しないため、ＥＬＩＳＡにおいて抗体バリアントを直接コーティングしてＣ１ｑ結合を行ったところ、ＩｇＧ２およびＩｇＡ２－ＩｇＧ２のいずれに対しても結合は弱いものに過ぎなかったが、ＩｇＧ１に対しては最も強い結合を示した（図８ａ）。これは、抗原に捕捉された際の抗Ｈｅｒ２バリアントのデータ（図４ｄ）、ならびに直接コーティングした場合のデータ（図８ｂ）と一致している。しかしながら、前記ＲＥＷ置換を導入した場合には、両方の特異性を持つＩｇＧ２に対する、中程度に強化されたＣ１ｑ結合が測定された（図８ａ～図８ｂ）。同様に、ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は弱い結合を示したが、前記ＲＥＷ置換を導入した場合には、より強い結合が測定された（図８ａ～図８ｂ）。それでもなお、前記ＲＥＷ含有ＩｇＡ２－ＩｇＧ２タンデムバリアントは、ＩｇＧ１に匹敵するほどの強さではＣ１ｑに結合しなかった（図８ａ～図８ｂ）。

さらに、ＮＨＳの存在下、抗体を介した溶解後に放出される蛍光色素カルセインによる標的細胞の標識に依拠するカルセインＡＭに基づくＣＤＣアッセイを行った（図８ｃ）。ここで、ＣＤ２０高発現細胞株ＳＵ－ＤＨＬ４およびＣＤ２０低発現細胞株ＷＳＵ－ＮＨＬをそれぞれ用いたところ、ＣＤ２０高発現では、ＩｇＡ２－ＩｇＧ２－ＲＥＷの強力なＣＤＣ誘導能が確認され、次いでＩｇＡ２－ＩｇＧ２も確認された（図８ｄ－図８ｅ）。ＩｇＧ２－ＲＥＷはＩｇＧ２を上回るＣＤＣ誘導を示したものの、その活性は抗体濃度が低くなると失われたが、タンデムバリアントのＣＤＣ活性は維持された（図８ｄ）。低ＣＤ２０発現では、ＲＥＷ含有バリアントのみがＣＤＣ媒介性の溶解を誘導した（図８ｅ）。

これらを総合すると、ＲＥＷ置換はＩｇＧ２のＣＤＣ誘導能を強化し、この効果はＲＥＷ含有ＩｇＧ２－Ｆｃを全長ＩｇＡ２とタンデムに組み合わせた場合にさらに強くなることが実証された。これは、ＣＤ２０発現のレベルが高い場合および低い場合の両方で観察された。

また、ＩｇＡ２およびＩｇＡ２－ＩｇＧ２のいずれも、ＲＥＷ置換を伴う場合でも、デコイ受容体ＦｃγＲＩＩＩｂとは結合せず（図９ｈ）、一方、ＦｃαＲＩに関与する能力は保持する（図９ａ）ことが確認された。野生型とＲＥＷ含有バリアントとの間では、測定される差異はないか、または僅かであったが、一方、ＩｇＧ２ベースのバリアントはＩｇＧ１と比べてより選択的にＦｃγＲに結合し（図９ａ～図９ｈ）、予想されるＩｇＧ２結合特性と一致していた（Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｔ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｊ ７９，１８５８－１８６６（２０００）、およびＶｉｄａｒｓｓｏｎ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５（２０１４））。

また、ＲＥＷ含有ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、ヒトＦｃＲｎとｐＨ依存的に結合し、酸性ｐＨで結合が増加することが示された（図１０）。このことは、ＲＥＷ置換がＩｇＡ２－ＩｇＧ２フォーマットの半減期の延長につながることを強く示唆している。

【０２２９】

考察

先に示したように、我々は、ＩｇＡとＩｇＧの構造的特徴を組み合わせて、複数のエフェクター機能を持つ抗体フォーマットを作製した。我々は、ヒトＦｃＲｎに関与する能力が良好なフォーマットを特定した。これは、ＩｇＡ２をＩｇＧ１－Ｆｃに融合させたタンデムバリアントで達成され、ＨＥＲＡにおいて分解からの効率的なレスキューと、ヒトＦｃＲｎ発現マウスにおいてＩｇＡ２と比べて７倍よりも長い半減期とをもたらした。これにより、ＩｇＧ１－ＩｇＡ２という逆のタンデム配向の半減期よりも、２．５倍長い半減期となった。したがって、我々は、２つのタンデムバリアントの血漿中半減期における明

確な違いを測定し、これにより、ＩｇＡ２－ＨＣのＣ末端側終端部にＩｇＧ１－Ｆｃを付加することが、インビトロおよびインビボの両方で、分解からのヒトＦｃＲｎ媒介性の効率的なレスキューに最も適した配向であることが示された。

さらに、我々は、Ｃ１ｑに関与し、ＣＤＣ媒介性の細胞殺傷を誘導する当該フォーマットの能力について調べた。特に、我々は、有利なことに、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１という配向によれば、ＥＬＩＳＡにおいてＨｅｒ２上に捕捉される際、ＩｇＧ１と比べてＣ１ｑ結合が向上されることを見出した。

また、ＲＥＷ置換と組み合わせたＩｇＡ２－ＩｇＧ２フォーマットについても調べた。有利なことに、ＲＥＷ置換は、ＩｇＧ２およびＩｇＡ２－ＩｇＧ２の両方について、直接コーティングした場合（抗Ｈｅｒ２および抗ＣＤ２０）、ＥＬＩＳＡにおけるＣ１ｑへの結合を向上させることがわかった。

前記Ｃ１ｑ結合アッセイで観察された効果と同様に、ＩｇＧ２－ＲＥＷはＣＤＣ媒介能を獲得し、当該能力は、高標的濃度で最も顕著であった。ＲＥＷ含有ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、ＣＤ２０発現癌Ｂ細胞を標的とする場合に、細胞ＣＤＣアッセイにおいて極めて良好に機能した。このことは、ＩｇＡ２－ＩｇＧ２－ＲＥＷが、標的細胞上のＣＤ２０との結合によってＦｃ：Ｆｃ六量体構造を形成する高い能力を有し、ＩｇＧ２－ＲＥＷよりもはるかに効率的な補体カスケードの誘導を可能にすることを示唆している。この結果はまた、ＲＥＷ置換がＩｇＡＦｃ－ＩｇＧＦｃフォーマットの半減期の延長につながることを強く示唆している。これと合致して、ＲＥＷ含有ＩｇＡ２－ＩｇＧ２は、ヒトＦｃＲｎとｐＨ依存的に結合し、酸性ｐＨで結合が増加した。このように、ＲＥＷ置換は、当該構築物の特性、例えば、Ｃ１ｑ結合およびＣＤＣ、ならびにＦｃＲｎ結合についてもさらに強化することが示された。

【０２３０】

さらなる結果

Ｃ末端側終端部のＩｇＧ１－Ｆｃによる強力なＣＤＣ活性

タンデム配向のＣＤＣ活性を調べるために、ＮＨＳ存在下、抗体を介した溶解後に放出される蛍光色素カルセインＡＭによる標的細胞の標識に依拠するカルセインＡＭ放出ＣＤＣアッセイを行った（図８ｃ）。ここでは、補体抑制性受容体のレベルに対して低レベルでＣＤ２０を発現し、よって「殺傷しにくい（ｈａｒｄ－ｔｏ－ｋｉｌｌ）」と考えられるＲａｊｉ細胞を用いた。これらの結果（図１１ａ）は、本発明のＩｇＡ２－ＩｇＧ１構築物の強力なＣＤＣ誘導能を確認し、かつ、ＥＬＩＳＡにおけるＩｇＧ１－ＷＴのものと同様の効率的なＣ１ｑ結合と一致していたが、逆のタンデム配向のＩｇＧ１－ＩｇＡ２フォーマットは、ＩｇＧ１－ＰＧＬＡＬＡ（Ｃ１ｑ結合を消失させた変異体）と同様に、不十分な結合を示した。

【０２３１】

Ｆｃ工学操作がＣＤＣ活性を強化する

我々は、タンデムフォーマットにＲＥＷ変異を導入することにより、ＣＤＣ活性をさらに強化できることを示した（図１１ｂ）。具体的には、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１－ＲＥＷ配向は、逆のタンデム配向と比べて、より高レベルのＣＤＣを誘導した。ＩｇＡ２－ＩｇＧ１構築物にＲＥＷを導入することにより、我々は、ＩｇＧ１－ＷＴのＣＤＣ活性よりも幾分高いレベルのＣＤＣ活性を達成した。

これらを総合すると、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１配向は、Ｃ１ｑへの関与および標的抗原に結合した際のＣＤＣの媒介において、ＩｇＧ１－ＩｇＡ２配向と比べて優れていることが実証された。他の実験において、我々は、いずれのタンデムフォーマットも、標的抗原との結合がない場合には、ヒト血清中で補体活性化を引き起こさないことも明らかにした（データは示さず）。このことは、当該構築物を治療のために使用する場合には、安全性の観点から重要である。

【０２３２】

ＦｃｙＲＩＩＩａに対するＩｇＡ２－ＩｇＧ１の強い結合

ＮＫ細胞はＦｃｙＲＩＩＩａを発現しており、ＩｇＧ抗体の架橋によってＡＤＣＣを媒

介する主要な細胞集団であると考えられている。そこで、同族Ｈｅｒ２抗原に捕捉されたときの、タンデム配向のＦｃγＲＩＩＩａの結合を調べた。その結果（図１２参照）、いずれの配向／フォーマットも受容体に結合したが、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１配向は、逆のタンデム配向と比べて、より強い結合を示した。

これらを総合すると、このことは、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１配向は、逆の配向と比べて、ＮＫ細胞上のＦｃγＲＩＩＩａへの向上した結合能を有し得るものであり、これにより効率的にＡＤＣＣを媒介し得るものであることを示している。

【０２３３】

タンデムフォーマットはＦｃＲｎと結合する

タンデムフォーマットのヒトＦｃＲｎへの結合能を測定するため、ＥＬＩＳＡを行った（図２ａ）。ＦｃＲｎは、ＩｇＧ１のC_H2-C_H3エルボー領域に酸性ｐＨでは結合し、中性ｐＨでは結合も遊離もしないという、厳密にｐＨ依存性の結合を示す（図１ｂ）ため、当該アッセイはｐＨ５．５およびｐＨ７．４で行った。その結果（図１３）、両タンデムバリアントは、受容体に対しｐＨ依存性結合を示すが、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１配向は逆の配向と比べてより強力な結合を示し、また、ＩｇＧ１　ＷＴと比べてもより強い結合を示すことが実証された。

これらのフォーマットにＲＥＷを導入した場合、ｐＨ５．５では強化された結合が測定されたが、ｐＨ７．４では結合程度は低いままであった。

【０２３４】

タンデムフォーマットは競合モデルにおいて半減期を延長した

生理的関連状況における抗体フォーマットのインビボ血漿中半減期を測定するため、前記抗体を、ＩＶＩｇを前もって負荷したヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスに静脈内投与し、続いて血液試料を経時的に採取してから、ＥＬＩＳＡによる定量を行った（図２ｄ）。

当該トランスジェニックマウスでは、マウスＩｇＧがヒトＦｃＲｎと結合する能力が低いことに加え、当該マウスは、病原体フリーの飼育環境の結果、内因性マウスＩｇＧのレベルが低い。そこで我々は、前記マウスにヒトＩｇＧを注射し、高レベルのＩｇＧがＦｃＲｎの結合およびリサイクルと競合する生理的関連状況を模倣した。

ＩｇＡ２の血漿中半減期はわずか０．８日であったが（図１４）、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１では半減期の増加が見られた（３．１日）。しかしながら、同じ特異性を有するＩｇＧ１では、若干長くなった半減期が測定されただけであった（４．４日）。前記タンデムフォーマット（ＩｇＡ２－ＩｇＧ１）にＲＥＷ変異を導入したところ、ＩｇＧ１の半減期と同様の半減期が測定された（４．５日）。

これらを総合すると、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１タンデムフォーマットは、ＩｇＡ２単独とは対照的に、ＦｃＲｎの関与に競合する高レベルのヒトＩｇＧの存在下、ＦｃＲｎによって処理され、レスキューされる。ＩｇＡ２－ＩｇＧ１バリアントは、親型ＩｇＧ１と比べて半減期が低下しているが、これは、ＲＥＷを導入することで補われる。

【０２３５】

実施例２：代替の（伸長型）ＩｇＡ　Ｆｃ－ＩｇＧ　Ｆｃタンデムフォーマットの設計

ここでは、ＩｇＡ　Ｆｃ由来およびＩｇＧ　Ｆｃ由来の構造要素、具体的には、ＩｇＡ２　ＦｃとＩｇＧ１　Ｆｃとの組み合わせはそのままである代替のタンデム設計であって、実施例１と同様に、ＦｃγＲおよびＦｃαＲＩの両方に対する効率的な関与を可能にするタンデム設計について報告する。このフォーマットは、ＩｇＡ　Ｆｃ（ここではＩｇＡ２　Ｆｃ）とＩｇＧ　Ｆｃ（ここではＩｇＧ１　Ｆｃ）とを組み合わせたものであり、さらなるＩｇＧ１－ＣＨ１ドメインを含むことでより離間している（すなわち、伸長されたフォーマット）。具体的には、ＩｇＧ１　Ｆａｂおよびヒンジ領域がＩｇＡ２　Ｆｃに融合され、ＩｇＧ１ヒンジ、ＩｇＧ１　ＣＨ１ドメイン、第３のＩｇＧ１ヒンジ、そして全長ＩｇＧ１　Ｆｃがこれに続いている（このような構築物を$IgG1\ Fab_2-IgA2\ Fc-H1-CH1-H1-IgG1\ Fc$と表記する、図１５参照）。当該設計をさらに前記ＲＥＷ　Ｆｃ工学操作戦略とも組み合わせ、前記ＲＥＷ置換をＣ末端ＩｇＧ１

ＦｃドメインにＣＤ２０特異性および抗ＨＥＲ２特異性は、ＩｇＧ１　Ｆａｂ２断片の形態である抗原結合断片によってもたらされる。

【０２３６】

材料および方法

抗体産生および精製については、実施例１に記載されている。ＣＤＣアッセイは、実施例１に記載されている通りに行った。

【０２３７】

結果

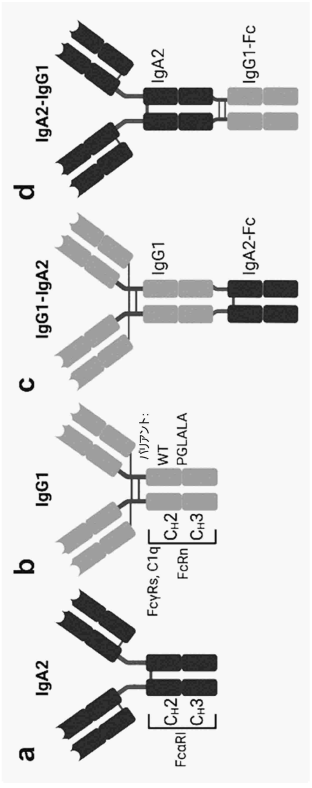
抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１　Ｆａｂ２－ＩｇＡ２　Ｆｃ－Ｈ１－ＣＨ１－Ｈ１－ＩｇＧ１　Ｆｃ（ＷＴまたはＲＥＷ）について、低レベルのＣＤ２０を発現するＲａｊｉ細胞という形態の「殺傷が困難な」標的細胞に対するそのＣＤＣ媒介能を調べたところ、当該新規タンデムフォーマットは、ＩｇＡ２－ＩｇＧ１フォーマットならびにＩｇＧ１の殺傷活性よりも強力な殺傷活性をもたらした（図１６）。前記ＲＥＷ置換をＣ末端ＩｇＧ１　Ｆｃドメインに導入すると、ＣＤＣ活性がさらに強化された。

これらの新たな伸長型ＣＨ－１含有フォーマットもまた、ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖについて試験した場合、実施例１に記載した本発明のＩｇＡ２－ＩｇＧ１含有タンデム構築物およびＩｇＧ１－ＷＴと同様に、Ｆｃγ受容体に結合することが示された（データは示さず）。

【図面】

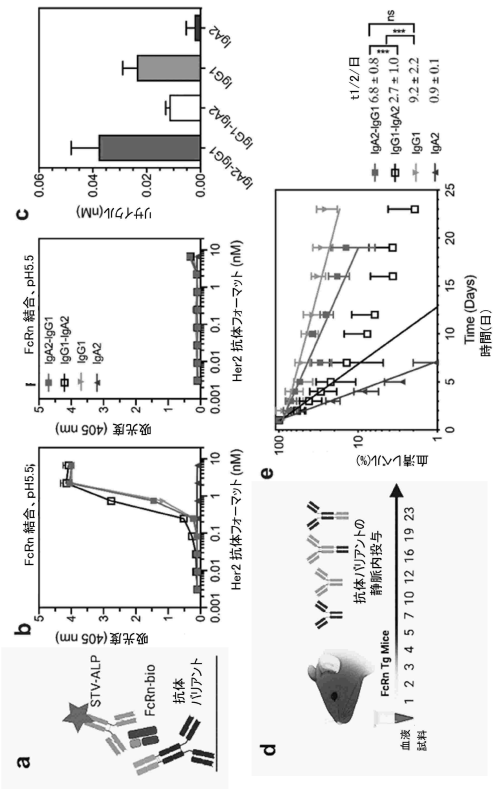
【図１】

Figure 1



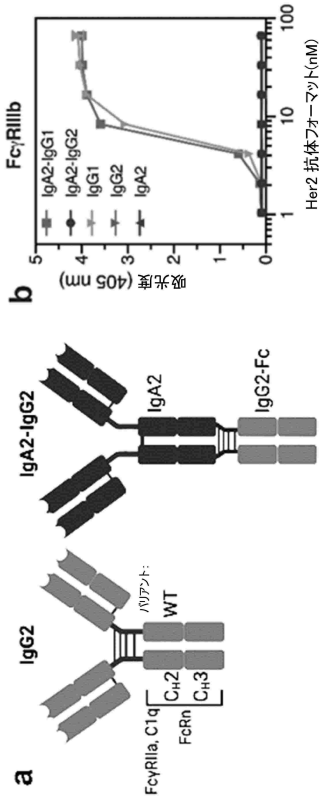
【図２】

Figure 2



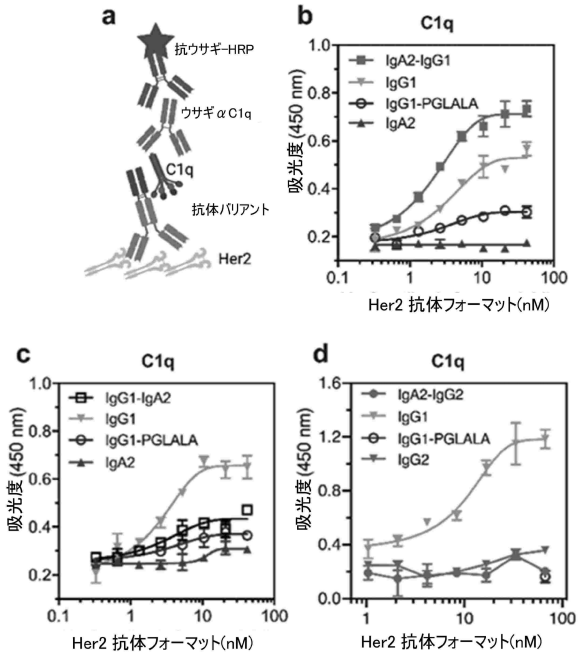
【図３】

Figure 3



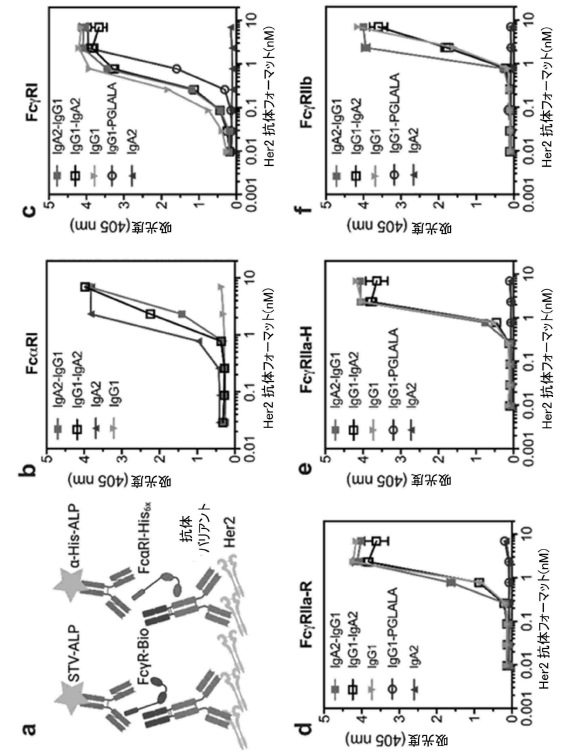
【図４】

Figure 4



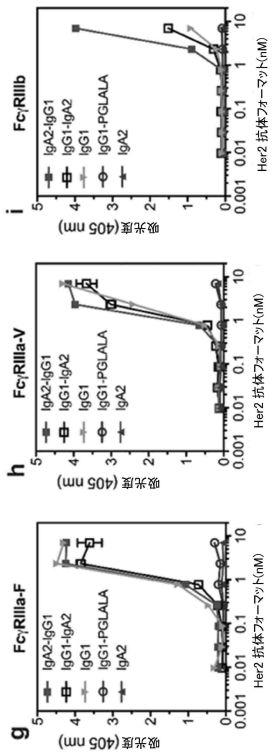
【図５－１】

Figure 5



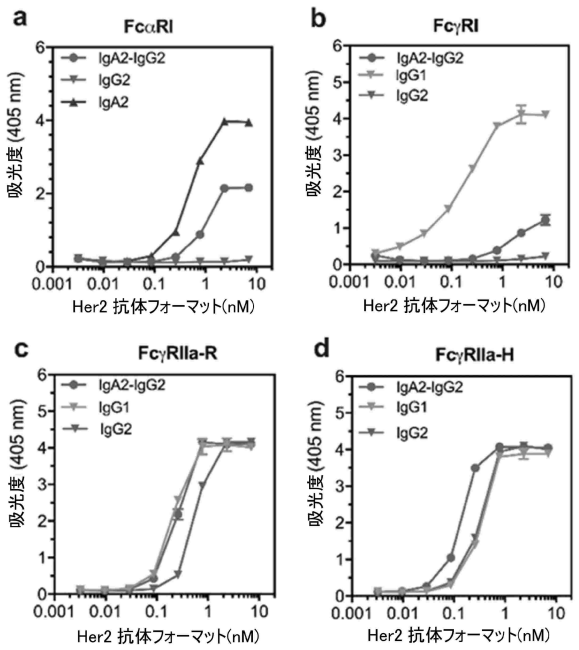
【図５－２】

Figure 5 continued



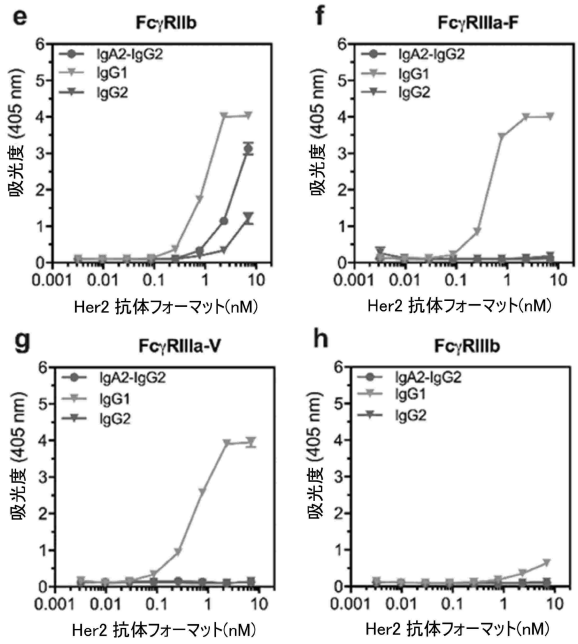
【図６－１】

Figure 6



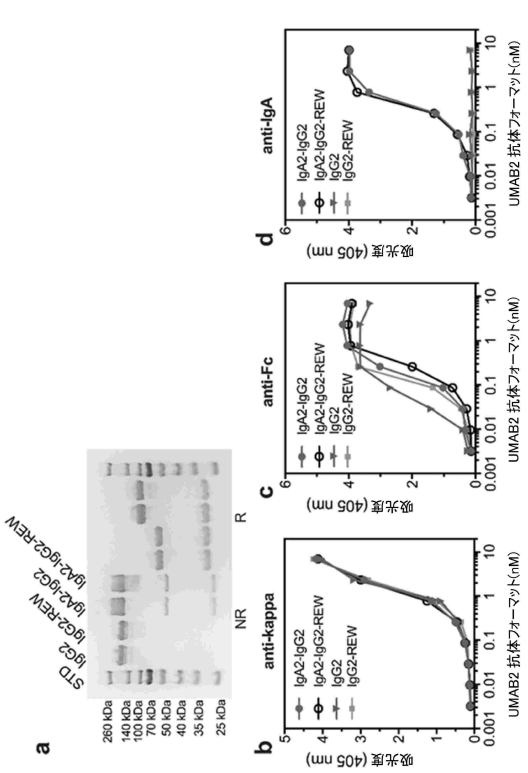
【図６－２】

Figure 6 continued



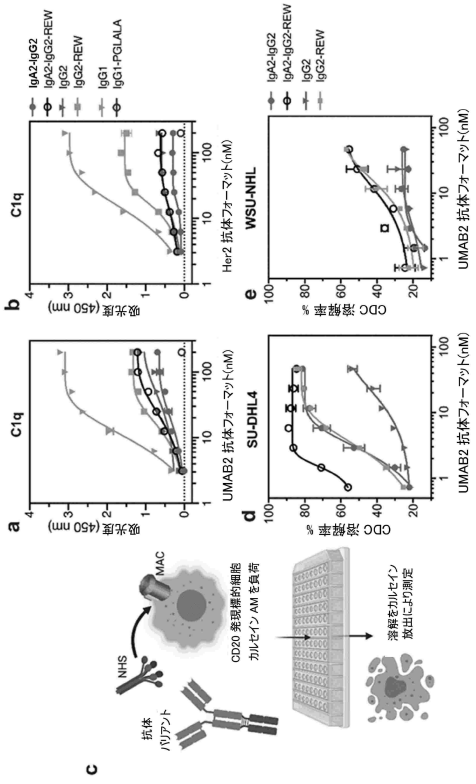
【図７】

Figure 7



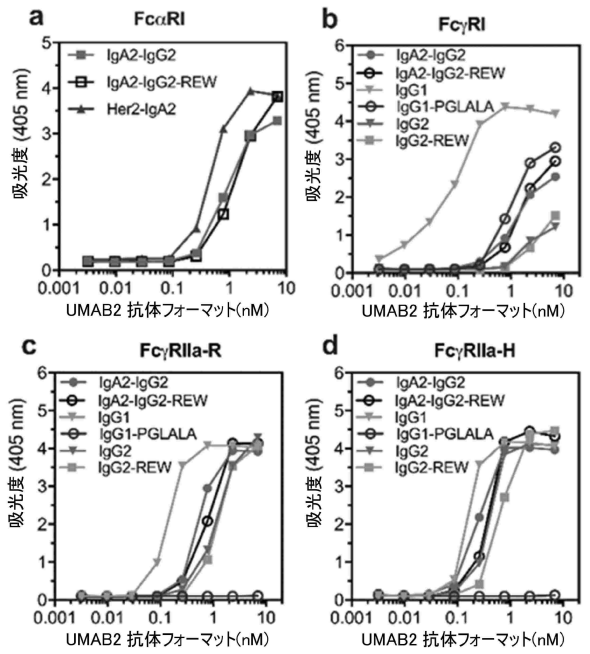
【図８】

Figure 8



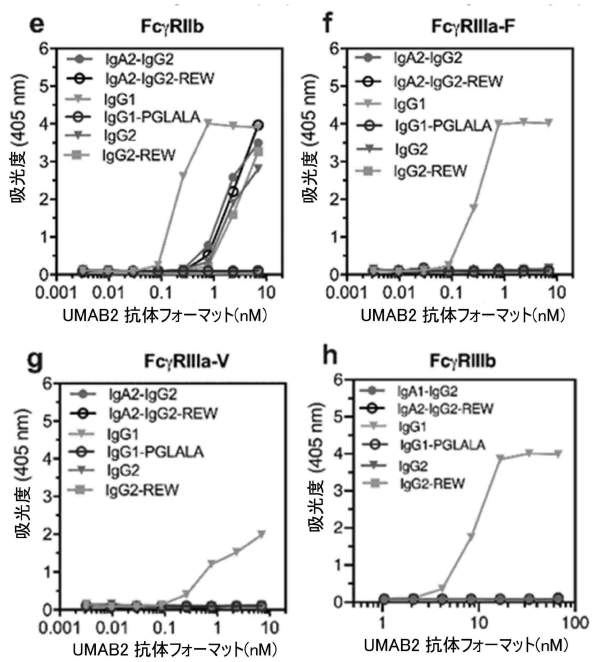
【図９－１】

Figure 9



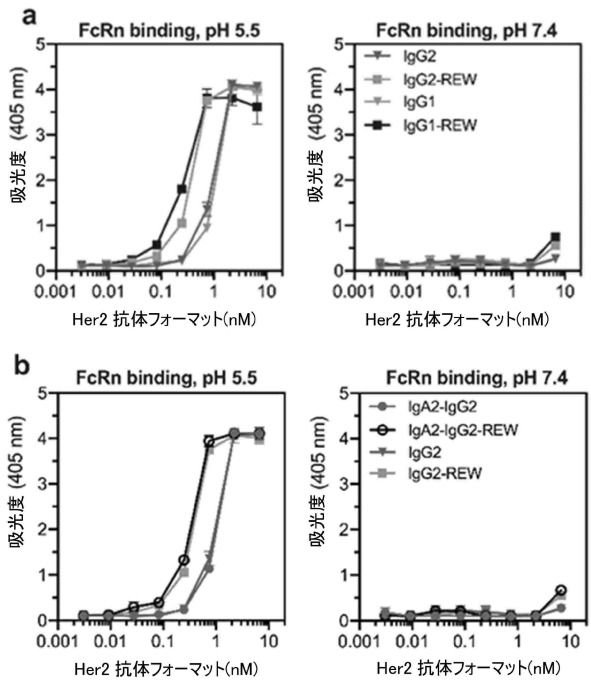
【図９－２】

Figure 9 continued



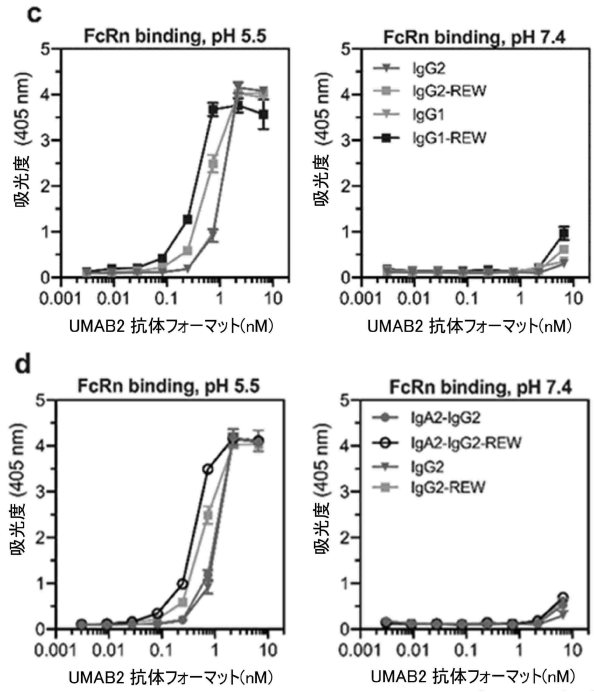
【図１０－１】

Figure 10



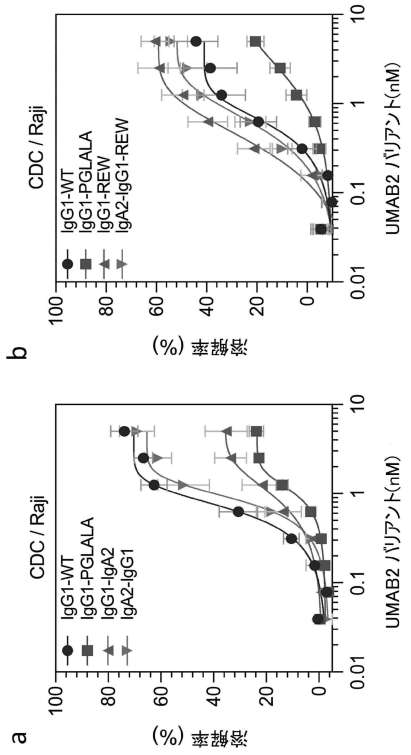
【図１０－２】

Figure 10 continued



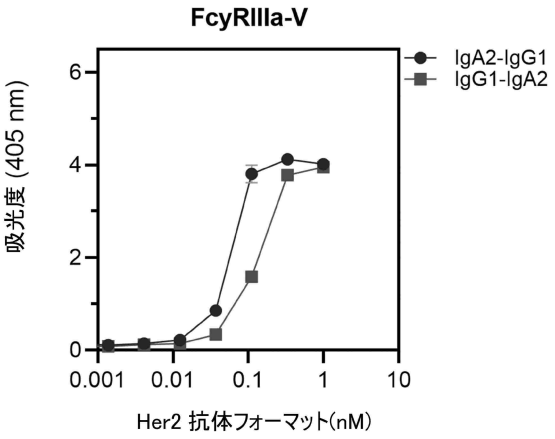
【図１１】

Figure 11



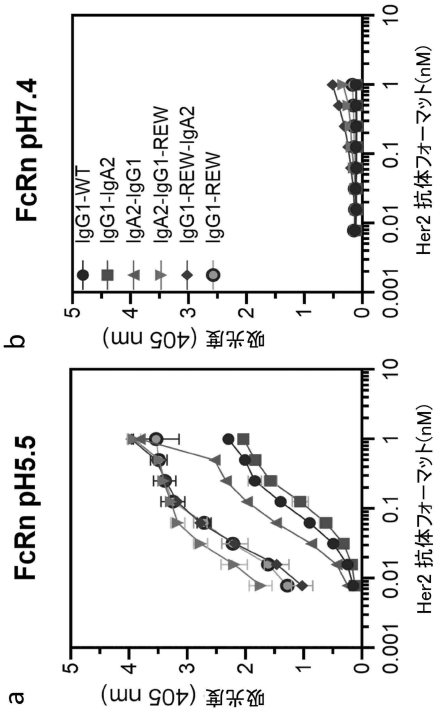
【図１２】

Figure 12



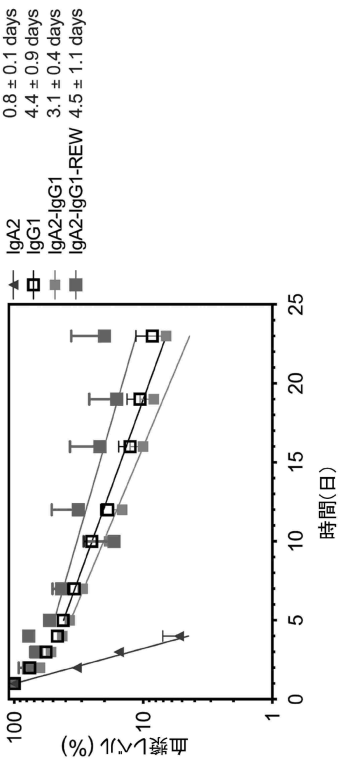
【図１３】

Figure 13



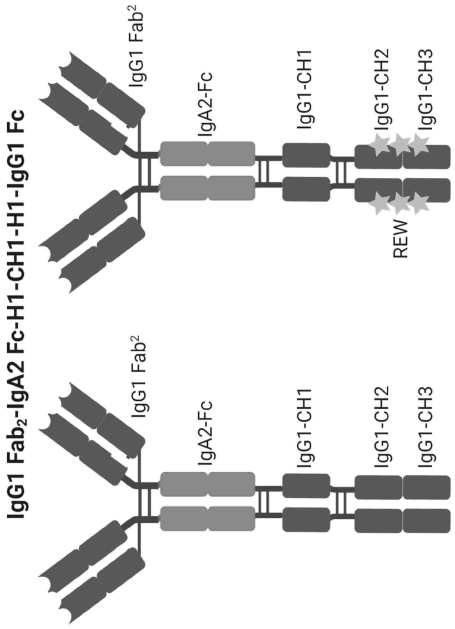
【図１４】

Figure 14



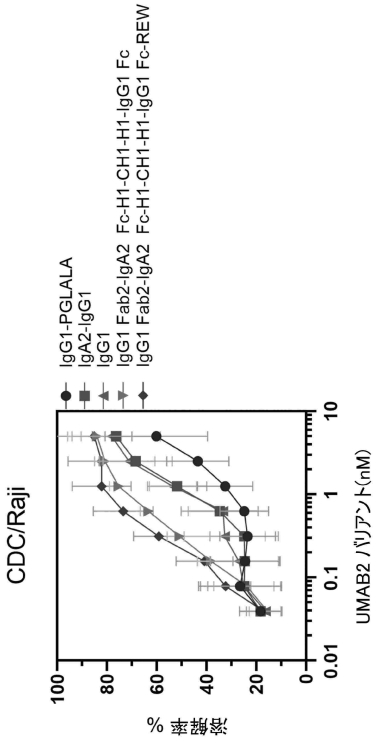
【図１５】

Figure 15



【図１６】

Figure 16



【配列表】

2024540336000001.xml

【国際調査報告】

International application No.
PCT/EP2022/080998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 C07K16/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN TETERING GEERT ET AL: "Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents", ANTIBODIES, vol. 9, no. 4, 15 December 2020 (2020-12-15), page 70, XP055906825, DOI: 10.3390/antib9040070 Whole document, especially figure 1F, section 5. ----- -/--	1-23

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 February 2023	16/02/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Kools, Patrick

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080998

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG QUN ET AL: "Enhancement of antibody functions through Fc multiplications", MABS, vol. 9, no. 3, 19 January 2017 (2017-01-19), pages 393-403, XP093019709, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2017.1281505 Whole document, especially figure 1A.	1-23
A	WO 2020/014486 A1 (MOMENTA PHARMACEUTICALS INC [US]) 16 January 2020 (2020-01-16) Whole document, especially the claims	1-23
A	WO 2021/220215 A1 (NOVARTIS AG [CH]) 4 November 2021 (2021-11-04) Whole document, especially the claims	1-23
A	KEVIN O. SAUNDERS ET AL: "Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 10, 1 January 2019 (2019-01-01), page 1296, XP055654839, DOI: 10.3389/fimmu.2019.01296 the whole document	1-23

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/080998

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020014486 A1	16-01-2020	AU 2019302740 A1	18-02-2021
		BR 112021000392 A2	06-04-2021
		CA 3106212 A1	16-01-2020
		CN 113164591 A	23-07-2021
		EP 3820519 A1	19-05-2021
		IL 279998 A	01-03-2021
		JP 2021531268 A	18-11-2021
		KR 20210042326 A	19-04-2021
		US 2022267460 A1	25-08-2022
		WO 2020014486 A1	16-01-2020
WO 2021220215 A1	04-11-2021	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	D
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61P 35/00 (2006.01)		A61K	48/00	
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61K 39/00 (2006.01)		A61P	31/00	
		A61K	39/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ノルウェー、０３１６ オスロ、ブリンデルン、ピーオー ボックス １０７２、シー／オー ウニヴァーシテテット イ オスロ

(72)発明者 フォス、スティアン
ノルウェー、０３１６ オスロ、ブリンデルン、ピーオー ボックス １０７２、シー／オー ウニヴァーシテテット イ オスロ

(72)発明者 メスター、シモーヌ
ノルウェー、０３１６ オスロ、ブリンデルン、ピーオー ボックス １０７２、シー／オー ウニヴァーシテテット イ オスロ

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB321
4C085 AA13 BA01 BB11 BB33 BB36 BB42
4H045 AA11 BA41 DA75 EA22 FA74