

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514763
(P2025-514763A)

(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全97頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-561852(P2024-561852)	(71)出願人	597160510
(86)(22)出願日	令和5年4月20日(2023.4.20)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年12月9日(2024.12.9)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066036		アメリカ合衆国10591-6707ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番
(87)国際公開番号	WO2023/205753	(74)代理人	100105957
(87)国際公開日	令和5年10月26日(2023.10.26)		弁理士 恩田 誠
(31)優先権主張番号	63/333,293	(74)代理人	100068755
(32)優先日	令和4年4月21日(2022.4.21)		弁理士 恩田 博宣
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142907
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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	(74)代理人	弁理士 本田 淳
		(74)代理人	100152489

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 F C ガンマ受容体への結合が低減されたキメラ重鎖定常ドメイン及びその使用

(57)【要約】

本開示は、低減されたエフェクター機能を有するキメラ重鎖定常ドメインに関する。多重特異性抗体、融合タンパク質、及び他の組換えタンパク質などの抗体を含む、そのようなキメラ重鎖定常ドメインを含む組換えポリペプチドも開示される。そのような組換えポリペプチドをコードする核酸、並びにそのような組換えポリペプチドを発現する細胞、及びそのような組換えポリペプチドを含む薬学的組成物も開示される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ定常ドメインを含む第 1 のポリペプチド鎖を含む、多重特異性抗体であって、前記キメラ定常ドメインが、N 末端から C 末端へ、

(a) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(i) 216～225 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 上部ヒンジアミノ酸配列 E P K S C D K T H T (配列番号 24)、

(i i) 226～229 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 コアヒンジアミノ酸配列 C P P C (配列番号 25)、

(i i i) 230～238 位 (EU 番号付け) のヒト IgG2 下部ヒンジアミノ酸配列 P C P A P P V A G P (配列番号 42)、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(b) ヒト IgG1 の 239～340 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 C H 2 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1 つ以上の C H 2 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 2 ドメインであって、前記 C H 2 が、アミノ酸置換 H 2 6 8 Q、K 2 7 4 Q、Y 2 9 6 F、A 3 2 7 G、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S (EU 番号付け) のうちの 1 つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、C H 2 ドメインと、

(c) ヒト IgG1 の 341～447 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 C H 3 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、ノブ置換 (例えば、T 3 6 6 W)、ホール置換 (例えば、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V)、スター変異 (例えば、H 4 3 5 R、Y 4 3 6 F)、ジスルフィド架橋を導入する変異 (例えば、S 3 5 4 C 若しくは E 3 5 7 C)、又は前述のうちの 2 つ以上の組み合わせから選択される 1 つ以上の C H 3 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 3 ドメインと、を含む、多重特異性抗体。

10

20

【請求項 2】

第 2 のポリペプチド鎖と会合した第 1 のポリペプチド鎖を含む、多重特異性抗体であって、

(a) 前記第 1 のポリペプチド鎖が、配列番号 1 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 のキメラ定常ドメインを含むが、但し、キメラ定常ドメインは、EU 番号付けによって定義されるアミノ酸 233～236 に P-V-A-不在の配列を有し、

(b) 前記第 2 のポリペプチド鎖が、配列番号 1 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 のキメラ定常ドメインを含むが、但し、キメラ定常ドメインは、EU 番号付けによって定義されるアミノ酸 233～236 に P-V-A-不在の配列を有する、多重特異性抗体。

30

【請求項 3】

第 2 のポリペプチド鎖と会合した第 1 のポリペプチド鎖を含む、多重特異性抗体であって、

(a) 前記第 1 のポリペプチド鎖が、第 1 のキメラ定常ドメインを含み、前記第 1 のキメラ定常ドメインが、N 末端から C 末端へ、

(i) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(1) 216～225 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 上部ヒンジアミノ酸配列 E P K S C D K T H T、

(2) 226～229 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 コアヒンジアミノ酸配列 C P P C、

(3) 230～238 位 (EU 番号付け) のヒト IgG2 下部ヒンジアミノ酸配列 P C P A P P V A G P、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(i i) ヒト IgG1 の 239～340 位 (EU 番号付け) のヒト IgG1 C H 2 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1 つ以上の C H 2 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 2 ドメインであって、任意選択的に、前記 C H 2 が、アミノ酸置換 H 2 6 8 Q、K 2 7 4 Q、Y 2 9 6 F、A 3 2 7 G、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S (EU 番号付け) のうちの 1 つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、C H 2 ドメインと、

40

50

(i i i) ヒト I g G 1 の 3 4 1 ~ 4 4 7 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 C H 3 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、ノブ置換 (例えば、T 3 6 6 W)、ホール置換 (例えば、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V)、スター変異 (例えば、H 4 3 5 R、Y 4 3 6 F)、ジスルフィド架橋を導入する変異 (例えば、S 3 5 4 C 若しくは E 3 5 7 C)、又は前述のうちの 2 つ以上の組み合わせから選択される 1 つ以上の C H 3 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 3 ドメインと、を含む、

(b) 前記第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 のキメラ定常ドメインを含み、前記第 2 のキメラ定常ドメインが、N 末端から C 末端へ、

(i) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(1) 2 1 6 ~ 2 2 5 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 上部ヒンジアミノ酸配列 E P K S C D K T H T、

(2) 2 2 6 ~ 2 2 9 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 コアヒンジアミノ酸配列 C P P C、

(3) 2 3 0 ~ 2 3 8 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 2 下部ヒンジアミノ酸配列 P C P A P P V A G P、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(i i) ヒト I g G 1 の 2 3 9 ~ 3 4 0 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 C H 2 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1 つ以上の C H 2 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 2 ドメインであって、任意選択的に、前記 C H 2 が、アミノ酸置換 H 2 6 8 Q、K 2 7 4 Q、Y 2 9 6 F、A 3 2 7 G、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S (E U 番号付け) のうちの 1 つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、C H 2 ドメインと、

(i i i) ヒト I g G 1 の 3 4 1 ~ 4 4 7 位 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 C H 3 ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1 つ以上の C H 3 ドメインアミノ酸置換を含む、C H 3 ドメインであって、任意選択的に、前記置換が、ノブ置換 (例えば、T 3 6 6 W)、ホール置換 (例えば、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V)、スター変異 (例えば、H 4 3 5 R、Y 4 3 6 F)、ジスルフィド架橋を導入する変異 (例えば、S 3 5 4 C 若しくは E 3 5 7 C)、又は前述のうちの 2 つ以上の組み合わせから選択される、C H 3 ドメインと、を含む、多重特異性抗体。

【請求項 4】

前記第 1 のキメラ定常ドメインが、前記第 2 のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 5】

前記第 2 のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する前記 1 つ以上のアミノ酸置換が、S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W (E U 番号付け) のうちの 1 つ以上である、請求項 4 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 6】

前記第 2 のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する前記 1 つ以上のアミノ酸置換が、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V (E U 番号付け) のうちの 1 つ以上である、請求項 4 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 7】

前記第 1 のキメラ定常ドメインが、配列番号 3、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 又は配列番号 22 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 97% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 8】

前記第 1 のキメラ定常ドメインが、配列番号 3、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 又は配列番号 22 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記第1のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項10】

前記第1のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のアミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項11】

前記第2のキメラ定常ドメインが、前記第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する1つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項12】

前記第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する前記1つ以上のアミノ酸置換が、S354C及びT366W（EU番号付け）のうちの1つ以上である、請求項11に記載の多重特異性抗体。

【請求項13】

前記第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する前記1つ以上のアミノ酸置換が、Y349C、T366S、L368A、及びY407V（EU番号付け）のうちの1つ以上である、請求項11に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項14】

前記第2のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも97%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項15】

前記第2のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項16】

前記第2のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項17】

前記第2のキメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のアミノ酸配列を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

40

【請求項18】

前記第1のキメラ定常ドメイン及び前記第2のキメラ定常ドメインが、同一である、請求項1～16のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項19】

前記多重特異性抗体が、ホモ二量体である、請求項18に記載の多重特異性抗体。

【請求項20】

前記第1のキメラ定常ドメイン及び前記第2のキメラ定常ドメインが、異なる、請求項1～16のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項21】

第1の定常ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

50

【請求項 22】

第1の定常ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体、請求項1～17のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 23】

第1の定常ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号18のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

【請求項 24】

第1の定常ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号18のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項 25】

第1の定常ドメインが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

【請求項 26】

第1の定常ドメインが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号22のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

【請求項 27】

第1の定常ドメインが、配列番号21のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

【請求項 28】

第1の定常ドメインが、配列番号21のアミノ酸配列を含み、第2の定常ドメインが、配列番号22のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項 29】

前記多重特異性抗体が、ヘテロ二量体である、請求項20～28のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 30】

第1の標的結合ドメインと、第2の標的結合ドメインと、を更に含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 31】

前記第1の標的結合ドメインが、第1の標的分子に結合し、前記第2の標的結合ドメインが、第2の標的分子に結合する、請求項30に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項 32】

前記第1の標的結合ドメイン及び前記第2の標的結合ドメインが、同じ標的分子に結合する、請求項30に記載の多重特異性抗体。

【請求項 33】

前記第1の標的結合ドメイン及び／又は前記第2の標的結合ドメインとは異なる標的分子に結合する第3の標的結合ドメインを更に含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 34】

前記多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、請求項1～33のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

40

【請求項 35】

前記多重特異性抗体が、三重特異性抗体である、請求項1～33のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 36】

前記多重特異性抗体が、三価抗体である、請求項1～35のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 37】

前記多重特異性抗体が、四価抗体である、請求項1～35のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

50

【請求項 38】

前記多重特異性抗体が、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1 定常ドメインを含む抗体と比較して、発現系において少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%の発現増加を示す、請求項1～37のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 39】

前記多重特異性抗体が、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1,000倍、少なくとも5,000倍、又は少なくとも10,000倍低減された、ヒトFc受容体(FcR)に対する結合を示す、請求項1～38のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項 40】

前記FcRが、FcRγ1、FcRγ2A、FcRγ2B、FcRγ3A、又はFcRγ3Bである、請求項39に記載の多重特異性抗体。

【請求項 41】

請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を含む、組成物。

【請求項 42】

前記組成物が、薬学的組成物であり、1つ以上の賦形剤及び／又は薬学的に許容される担体を更に含む、請求項41に記載の組成物。

20

【請求項 43】

請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体をコードする、核酸分子又は複数の核酸分子。

【請求項 44】

請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を発現するように操作された、宿主細胞。

【請求項 45】

請求項44に記載の宿主細胞を培養することと、任意選択的に、発現されたタンパク質を回収及び／又は精製することと、を含む、請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を産生する、方法。

30

【請求項 46】

多重特異性抗体の産生を増加させるための方法であって、請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体として前記多重特異性抗体を発現させることを含む、方法。

【請求項 47】

タンパク質が発現されるように、請求項44に記載の宿主細胞を培養することと、発現された前記タンパク質を回収することと、を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項 48】

前記方法が、EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236に配列E-L-L-Gを各々含む定常ドメインの対照対を含むバリエーションタンパク質の発現と比べて、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、又は少なくとも50%発現を増加させる、請求項46又は47に記載の方法。

40

【請求項 49】

任意選択的に、少なくとも10,000個の多重特異性抗体を含む、請求項1～40のいずれか一項に記載の多重特異性抗体の、集団。

【請求項 50】

EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236に配列E-L-L-Gを各々含む定常ドメインの対照対を含むタンパク質の集団と比較して、より高い活性を特徴とする、請求項49に記載の多重特異性抗体の集団。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月21日に出願された、米国仮特許出願第63／333,293号の優先権の利益を主張し、その内容は、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

2. 配列表

本出願は、電子的に提出されている配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2023年4月12日に作成された当該コピーは、RGN-013WO__SL.xmlという名称であり、サイズは58,069バイトである。

【背景技術】

【0003】

3. 背景技術

IgGクラスの抗体は、魅力的な治療剤である。IgGは、ヒトにおいて、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4の4つのサブクラスとして存在する。IgGの重鎖定常(CH)領域は、3つのドメインCH1、CH2、CH3、及びCH1及びCH2を連結するヒンジを含む。各サブクラスの役割は、種によって異なるように見えるが、重鎖定常ドメインは、様々な生物学的エフェクター機能に参与する。ヒトIgGサブクラスは、細胞死、食作用及びオプソニン化などのFcγ(FcγR)との相互作用を通じて、いくつかの細胞免疫応答を媒介する。そのような相互作用は、重鎖定常領域の少なくとも機能的なCH2及びCH3ドメインの、ナチュラルキラー細胞及び活性化マクロファージなどのエフェクター細胞の表面上のFcγRへの結合を伴う。補体媒介性溶解はまた、Fc領域(例えば、CH2及びCH3ドメイン)と様々な補体構成要素との相互作用によって誘発され得る。

【0004】

エフェクター機能は、いくつかのがん又は病原体の治療などのいくつかの抗体療法において有用であり、エフェクター機能は、がん細胞又は病原体を死滅させることに、主に又は少なくとも部分的に参与する。しかしながら、他の抗体療法は、受容体-リガンド相互作用の阻害又は受容体のアゴナイズーションなどのエフェクター非依存的メカニズムによって、完全に又は主に媒介される。そのような療法では、抗体エフェクター機能はほとんど又はまったく有用な目的を果たさないが、炎症を含む望ましくない効果をもたらす可能性がある。そのような状況では、抗体の薬物動態特性、免疫原性、並びに可変領域の特異性及び親和性に実質的に影響を与えることなく、利用可能なエフェクターメカニズムの一部又は全てを阻害するように、抗体のFc受容体結合特性を操作することが有利であり得る。いくつかのグループが、そのような抗体操作を行っている。

【0005】

IgG/FcγR相互作用に対するアミノ酸の効果を試験するために、IgG重鎖定常領域を様々な位置で変異させている(例えば、非特許文献1、非特許文献2、及び非特許文献3を参照されたい)。重鎖定常領域のヒンジ領域及びCH2ドメインにおけるいくつかのアミノ酸残基は、Fcγ受容体への結合を媒介するものとして提案されている(非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7を参照されたい)。CH2ドメインにおける部位(N297)のグリコシル化及びその炭水化物の組成の変動もまた、IgG/FcγR相互作用に強く影響する(非特許文献7、非特許文献8)。特許文献1は、IgG1上部ヒンジ、IgG1下部ヒンジ、IgG4 CH2、及びIgG1 CH3を含むキメラIgGを記載しており、下部ヒンジ領域のアミノ酸は、許容できないコンフォメーション変化及び結果として生じる免疫原性を伴うことなくFcγR結合を低減するように、ヒトIgG2アイソタイプからの対応するアミノ酸で置き換えられる。特許文献2は、アミノ酸233~236位(EU番号付け)が、Gly、Gly、Gly及び空(unoccupied)、Gly、Gly、空及び空、Gly、空、空及び空

10

20

30

40

50

、又は全て空きに改変される改変ヒンジ領域を有する操作 I g G 重鎖定常ドメインを記載しており、位置は E U 番号付けによって番号付けされている（特許文献 2 の図 1 に示される）。

【0006】

当該技術分野で知られているそれらのキメラ重鎖定常ドメインの代替物を有することは、貴重である。異なる I g G サブクラスに基づく代替的なキメラ重鎖定常領域を有することは、例えば、抗体活性の最適化、並びに改善された発現及び産生を可能にする。したがって、エフェクター機能が最小限に抑えられるべき疾患又は状態を治療するために使用することができる、F c γ R への結合が低減された重鎖定常領域、及びそれらを含む治療用ポリペプチド（例えば、組換え抗体）が求められる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】 W O 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7

【特許文献 2】 W O 2 0 1 6 / 1 6 1 0 1 0 A 2

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】 C a n f i e l d a n d M o r r i s o n , 1 9 9 1 , J E x p M e d 7 3 : 1 4 8 3 - 1 4 9 1

【非特許文献 2】 C h a p p e l e t a l . , 1 9 9 3 , J S C 2 6 8 (3 3) : 2 5 1 2 4 - 3 1

20

【非特許文献 3】 A r m o u r e t a l . , E u r J I m m u n o l 2 9 : 2 6 1 3 - 2 4

【非特許文献 4】 S a r m a y e t a l . , 1 9 9 2 , M o l I m m u n o l 2 9 : 6 3 3 - 9

【非特許文献 5】 G r e e n w o o d e t a l . , E u r J I m m u n o l 2 3 (5) : 1 0 9 8

【非特許文献 6】 M o r g a n e t a l . , 1 9 9 5 , I m m u n o l o g y 8 6 : 3 1 9

【非特許文献 7】 S t e v e n s o n , 1 9 9 7 , C h e m I m m u n o l 6 5 : 5 7 - 7 2

30

【非特許文献 8】 S i b e r i l e t a l . , 2 0 0 6 , I m m u n o l L t r s 1 0 6 : 1 1 1 - 1 1 8

【発明の概要】

【0009】

4. 発明の概要

本開示は、F c 受容体及び／又はエフェクター機能が低減されたキメラ重鎖定常ドメインに関する。

【0010】

本開示のキメラ重鎖定常ドメインは、ヒンジ領域が改変される I g G 1 重鎖定常ドメインに基づく。予想外に、本開示のキメラ定常ドメインを例示的な抗体に組み込むことにより、F c 受容体及びエフェクター機能の低下に加えて、それらの発現及び活性が改善された（例えば、セクション 8. 2（実施例 1）、セクション 8. 5（実施例 4）、セクション 8. 6（実施例 5）及びセクション 8. 7（実施例 6）を参照されたい）。

40

【0011】

したがって、本開示は、本開示のキメラ重鎖定常ドメインを含む、組換えタンパク質、例えば、融合タンパク質を提供する。キメラ重鎖定常ドメインは、有利には、様々な操作されたタンパク質、例えば、組換え抗体、免疫サイトカイン、及び可溶性受容体における二量体化部分として使用することができる。本開示のキメラ重鎖定常ドメインに加えて、組換えポリペプチドは、1 つ以上の標的結合ドメイン（例えば、1 つ以上の F a b 部分、

50

1つ以上の s c F v 部分、若しくはそれらの組み合わせ）及び／又は組換えタンパク質中の1つ以上の部分を分離する1つ以上のリンカー部分を含むことができる。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、組換え抗体、例えば、組換え多重特異性抗体である。

【0012】

例示的なキメラ重鎖定常ドメインは、セクション6.2.1に開示されている。定常ドメインを含む例示的な組換えタンパク質は、セクション6.2、群A：番号付き実施形態1～105及び110～214、群C：番号付き実施形態1～45、及び群D：番号付き実施形態1～24に開示されている。組換えタンパク質が抗体である場合、抗体に組み込むための例示的な標的結合ドメインは、セクション6.2.2に開示され、定常ドメインを標的結合ドメイン又は標的結合ドメインの異なる構成要素に接続するのに有用な例示的なリンカーは、セクション6.2.5に記載されている。

10

【0013】

本開示は、本開示の組換えタンパク質をコードする核酸を更に提供する。核酸は、単一の核酸（例えば、2つ以上のポリペプチド鎖をコードするベクター）又は複数の核酸（例えば、異なるポリペプチド鎖をコードする2つ以上のベクター）の形態にあり得る。本開示は、本開示の核酸及び組換えタンパク質を発現するように操作された宿主細胞及び細胞株を更に提供する。例示的な核酸、宿主細胞、及び細胞株は、セクション6.3、群A：番号付き実施形態108、109、216、及び217、群C：番号付き実施形態48～51、及び群D：番号付き実施形態25～27に記載されている。

【0014】

組換えポリペプチドを産生する方法、及び組換えタンパク質の発現及び／又は活性を増加させるために本開示の定常ドメインを使用する方法は、セクション6.3、群A：番号付き実施形態218～219、群B：番号付き実施形態1～69、群C：番号付き実施形態52、及び群D：番号付き実施形態28～41に記載されている。ある特定の実施形態では、本開示の組換えタンパク質の発現増加は、タンパク質収率及び／又は産生の増加によって、例えば、セクション8.1.6に記載される発現系などの発現系から得られるタンパク質の総量の増加として証明される。ある特定の実施形態では、本開示の組換えタンパク質の活性の増加は、標的結合及び／又はシグナル調節の増加によって証明される。

20

【0015】

本開示は、組成物、例えば、タンパク質の集団、及び本開示の組換えタンパク質を含む薬学的組成物を更に提供する。例示的な組成物は、セクション6.4、群A：番号付き実施形態106、107、214及び215、群B：番号付き実施形態70～72、群C：番号付き実施形態46、47及び53～55、並びに群D：番号付き実施形態42～46に記載されている。

30

【0016】

5. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】ヒトIgG1の重鎖定常領域（ヒトIGHG1重鎖定常領域；UniProt受託番号P01857）の野生型配列を描画する。CH1＝アミノ酸1～98；上部ヒンジ＝アミノ酸99～108；コアヒンジ＝109～112；下部ヒンジ＝113～121；CH2＝120～223；CH3＝224～330。示されるアミノ酸の番号付けは、描画される配列に対してである。上部、コア、及び下部ヒンジ領域は、枠で囲まれている。図に示されるように、下部ヒンジの最後の2つのアミノ酸は、CH2ドメインの最初の2つのアミノ酸に対応する。図1は、配列番号48を開示している。

40

【図2】ヒトIgG2の重鎖定常領域（ヒトIGHG2重鎖定常領域；UniProt受託番号P01859）の野生型配列を描画する。CH1＝アミノ酸1～98；上部ヒンジ＝アミノ酸99～105；コアヒンジ＝106～109；下部ヒンジ＝110～117；CH2＝116～219；CH3＝220～326。示されるアミノ酸の番号付けは、描画される配列に対してである。図に示されるように、下部ヒンジの最後の2つのアミノ酸

50

は、CH₂ドメインの最初の2つのアミノ酸に対応する。図2は、配列番号49を開示している。

【図3】ヒトIgG4の重鎖定常領域（ヒトIGHG4重鎖定常領域；UniProt受託番号P01861）の野生型配列を描画する。CH₁=アミノ酸1～98；上部ヒンジ=アミノ酸99～105；コアヒンジ=106～109；下部ヒンジ=110～118；CH₂=117～220；CH₃=221～227。示されるアミノ酸の番号付けは、描画される配列に対してである。図に示されるように、下部ヒンジの最後の2つのアミノ酸は、CH₂ドメインの最初の2つのアミノ酸に対応する。図3は、配列番号50を開示している。

【図4】認められたキメラIgG重鎖定常ドメイン構築物の上部ヒンジ、コアヒンジ、下部ヒンジ、CH₂、及びCH₃のアミノ酸配列アライメントを描画する。示されるアミノ酸の番号付けは、EU番号付けである。下部ヒンジの網掛けセルは、CH₂ドメインの最初の2つのアミノ酸にも対応するアミノ酸を示す。図4は、配列番号51（3及び4列目）、配列番号52（5列目）、配列番号53（6列目）、配列番号54（7列目）、及び配列番号55（8列目）を開示している。

【図5】IgG4 S108P/IgG4 S108Pスター（H315R、Y316F）又はIgG1 PVA/IgG1 PVAスター（H315R、Y316F）のいずれかのヘテロ二量体を含み、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において安定した発現に続いて、描画される2+1 N-scfv形式を有する、描画される代替形式抗体の抗体価を実証する代表的なデータを描画する。Fabとscfvとの間の様々な長さのリンカーを試験した。

【図6A】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表3に提供する。

【図6B】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表3に提供する。

【図6C】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表3に提供する。

【図6D】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表3に提供する。

【図6E】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表3に提供する。

【図6F】hFCRγ1（図6A）、hFCRγ2A（H131）（図6B）、hFCRγ2A（R131）（図6C）、hFCRγ2B（図6D）、hFCRγ3A（V158）（図6E）、hFCRγ3A（F158）（図6F）、及びhFCRγ3B（図7G）に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ

10

20

30

40

50

(E L I S A) データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表 3 に提供する。

【図 6 G】h F C R γ 1 (図 6 A)、h F C R γ 2 A (H 1 3 1) (図 6 B)、h F C R γ 2 A (R 1 3 1) (図 6 C)、h F C R γ 2 B (図 6 D)、h F C R γ 3 A (V 1 5 8) (図 6 E)、h F C R γ 3 A (F 1 5 8) (図 6 F)、及び h F C R γ 3 B (図 7 G) に対する、認められた対照及び抗体の結合を実証する代表的な酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) データを描画する。対照及び試験抗体の説明を表 3 に提供する。

【図 7】異なる F c 領域を有する示される 2 + 1 N - s c F v 代替形式抗体 (A F 1) を対照とともに試験した、サロゲート抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) アッセイからの代表的な結果を描画する。

【図 8】異なる F c 領域を有する示される 2 + 1 N - F a b 代替形式抗体 (A F 2) を対照とともに試験した、サロゲート A D C C アッセイからの代表的な結果を描画する。

【図 9】H E K 2 9 3 . S R E l u c . h F G F R 1 c . h K L B 細胞の活性化を引き起こした対照とともに、異なる F c 領域を有する 2 + 1 N - s c F v 形式抗体 (A F 1) を実証するルシフェラーゼレポーターアッセイからの代表的な結果を描画する。

【図 1 0】H E K 2 9 3 . S R E l u c . h F G F R 1 c . h K L B 細胞の活性化を引き起こした対照とともに、異なる F c 領域を有する 2 + 1 N - F a b 形式抗体 (A F 2 及び A F 3) を実証するルシフェラーゼレポーターアッセイからの代表的な結果を描画する。

【図 1 1】2 + 1 N - s c F v (A F 1) 又は 2 + 1 N - F a b (A F 3) 形式抗体を、I g G 4 S 1 0 8 P 若しくは I g G 1 P V A F c 領域又は H i s . h F G F 2 1 のいずれかとともに、一次ヒト脂肪細胞において活性化を引き起こしたことを実証する、ホスホー E R K 活性化アッセイからの代表的な結果を描画する。

【図 1 2】I g G 1 P V A F c 領域を有する二重特異性抗体が、I g G 4 S 1 0 8 P F c 領域を有する二重特異性抗体よりも高い最大 M F I シグナルで細胞表面標的に結合することを実証する代表的なフロー結合アッセイ結果を描画する。

【図 1 3 A】I g G - C D 4 0 複合体の陰性染色 E M 2 D クラス平均を描画する。図 1 3 A は、F c、F a b、及び C D 4 0、並びに F a b - F a b 角度に対応する特徴を表示する、例示的な陰性染色 E M 2 D 画像である。図 1 3 B は、その構成要素を含む図 1 3 A の図である。図 1 3 C は、I g G 1 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 D は、I g G 1 - P V A - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 E は、I g G 2 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示す。

【図 1 3 B】I g G - C D 4 0 複合体の陰性染色 E M 2 D クラス平均を描画する。図 1 3 A は、F c、F a b、及び C D 4 0、並びに F a b - F a b 角度に対応する特徴を表示する、例示的な陰性染色 E M 2 D 画像である。図 1 3 B は、その構成要素を含む図 1 3 A の図である。図 1 3 C は、I g G 1 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 D は、I g G 1 - P V A - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 E は、I g G 2 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示す。

【図 1 3 C】I g G - C D 4 0 複合体の陰性染色 E M 2 D クラス平均を描画する。図 1 3 A は、F c、F a b、及び C D 4 0、並びに F a b - F a b 角度に対応する特徴を表示する、例示的な陰性染色 E M 2 D 画像である。図 1 3 B は、その構成要素を含む図 1 3 A の図である。図 1 3 C は、I g G 1 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 D は、I g G 1 - P V A - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 E は、I g G 2 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示す。

【図 1 3 D】I g G - C D 4 0 複合体の陰性染色 E M 2 D クラス平均を描画する。図 1 3 A は、F c、F a b、及び C D 4 0、並びに F a b - F a b 角度に対応する特徴を表示する、例示的な陰性染色 E M 2 D 画像である。図 1 3 B は、その構成要素を含む図 1 3 A の図である。図 1 3 C は、I g G 1 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 D は、I g G 1 - P V A - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 E は、I g G 2 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示す。

【図 1 3 E】I g G - C D 4 0 複合体の陰性染色 E M 2 D クラス平均を描画する。図 1

10

20

30

40

50

3 A は、F c、F a b、及び C D 4 0、並びに F a b - F a b 角度に対応する特徴を表示する、例示的な陰性染色 E M 2 D 画像である。図 1 3 B は、その構成要素を含む図 1 3 A の図である。図 1 3 C は、I g G 1 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 D は、I g G 1 - P V A - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示し、図 1 3 E は、I g G 2 - C D 4 0 複合体の 2 D クラス平均を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

6. 発明を実施するための形態

6. 1. 定義

約、およそ：「約」、「およそ」などの用語は、明細書全体を通して数値の前に使用され、（例えば、端数、測定精度及び／又は精度の変動、タイミングなどを考慮するために）数値が必ずしも正確ではないことを示す。X がある数値である、「約 X」又は「およそ X」の開示は、「X」の開示でもあることを理解されたい。したがって、例えば、ある配列が別の配列に対して「約 X % の配列同一性」を有する実施形態の開示は、その配列が他の配列に対して「X % の配列同一性」を有する実施形態の開示でもある。

10

【0019】

及び（A n d）及び又は（O r）：別段に示されない限り、接続詞「又は」は、選択肢における特徴の選択（A の選択は B から相互に排他的である、A 又は B）と、結合した特徴の選択（A 及び B の両方が選択される、A 又は B）の両方を包含する、ブール論理演算子としてのその正しい意味で使用されることが意図される。本文のいくつかの箇所では、「及び／又は」という用語は同じ目的で使用され、「又は」が相互に排他的な選択肢を参照して使用されることを意味すると解釈されるべきではない。

20

【0020】

抗体：「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、一価断片（例えば、s c F v）、2 本の重鎖及び 2 本の軽鎖の二価四量体分子、並びにこれらのうちのいずれかの高次複合体を含む、少なくとも 1 つの抗原結合断片を有する任意の形態の抗体を含む。抗体は、単一特異性（この場合、全ての結合領域が同じ特異性を有する）、又は結合部位が少なくとも 2 つの特異性（例えば、二重特異性）を有する多重特異性であり得る。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体などを包含する。

30

【0021】

会合した：キメラ定常ドメイン、キメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチド、又は組換えポリペプチドの構成要素（例えば、抗原結合ドメイン）に関連する「会合した」という用語は、2 つ以上のポリペプチド鎖間又はポリペプチド鎖の部分間の機能的関係を指す。特に、「会合した」という用語は、2 つ以上のポリペプチドが、機能的な抗原結合ドメイン又は F c 領域を生成するように、例えば、分子相互作用を通して非共有結合的に、又は 1 つ以上のジスルフィド架橋若しくは化学的架橋を通して共有結合的に、互いに会合していることを意味する。本開示の組換えポリペプチド内に存在する可能性のある、又は本開示の組換えポリペプチドと 1 つ以上の追加のポリペプチドとの間に存在する可能性のある会合の例としては、本開示のホモ二量体又はヘテロ二量体キメラ重鎖定常ドメイン間の会合、F a b 又は s c F v 内の V H 領域と V L 領域との会合、F a b 内の C H 1 と C L との会合、及びドメイン置換 F a b 内の C H 3 と C H 3 との会合が挙げられる（が、これらに限定されない）。

40

【0022】

二価：本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメラ定常ドメインを含む抗体に関して本明細書で使用される「二価」という用語は、抗体が 2 つの抗原結合部分（例えば、抗体の 2 つの抗原結合断片、又は第 1 の抗体の第 1 の抗原結合断片及び第 2 の抗体の第 2 の抗原結合断片）を有することを意味する。本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメラ定常ドメインを含む抗体は、あるタイプの部分（例えば、第 1 の抗体の 2 つの抗原結合断片）に対して二価であってもよく、別のタイプの部分（例えば、第 2 の抗体の単一の抗原結

50

合断片) に対して一価であってもよい。

【0023】

キメラ重鎖定常ドメイン及びキメラ定常ドメイン: 「キメラ重鎖定常ドメイン」及び「キメラ定常ドメイン」という用語は、本開示の定常ドメインに関して使用される場合、IgG1上部ヒンジドメインと、IgG1コアヒンジドメインと、アミノ酸233~236位(EU番号付け)に置換/欠失変異ELLG(配列番号23)→PVA-(又は「P-V-A-不在」)を有するIgG1下部ヒンジドメインと、IgG1CH2ドメインと、IgG1CH3ドメインと、を含むIgG1定常ドメインを指すために交換可能に使用される。いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、IgG1CH1ドメインも含む。いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、例えば、エフェクター機能を更に変更するように、かつ/又はヘテロ二量体化を提供するように、更に改変することができる。本開示のキメラ定常ドメインは、セクション6.2に更に記載されている。

10

【0024】

キメラ定常ドメインは、2つの組換えポリペプチド鎖間の会合を促進して、二量体を形成することができる。二量体中の2つのキメラ定常ドメインは、同一であってもよい、又は異なるものであってもよい。したがって、得られる二量体は、ホモ二量体又はヘテロ二量体であり得る。

【0025】

置換/欠失変異ELLG(配列番号23)→PVA-(又は「P-V-A-不在」)を有するIgG1下部ヒンジドメインを含むキメラ定常ドメインは、「IgG1PVA」アイソタイプ又は同様の用語を有すると称されることがある。

20

【0026】

二量体化部分: 「二量体化部分」という用語は、2つのポリペプチド鎖間の会合を促進して二量体を形成することができるポリペプチド鎖又はアミノ酸配列を指す。第1の二量体化部分は、同一の第2の二量体化部分と会合することができ、又は第1の二量体化部分とは異なる第2の二量体化部分と会合することができる。いくつかの実施形態では、二量体化部分は、本開示の組換え定常ドメインであり、2つの組換え定常ドメインの会合がFc領域を形成する。したがって、Fc領域は、ホモ二量体又はヘテロ二量体であり得る。

【0027】

EC50: 「EC50」という用語は、指定された曝露時間後にベースラインと最大値との間の中間で応答を誘導する、本開示の組換えポリペプチド及び/又はキメラ定常ドメインを含む抗体などの分子の半数効果濃度(half maximal effective concentration)を指す。EC50は本質的に、その最大効果の50%が観察される抗体の濃度を表す。ある特定の実施形態では、EC50値は、ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて最大半量の活性化を与える抗体の濃度に等しい。

30

【0028】

Fab: 「Fab」という用語は、ポリペプチド鎖の対を指し、第1のポリペプチド鎖は、第1の定常ドメイン(本明細書ではC1と称される)のN末端にある抗体の可変重(VH)ドメインを含み、第2のポリペプチド鎖は、第1の定常ドメインと対形成することができる第2の定常ドメイン(本明細書ではC2と称される)のN末端にある抗体の可変軽(VL)ドメインを含む。天然抗体では、VHは、重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)のN末端にあり、VLは、軽鎖の定常ドメイン(CL)のN末端にある。本開示のFabは、天然配向に従って配置することができるか、又は正しいVH及びVLの対合を促進するドメイン置換若しくはスワップを含むことができる。例えば、ヘテロ二量体分子における正しい改変Fab-鎖対合を促進するために、FabにおけるCH1及びCLドメイン対をCH3ドメイン対に置き換えることが可能である。CH1をVLに付着させ、CLをVHに付着させるように、CH1及びCLを逆にすることも可能であり、一般に、Crossmabとして知られる構成である。

40

【0029】

Fcドメイン及びFc領域: 「Fcドメイン」という用語は、別の重鎖の対応する部分

50

と対合する免疫グロブリン重鎖の部分を目指す。「Fc領域」という用語は、2つの重鎖Fcドメインの会合によって形成された抗体ベースの結合分子の領域を指す。Fc領域内の2つのFcドメインは、互いに同一又は異なってもよい。天然抗体では、Fcドメインは典型的には同一であるが、一方又は両方のFcドメインは、有利には、ヘテロ二量体化を可能にするように、例えば、ノブ・イン・ホール相互作用を介して、かつ／又は精製を可能にするように、例えば、スター変異 (star mutation) を介して改変され得る。本開示のキメラ定常ドメインは、Fcドメインを含む。

【0030】

ヒンジ領域又はヒンジドメイン：本明細書で使用される場合、「ヒンジ領域」及び「ヒンジドメイン」という用語は、CH1のC末端を免疫グロブリンのCH2ドメインのN末端に接続する連続したアミノ酸残基を指す。ヒトIgG1、IgG2、及びIgG4において、ヒンジ領域は、EU番号付けによる残基216から238まで伸びており、残基237及び238はCH2ドメインと重複している。残基216～225 (EU番号付け) は、上部ヒンジを形成し、残基226～229 (EU番号付け) は、中間 (又はコア) ヒンジを形成し、残基230～238 (EU番号付け) は、下部ヒンジを形成する。IgG1、IgG2、及びIgG4の上部及び中間のヒンジは、異なるヒンジエクソンによってコードされる12～15個の連続したアミノ酸である。下部ヒンジは、(CH2エクソンによってコードされる) CH2ドメインのいくつかのN末端アミノ酸を含む (Brekke et al., 1995, Immunology Today 16 (2) : 85-90)。例えば、図4を参照されたい。

【0031】

宿主細胞又は組換え宿主細胞：「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、異種核酸の導入によって遺伝子操作されている細胞を指す。かかる用語が、特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫も指すよう意図されていることを理解されたい。変異又は環境の影響のいずれかにより特定の改変が後続世代で生じ得るため、かかる子孫は、実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。宿主細胞は異種核酸を、例えば、染色体外異種発現ベクター上に一時的に、又は、例えば、異種核酸を宿主細胞ゲノムに組み込むことによって安定的に、保有することができる。本開示の組換えポリペプチドを発現する目的で、宿主細胞は、哺乳動物起源の又は哺乳動物様特性の細胞株、例えば、サル腎臓細胞 (COS、例えば、COS-1、COS-7)、HEK293 (及びより高密度の成長に適応しているExp293などの誘導体)、ベビーハムスター腎臓 (BHK、例えば、BHK21)、チャニーズハムスター卵巢 (CHO)、NSO、PerC6、BSC-1、ヒト肝細胞がん細胞 (例えば、HepG2)、SP2/0、HeLa、Madin-Darbyウシ腎臓 (MDBK)、骨髄腫及びリンパ腫細胞、又はそれらの誘導体及び／若しくは操作されたバリエーションであり得る。操作されたバリエーションには、例えば、グリカンプロファイル改変及び／又は部位特異的組み込み部位誘導体が含まれる。

【0032】

一価：本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメラ定常ドメインを含む抗体に関して本明細書で使用される場合、「一価」という用語は、抗体が第1の標的分子に特異的な1つの抗原結合部分を有することを意味する。本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメラ定常ドメインを含む抗体は、あるタイプの部分 (例えば、第1の抗体の単一の抗原結合断片) に対して一価であってもよく、別のタイプの部分 (例えば、第2の抗体の2つの抗原結合断片) に対して二価であってもよい。

【0033】

多価：本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメラ定常ドメインを含む抗体に関して本明細書で使用される「多価」という用語は、抗体が2つ以上の抗原結合部分 (例えば、抗体の2つの抗原結合断片、又は第1の抗体の第1の抗原結合断片及び第2の抗体の第2の抗原結合断片) を有することを意味する。本開示の組換えポリペプチド及び／又はキメ

ラ定常ドメインを含む抗体は、あるタイプの部分（例えば、第1の抗体の2つ以上の抗原結合断片）に対して多価であってもよく、別のタイプの部分（例えば、第2の抗体の単一の抗原結合断片）に対して一価であってもよい。

【0034】

作動可能に連結された：本明細書で使用される「作動可能に連結された」という用語は、ポリペプチド鎖の2つ以上の領域間の機能的関係を指し、機能的ポリペプチド又は2つ以上の核酸配列を産生するように、例えば、2つのポリペプチド構成要素のフレーム内融合を産生するように若しくは調節配列をコード配列に連結するように、その2つ以上の領域が連結されている。

【0035】

組換えポリペプチド：「組換えポリペプチド」という用語は、本開示のキメラ定常ドメインを含むポリペプチドを指す。概して、組換えポリペプチドは、本開示のキメラ定常ドメイン及び少なくとも1つの抗原結合部分を含む。

【0036】

本開示との関連で、「組換えポリペプチド」という用語は、分子のコア構成要素（複数可）、すなわち、キメラ定常ドメインを指すこともあり、抗原結合部分も指すこともある。「組換えポリペプチド」という用語は、文脈で別段指示されない限り、追加の特徴、例えば、1つ以上の安定化部分、1つ以上のリンカー部分、及び前述のものの任意の組み合わせを含むポリペプチドにも及ぶことが理解されるべきである。

【0037】

一本鎖Fv又はscFv：本明細書で使用される「一本鎖Fv」又は「scFv」という用語は、抗体のVHドメイン及びVLドメインを含むポリペプチド鎖を指し、これらのドメインは、一本鎖ポリペプチドに存在する。

【0038】

特異的に（又は選択的に）結合：本明細書で使用される場合、「特異的に（又は選択的に）結合」という用語は、その抗原結合部分、例えば、抗体又は抗原結合ドメイン（「ABD」）が、生理学的条件下で比較的安定な標的分子と複合体を形成することを意味する。特異的結合は、約 5×10^{-2} M以下（例えば、 5×10^{-2} M未満、 10^{-2} M未満、 5×10^{-3} M未満、 10^{-3} M未満、 5×10^{-4} M未満、 10^{-4} M未満、 5×10^{-5} M未満、 10^{-5} M未満、 5×10^{-6} M未満、 10^{-6} M未満、 5×10^{-7} M未満、 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-9} M未満、 10^{-9} M未満、又は 10^{-10} M未満）の K_D によって特徴付けることができる。抗体又は抗体断片の標的分子への結合親和性を決定するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴（例えば、Biacoreアッセイ）、蛍光活性化細胞選別（FACS）結合アッセイなどを含む。1つの種からの標的分子に特異的に結合する抗原結合部分は、しかしながら、1つ以上の他の種からの標的分子に対して交差反応性を有し得る。

【0039】

標的結合ドメイン：本明細書で使用される場合、「標的結合ドメイン」という用語は、標的分子に特異的、非共有結合的、及び可逆的に結合することができるポリペプチド配列又は関連ポリペプチド配列の群を指す。この用語は、標的分子に特異的、非共有結合的、及び可逆的に結合することができる抗体の部分に指す「抗原結合ドメイン」及び「抗原結合断片」を含む。「標的結合ドメイン」はまた、標的分子（例えば、TNF）に特異的、非共有結合的、及び可逆的に結合することができる受容体（例えば、TNF受容体）の標的結合部分を包含する。標的結合ドメインは、本開示の組換えポリペプチドに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、1つ以上の標的結合ドメインを含む組換えポリペプチドは、抗体又は融合タンパク質に含まれ得る。そのような抗体は、以下のセクション6.2.2に記載されている。融合タンパク質は、以下のセクション6.2.3に記載されている。

【0040】

標的分子：本明細書で使用される場合、「標的分子」という用語は、本開示の組換えポリペプチドを含む抗体中の抗原結合部分によって特異的に結合することができる、細胞表面上又は細胞外マトリックス中に発現される任意の生物学的分子（例えば、タンパク質、炭水化物、脂質、又はそれらの組み合わせ）を指す。

【0041】

ユニバーサル軽鎖：抗原結合部分との関連で本明細書で使用される「ユニバーサル軽鎖」という用語は、抗原結合部分の重鎖領域と対合することができ、他の重鎖領域と対合することもできる軽鎖ポリペプチドを指す。ユニバーサル軽鎖は、「共通の軽鎖」としても知られている。

【0042】

VH：「VH」という用語は、scFv又はFabの重鎖を含む、抗体の免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。

VL：「VL」という用語は、scFv又はFabの軽鎖を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

【0043】

6.2. 組換えポリペプチド

本開示は、ヒンジ領域がFc受容体及び／又はエフェクター機能を低減するように改変されるIgG1重鎖定常ドメインに基づくキメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチドを提供する。本開示の組換えポリペプチドは、2つのポリペプチド鎖間の会合を促進して二量体を形成することができる二量体化部分として機能することができる。いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチドは、二量体化して、抗体を形成することができる。本開示の組換えポリペプチドを含む抗体は、以下のセクション6.2.2に記載されている。他の実施形態では、本開示の組換えポリペプチドは、二量体化して、融合タンパク質を形成することができる。本開示の組換えポリペプチドを含む融合タンパク質は、以下のセクション6.2.3に記載されている。本開示の抗体又は融合タンパク質に含まれる本開示の組換えポリペプチドは、本開示のキメラ定常ドメインに加えて、1つ以上の標的結合ドメイン（例えば、1つ以上のFab部分、1つ以上のscFv部分、1つ以上の標的受容体若しくはその結合断片）及び／又は組換えポリペプチド内の1つ以上の部分を分離する1つ以上のリンカー部分を含むことができる。標的結合ドメインは、セクション6.2.4に記載されている。本開示の組換えポリペプチドにおいて有用なリンカーは、セクション6.2.5に記載されている。

【0044】

6.2.1. キメラ定常ドメイン

本開示は、IgG1重鎖定常ドメインに基づくキメラ定常ドメインを提供する。本開示のキメラ定常ドメインは、IgG1上部ヒンジドメイン、アミノ酸233～236位（EU番号付け）に置換／欠失変異ELLG（配列番号23）→PVA-を有するIgG1下部ヒンジドメイン、IgG1CH2ドメイン、及びIgG1CH3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、IgG1CH1ドメイン又はその断片も含む。

【0045】

IgG/FcγR相互作用に対するアミノ酸の効果を試験するために、IgG重鎖定常領域を様々な位置で変異させている（例えば、Canfield and Morrison, 1991, J Exp Med 73:1483-1491、Chappellet al., 1993, JSC 268(33):25124-31、及びArmour et al., Eur J Immunol 29:2613-24を参照されたい）。重鎖定常領域のヒンジ領域及びCH2ドメインにおけるいくつかのアミノ酸残基は、Fcγ受容体への結合を媒介するものとして提案されている（Sarmay et al., 1992, Mol Immunol 29:633-9、Greenwood et al., Eur J Immunol 23(5):1098、Morgan et al., 1995, Immunology 86:319、Stevenson, 1997,

10

20

30

40

50

Chem Immunol 65:57-72を参照されたい)。CH2ドメインにおける部位(N297)のグリコシル化及びその炭水化物の組成の変動もまた、IgG/FcγR相互作用に強く影響する(Stevenson, 1997, Chem Immunol 65:57-72、Siberil et al., 2006, Immunol Lett 106:111-118)。

【0046】

アラニン残基は、アラニンが任意の官能基を持たない側鎖を有するため、通常、機能を低減するために、天然アミノ酸を非天然アミノ酸に置き換えるための好ましい置換基であった。例えば、アラニンスキャニング変異誘発の周知の技術は、どの天然残基が主に機能に寄与しているかを識別するために、タンパク質又はタンパク質ドメイン内の全ての天然残基をアラニンに体系的に置き換える。アミノ酸をアラニンを有する官能基で置き換えると、官能基及び任意の受容体への結合へのその寄与が排除されるが、アラニン側鎖の存在は、コンフォメーションを実質的に保持し、コンフォメーション変化に起因する免疫原性又は他の複雑さの可能性を低減する。代替戦略は、IgG1上部ヒンジ、IgG1下部ヒンジ、IgG4 CH2、及びIgG1 CH3を含むキメラIgGの下部ヒンジ領域内のアミノ酸を、ヒトIgG2アイソタイプからの対応するアミノ酸で置き換えて、許容できないコンフォメーション変化及び結果として生じる免疫原性を伴うことなくFcγR結合を低減する(WO14/121087を参照されたい)。更に別の代替戦略では、改変ヒンジ領域のアミノ酸233~236位(EU番号付け)は、G、G、G及び空き、G、G、空き及び空き、G、空き、空き及び空き、又は全てが空きであり得、位置はEU番号付けによって番号付けされている(WO2016/161010A2の図1に示される)。

10

20

【0047】

Fc受容体及び／又はエフェクター機能を低減するように改変されたヒンジ領域を有するIgG1重鎖定常領域が提供される。改変は、ELLG(配列番号23)のPVAーによる置換／欠失によって、アミノ酸233~236位(EU番号付け)で生じ、アミノ酸236は欠失している。特定の実施形態では、Fc受容体は、Fcγ受容体である。一実施形態では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。一実施形態では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。具体的な実施形態では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的には、ヒトFcγRIIIa、FcγRI又はFcγRIIIa、最も具体的には、ヒトFcγRIIIaである。一実施形態では、エフェクター機能は、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、及びサイトカイン分泌の群から選択される1つ以上である。特定の実施形態では、エフェクター機能は、ADCCである。

30

【0048】

本実施例に提示されるように、IgG1バックグラウンドにおけるこの置換／欠失変異(アミノ酸233~236位(EU番号付け)のELLG(配列番号23)→PVAー)が、FcR関与を低減し、免疫原性を最小限に抑えながらヒンジの柔軟性を最大化し、それによって、例えば、治療用抗体及びFc融合タンパク質に含めるための代替的なキメラ重鎖定常領域を提供することが見出された。当該技術分野で知られているそれらのキメラ重鎖定常領域の代替物を有することは、貴重である。異なるIgGサブクラスに基づく代替的なキメラ重鎖定常領域を有することは、例えば、抗体活性の最適化を可能にする。この改変免疫グロブリン定常領域は、実質的に任意の形式の抗体又はFc融合タンパク質に組み込むことができる。このような抗体又は融合タンパク質は、抗体が受容体リガンド相互作用を阻害するか、又は受容体をアゴナイズする場合のように、治療方法、特に、抗体又はFc融合タンパク質の作用機序が主に又は全くエフェクター機能に依存しない治療方法で使用方法を使用することができる。

40

【0049】

アミノ酸位置233~236(EU番号付け)の→ELLG(配列番号23)→PVAー置換／欠失を除いて、キメラ定常ドメインは、IgG1と、1、2、3、4、5、6、

50

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個以下の置換、欠失、又は挿入が異なる場合、IgG1アイソタイプのものであるとみなされが、但し、CH1ドメインは、上部ヒンジ領域と同様に、任意選択的に完全に省略することができる。CH1、CH2、及びCH3ドメインは、各々、IgG1野生型配列のCH1、CH2、及びCH3領域と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個以下の置換、欠失、又は挿入が異なる場合、IgG1アイソタイプのものであるとみなされる。置換、欠失、及び／又は挿入（アミノ酸233～236位（EU番号付け）のELLG（配列番号23）→PVA－置換／欠失を除く）は、任意の置換、欠失、及び／又は挿入であり得る。いくつかの実施形態では、置換、欠失、及び／又は挿入は、例えば、別のIgGアイソタイプ（例えば、IgG2、IgG3、又はIgG4）のCH1、CH2、又はCH3と同一の配列をもたらさない。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のキメラ定常ドメインが、H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）のうちの1つ以上を含む場合、それらは全て同時に生じるわけではない。IgG1、IgG2、及びIgG4の重鎖定常領域の野生型配列を、それぞれ、CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3領域を図示して、図1、2、及び3に描画する。本開示のキメラ定常ドメインに含まれ得る例示的な変異を以下に提供する。

10

【0050】

野生型IgG1重鎖定常領域（アミノ酸216～447、EU番号付け）の配列は、以下を含む：

20

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号1）

ここで、上部ヒンジ領域は、EPKSCDKTHT（配列番号24）（アミノ酸216～225（EU番号付け）；野生型IgG1定常ドメイン配列のアミノ酸1～10）を含み、コアヒンジは、CPPC（配列番号25）（アミノ酸226～229（EU番号付け）；野生型IgG1定常ドメイン配列のアミノ酸11～14）を含み、下部ヒンジ領域は、PAPELLG（配列番号26）（アミノ酸230～236（EU番号付け）；野生型IgG1定常ドメイン配列のアミノ酸15～21）を含み、CH2は、GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK（配列番号27）（アミノ酸番号237～340（EU番号付け）；野生型IgG1定常ドメイン配列のアミノ酸22～125）を含み、CH3は、GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号28）（アミノ酸番号341～447）（EU番号付け）；野生型IgG1定常配列のアミノ酸126～232）を含む。アミノ酸237～238（EU番号付け）は、下部ヒンジのC末端及びCH2領域のN末端の両方を表すことが当業者によって認識されるであろう。しかしながら、本開示の目的のために、アミノ酸237～238（EU番号付け）は、下部ヒンジの一部として示される。

30

40

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書でIgG1 PVA（アミノ酸216～447；EU番号付け）とも呼称される本開示のキメラ定常領域の配列は、以下を含む：

EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT

50

ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号2）、
 ここで、上部ヒンジ領域は、EPKSCDKTHT（配列番号56）（アミノ酸216
 ～225（EU番号付け）；IgG1 PVA定常ドメイン配列のアミノ酸1～10）を
 含み、コアヒンジは、CPPC（配列番号57）（アミノ酸226～229（EU番号付
 け）；IgG1 PVA定常ドメイン配列のアミノ酸11～14）を含み、下部ヒンジ領
 域は、PAPPVA（配列番号29）（アミノ酸230～236（EU番号付け）；Ig
 G1 PVA定常ドメイン配列のアミノ酸15～20）を含み、CH2は、GPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAK（配列番号58）（アミノ酸番号237～340
 （EU番号付け）；IgG1 PVA配列のアミノ酸21～124）を含み、CH3は、
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号59）（アミノ酸
 番号341～447）（EU番号付け）；IgG1 PVA配列のアミノ酸125～23
 1）を含む。

【0052】

いくつかの態様では、キメラ定常ドメインは、以下の配列と少なくとも90%、少なく
 とも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95
 %、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98%、又は
 100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む：

EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号2）。

【0053】

キメラ定常ドメインはまた、ヘテロ二量体化及び／又は精製を促進するために、ノブ変
 異、ホール変異、スター変異、ジスルフィド架橋形成変異などを含むことができる。

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号3のキメラ定常ドメイン（
 IgG1 PVA）と少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、
 少なくとも99%の配列同一性、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む
 。

【0054】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号15のキメラ定常ドメイン（ノブ
 変異T366W（EU番号付け）を有するIgG1 PVA）と少なくとも97%の配列
 同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性、又は100%
 の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0055】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号16のキメラ定常ドメイン（ホー
 ル変異T366S、L368A、Y407V（EU番号付け）を有するIgG1 PVA
 ）と少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なくとも99%
 の配列同一性、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0056】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号17のキメラ定常ドメイン（ノブ
 変異T366W及びスター変異H435R、Y436F（EU番号付け）を有するIgG
 1 PVA）と少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、少なく

10

20

30

40

50

とも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0057】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号 18 のキメラ定常ドメイン（ホール変異 T366S、L368A、Y407V 及びスター変異 H435R、Y436F（EU 番号付け）を有する IgG1 PVA）と少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0058】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号 19 のキメラ定常ドメイン（ノブ変異 T366W 及び Cys 変異 S354C（EU 番号付け）を有する IgG1 PVA）と少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0059】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号 20 のキメラ定常ドメイン（ホール変異 T366S、L368A、Y407V 及び Cys 変異 S354C（EU 番号付け）を有する IgG1 PVA）と少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0060】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号 21 のキメラ定常ドメイン（ノブ変異 T366W、スター変異 H435R、Y436F、及び Cys 変異 S354C（EU 番号付け）を有する IgG1 PVA）と少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0061】

他の実施形態では、キメラ定常ドメインは、配列番号 22 のキメラ定常ドメイン（ホール変異 T366S、L368A、Y407V、スター変異 H435R、Y436F、及び Cys 変異 S354C（EU 番号付け）を有する IgG1 PVA）と少なくとも 97% の配列同一性、少なくとも 98% の配列同一性、少なくとも 99% の配列同一性、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、キメラ定常ドメインの N 末端に CH1 ドメイン又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、CH1 ドメインは、ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV（配列番号 30）又はその断片若しくはバリエーション、例えば、最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個の置換、欠失、又は挿入を有するバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、CH1 断片を含む。ある特定の実施形態では、CH1 断片は、DKKV（配列番号 31）を含むか、又はそれからなる。他の実施形態では、CH1 断片は、DKRV（配列番号 32）を含むか、又はそれからなる。

40

【0063】

6.2.1.1. 改変キメラ定常ドメイン

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、エフェクター機能を更に変更し、かつ／又はヘテロ二量体化を提供するように改変される。例示的な改変は、セクション 6.2.1.1.1 及び 6.2.1.1.2 に記載されている。

【0064】

6.2.1.1.1. エフェクター機能の更なる改変を伴うキメラ定常ドメイン

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、アミノ酸 233～236 位（EU 番号付け）に ELLG（配列番号 23）→PVA-置換／欠失に加えて、1つ以上のアミノ

50

酸置換を含み、この追加のアミノ酸置換は、Fc受容体への結合及び／又はエフェクター機能を更に低減する。

【0065】

いくつかの実施形態では、Fc受容体は、Fcγ受容体である。ある特定の実施形態では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。特定の実施形態では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。具体的な実施形態では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的には、ヒトFcγRIIIa、FcγRI又はFcγRIIIa、最も具体的には、ヒトFcγRIIIaである。一実施形態では、エフェクター機能は、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、及びサイトカイン分泌の群から選択される1つ以上である。特定の実施形態では、エフェクター機能は、ADCCである。

10

【0066】

一実施形態では、キメラ定常ドメインは、L234、L235、G237、D265、N297、P329、A330、P331、及びP329位(EU番号付け)のうちの1つ以上に1つ以上のアミノ酸置換を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、P329位(EU番号付け)にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、アミノ酸置換は、P329A又はP329G、特にP329G(EU番号付け)である。一実施形態では、キメラ定常ドメインは、P329位にアミノ酸置換、並びにN297位及び／又はP331位に更なるアミノ酸置換(EU番号付け)を含む。より具体的な実施形態では、更なるアミノ酸置換は、N297A若しくはN297D及び／又はP331Sである。

20

【0068】

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、G237、A330、及びP331位(EU番号付け)にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、アミノ酸置換は、G237A、A330S、及びP331S(Kabat EUインデックスに従う番号付け)である。

【0069】

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、エフェクター機能を低減するためのD265A及びN297A変異(EU番号付け)を含む。

30

抗体又は融合タンパク質に組み込まれると、同じ1つ以上の追加のアミノ酸置換は、抗体又は融合タンパク質に含まれる2つのキメラ定常ドメインの各々に存在し得る。したがって、特定の実施形態では、各キメラ定常ドメインは、アミノ酸置換G237A、A330S、及びP331S(EU番号付け)を含み、すなわち、第1及び第2のキメラ定常ドメインの各々において、237位のグリシン残基がアラニン残基で置換され(G237A)、330位のアラニン残基がセリン残基で置換され(A330S)、331位のプロリン残基がセリン残基で置換される(P331S)(EU番号付け)。

【0070】

6.2.1.1.2. キメラ定常ドメインヘテロ二量体化バリエーション

ある特定の実施形態では、本開示の組換えポリペプチドは、キメラ定常ドメインを介して二量体化される。いくつかの実施形態では、得られた二量体は、抗体若しくはFc融合タンパク質を形成するか、又はその一部を形成する。ある特定の実施形態では、第1の組換えポリペプチドは、同一の第2の組換えポリペプチドと二量体化し、ホモ二量体を形成する。他の実施形態では、第1の組換えポリペプチドは、第1の組換えポリペプチドと同一ではない第2の組換えポリペプチドと二量体化し、ヘテロ二量体を形成する。例えば、第1の組換えポリペプチドは、第1の標的分子に特異的な第1の標的結合ドメインを含むことができ、第2の組換えポリペプチドは、第2の標的分子に特異的な第2の標的結合ドメインを含むことができる。第1及び第2の組換えポリペプチドが、それぞれのキメラ定常ドメインを介して二量体化すると、結果は、ヘテロ二量体である。組換えポリペプチドの不適切なヘテロ二量体化(例えば、Fc領域を形成するための各組換えポリペプチドの

40

50

キメラ定常ドメインのヘテロ二量体化)は、所望のヘテロ二量体分子の収率を増加させるための障害となる可能性があり、精製の課題となる。例えば、EP 1 8 7 0 4 5 9 A 1 ; 米国特許第 5 , 5 8 2 , 9 9 6 号 ; 米国特許第 5 , 7 3 1 , 1 6 8 号 ; 米国特許第 5 , 9 1 0 , 5 7 3 号 ; 米国特許第 5 , 9 3 2 , 4 4 8 号 ; 米国特許第 6 , 8 3 3 , 4 4 1 号 ; 米国特許第 7 , 1 8 3 , 0 7 6 号 ; 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 2 0 4 4 9 3 A 1 号 ; 及び P C T 公開第 W O 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 A 1 号に開示されているように、本開示の組換えポリペプチドの二量体化を増強するために当該技術分野で利用可能な様々なアプローチを使用することができる。

【0071】

本開示は、本開示の組換えポリペプチドを含むヘテロ二量体を提供する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体は、抗体である。他の実施形態では、ヘテロ二量体は、Fc 融合タンパク質である。キメラ定常ドメインのCH3ドメインを介した組換えポリペプチドのヘテロ二量体化は、所望のヘテロ二量体(例えば、抗体又は融合タンパク質)を生じさせることができるが、同一のキメラ定常ドメインのホモ二量体化は、収率を低下させるであろう。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の抗体又は融合タンパク質を形成するために会合する組換えポリペプチドは、非改変定常ドメインと比べてヘテロ二量体会合に有利な改変を有するCH3ドメインを含有するキメラ定常ドメインを含むであろう。

【0072】

具体的な実施形態では、ヘテロ二量体の形成を促進する当該改変は、キメラ定常ドメインの一方に「ノブ」改変を含み、他方のキメラ定常ドメインに「ホール」改変を含む、いわゆる「ノブ・イントゥ・ホール」又は「ノブ・イン・ホール」改変である。ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば、米国特許第 5 , 7 3 1 , 1 6 8 号、US 7 , 6 9 5 , 9 3 6、Ridgway et al., 1996, Prot Eng 9:617-621、及びCarter, 2001, Immunol Meth 248:7-15に記載されている。一般に、この方法は、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げるために、突起を空洞内に配置することができるように、第1のポリペプチドの界面に突起(「ノブ」)及び第2のポリペプチドの界面に対応する空洞(「ホール」)を導入することを含む。突起は、第1のポリペプチドの界面からの小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)で置き換えることによって構築される。突起と同じ又は類似のサイズの補償空洞は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖(例えば、アラニン又はスレオニン)に置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作製される。

【0073】

したがって、いくつかの実施形態では、第1のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内のアミノ酸残基は、より大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、第2のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内の空洞内に配置可能な第1のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内に突起を生じさせ、第2のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内のアミノ酸残基は、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、第2のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内に空洞を生じさせ、その中に第1のキメラ定常ドメインのCH3ドメイン内の突起が配置可能である。好ましくは、より大きい側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、及びトリプトファン(W)からなる群から選択される。好ましくは、より小さい側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、及びバリン(V)からなる群から選択される。突起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を変化させることによって、例えば、部位特異的変異誘発によって、又はペプチド合成によって作製することができる。

【0074】

具体的な実施形態では、第1のキメラ定常ドメインでは、366位のスレオニン残基がトリプトファン残基で置換され(T366W)、第2のキメラ定常ドメインでは、407位のチロシン残基がバリン残基で置換され(Y407V)、任意選択的に、366位のス

10

20

30

40

50

レオニン残基がセリン残基で置換され（T 3 6 6 S）、3 6 8 位のロイシン残基がアラニン残基で置換される（L 3 6 8 A）（E U 番号付け）。更なる実施形態では、第 1 のキメラ定常ドメインでは、追加的に、3 5 4 位のセリン残基がシステイン残基で置き換えられる（S 3 5 4 C）か、又は 3 5 6 位のグルタミン酸残基がシステイン残基で置き換えられる（E 3 5 6 C）（特に、3 5 4 位のセリン残基がシステイン残基で置き換えられる）。第 2 のキメラ定常ドメインでは、追加的に、3 4 9 位のチロシン残基がシステイン残基で置き換えられる（Y 3 4 9 C）（E U 番号付け）。特定の実施形態では、第 1 のキメラ定常ドメインはアミノ酸置換 S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W を含み、第 2 の F c ドメインはアミノ酸置換 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A 及び Y 4 0 7 V（E U 番号付け）を含む。
【0075】

10

いくつかの実施形態では、静電的ステアリング（electrostatic steering）（例えば、Gunasekaran et al., 2010, J Biol Chem 285 (25) : 19637-46 に記載）を使用して、第 1 及び第 2 のキメラ定常ドメインの会合を促進することができる。
【0076】

ヘテロ二量体化を促進するように改変されたキメラ定常ドメインの使用の代替として、又はそれに加えて、キメラ定常ドメインは、キメラ定常ドメインヘテロ二量体の選択を可能にする精製戦略を可能にするように改変され得る。そのような一実施形態では、1 つの組換えポリペプチドは、プロテイン A へのその結合を抑止する改変キメラ定常ドメインを含み、したがって、ヘテロ二量体タンパク質をもたらす精製方法を可能にする。例えば、米国特許第 8, 586, 713 号を参照されたい。そのような、抗体又は融合タンパク質は、第 1 の C H 3 ドメイン及び第 2 の C H 3 ドメインを含み、第 1 及び第 2 の C H 3 ドメインが、少なくとも 1 つのアミノ酸により互いに異なり、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠く対応する抗体又は融合タンパク質と比較して、プロテイン A への抗体又は融合タンパク質の結合を低減させる。一実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインはプロテイン A に結合し、第 2 の C H 3 ドメインは、プロテイン A 結合を減少又は消失させる変異／改変、例えば H 4 3 5 R 改変（E U 番号付け）を含有する。第 2 の C H 3 は、Y 4 3 6 F 改変（E U 番号付け）を更に含んでもよい。このクラスの改変は、本明細書において「スター」変異と称される。

20

【0077】

30

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインは、ヘテロ二量体化を促進するための 1 つ以上の変異（例えば、ノブ及びホール変異）、並びに精製を促進するためのスター変異を含み得る。

【0078】

6. 2. 2. 抗体

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチドは、二量体化して、抗体を形成する。組換えポリペプチドは、キメラ抗体、ヒト化抗体、ベニア抗体、又はヒト抗体を含む任意のタイプの操作された抗体において使用され得る。抗体は、モノクローナル抗体又は遺伝子操作されたポリクローナル抗体であり得る。

【0079】

40

本開示の抗体は、典型的には、本開示の組換えポリペプチドを含むか、又はそれからなり、組換えポリペプチドは、各々、キメラ定常ドメインと、1 つ以上の抗原結合ドメインと、任意選択的に、組換えポリペプチド中の 1 つ以上のドメインを分離する 1 つ以上のリンカーとを含む。

【0080】

抗体は、本開示の 1 つ以上の組換えポリペプチドから構成され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、任意選択的に、1 つ以上の追加のポリペプチド鎖（例えば、F a b の場合などの抗原結合ドメインの軽鎖を含むポリペプチド鎖）と会合した、2 つの組換えポリペプチドから構成される。2 つの組換えポリペプチドは、同一であってもよく、それによってホモ二量体を形成するか、又は異なるものであってもよく、それによってヘテロ二量

50

体を形成する。2つの組換えポリペプチドは、一般に、各組換えポリペプチドのキメラ定常ドメインを介して一緒に二量体化するように構成される。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のポリペプチド鎖は、二量体化組換えポリペプチドと会合している。したがって、抗体は、2つ、3つ、4つ以上のポリペプチド鎖を含み得る。

【0081】

2つの組換えポリペプチドが、同じ標的分子上の同じエピトープを標的とする抗原結合ドメインを含む場合、抗体は、単一特異性である。2つの組換えポリペプチドが、個々に又は一緒に、同じ標的分子上の2つ以上の異なるエピトープ、又は2つ以上の異なる標的分子を標的とする抗体結合ドメインを含む場合、抗体又は融合タンパク質は、多重特異性（例えば、二重特異性）である。ほとんどの抗体は、組換えポリペプチドのキメラ定常ドメインを介した二量体化によって多量体である。多重特異性抗体又は融合タンパク質は、第1の抗原結合ドメインに対して一価であってもよく、第2及びその後の抗原結合ドメインに対して一価であってもよく、又は第1の抗原結合ドメインに対して一価であってもよく、第2の抗原結合ドメインに対して多価であってもよく、任意の追加の（例えば、第3の）抗原結合ドメインに対して一価又は多価であってもよい。

【0082】

本開示の定常ドメインを含む抗体の特に好ましい形式は、N末端s c F v形式（例えば、WO 2021 / 091953 A1に記載され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる；N末端s c F v形式の例は本明細書の図5に示される）又はN末端s c F vがN末端F a bと置き換えられる抗体である。s c F v及びF a bドメインは、それぞれ、セクション6.2.4.2及び6.2.4.1に記載されている。いくつかの実施形態では、抗体は、三重特異性であり、「2+1 N-s c F v」又は「2+1 N-F a b」形式であり、伝統的な二重特異性抗体は、そのV Hドメインのうちの1つのN末端に、好ましくはリンカーを介して追加されたs c F v又はF a bドメインを有する。好適なリンカーは、セクション6.2.5に開示されている。

【0083】

WO 2021 / 091953 A1に開示されているように、「2+1 N-s c F v」形式は典型的には、(a) N末端からC末端の配向で、(i i i) F cドメインに作動可能に連結された、(i i) 第1のF a b（「F a b 1」）の第1の重鎖領域に作動可能に連結された、(i) 第1の抗原結合部位（「A B S 1」）を含むs c F v、を含む、第1のポリペプチド鎖と、(b) N末端からC末端の配向で、(i i) F cドメインに作動可能に連結された、(i) 第2のF a b（「F a b 2」）の第2の重鎖領域を含む、第2のポリペプチド鎖と、(c) 第1の重鎖領域と対合して、F a b 1を形成する、第1の軽鎖を含む、第3のポリペプチド鎖であって、F a b 1が、第2の抗原結合部位（「A B S 2」）を含む、第3のポリペプチド鎖と、(d) 第2の重鎖領域と対合して、F a b 2を形成する、第2の軽鎖を含む、第4のポリペプチド鎖であって、F a b 2が、第3の抗原結合部位（「A B S 3」）を含む、第4のポリペプチド鎖と、を含む。いくつかの実施形態では、A B S 1、A B S 2、及びA B S 3は各々、異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、A B S 1、A B S 2、及びA B S 3のうちの2つは、同じ標的分子の異なるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、s c F v、F a b 1、及びF a b 2は、それらのそれぞれの標的に同時に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、A B S 1、A B S 2、及びA B S 3のうちの少なくとも1つは、第1の組織発現プロファイルを有する標的分子に特異的に結合し、A B S 1、A B S 2、及びA B S 3のうちの少なくとも1つは、第1の組織発現プロファイルと、重複しているが、同一ではない、第2の組織発現プロファイルを有する標的分子に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、s c F vは、リンカーを介して第1の重鎖領域に連結される。いくつかの実施形態では、抗原結合分子は、三価である。いくつかの実施形態では、s c F vは、リンカーを介して第1の重鎖領域に連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、5、6、7又はそれ以上のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、最大30、最大40、又は最大50のアミノ酸長である。

【0084】

いくつかの実施形態では、ADCC又はADCPなどのFcγ受容体結合に依存するエフェクター機能は、例えば、野生型IgG1定常重鎖ドメインを含む抗体と比べて、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、又はバックグラウンドレベルまで低減される。そのような機能としては、細胞死滅又は食作用、B細胞活性化、及びサイトカインなどの炎症性メディエーターの放出が挙げられる。そのような効果のいくつかは、EC50の測定によって定量化され得る。ある特定の実施形態では、本開示のキメラ定常ドメインを含む抗体は、インビトロ又はエクスピボ細胞死滅アッセイで測定（任意選択的に、少なくとも10nMの抗体濃度で測定）した場合、野生型定常領域を有する好適なアイソタイプマッチ対照抗体と比較して、20%未満の細胞分解（例えば、%細胞傷害）、10%未満の細胞分解、5%未満の細胞分解、4%未満の細胞分解、3%未満の細胞分解、2%未満の細胞分解、又は0%の細胞分解若しくは検出不能な細胞分解の細胞傷害活性を示す。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチドを含む抗体は、野生型IgG1定常ドメインを含む抗体よりも、ヒトFc受容体（FcR）への少なくとも5倍低減された結合、少なくとも10倍低減された結合、少なくとも50倍低減された結合、少なくとも100倍低減された結合、少なくとも500倍低減された結合、少なくとも1,000倍低減された結合、少なくとも5,000倍低減された結合、又は少なくとも10,000倍低減された結合を示す。FcRは、例えば、FcRγ1、FcRγ2A、FcRγ2B、FcRγ3A、又はFcRγ3Bであり得る。FcR結合は、例えば、セクション8.1.4に記載されるように、ELISAによって決定することができる。

20

【0086】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ定常ドメインを組み込む抗体の標的への結合親和性は、適切な重鎖定常ドメイン（例えば、野生型IgG1）と比べて、キメラ定常ドメインによって実質的に影響されない。すなわち、結合親和性は、典型的には、アイソタイプマッチド野生型定常ドメインを有する好適な対照抗体の実験誤差内で、又は少なくとも2又は3の係数内で同じである。受容体ーリガンド結合を阻害する能力（例えば、EC50）、又は受容体をアゴナイズする能力など、FcγR結合に依存しない機能的特性についても同様である。

30

【0087】

アイソタイプマッチ対照と比較して、本開示の組換えポリペプチド（及びしたがって、本開示のキメラ定常ドメイン）を組み込んだ抗体の免疫原性は、チャレンジ時の樹状細胞の成熟又はT細胞増殖からインビトロで評価することができ（Gaitonde et al., 2011, Methods Mol Biol 716:267-80）、又は集団間で投与された抗体に対する反応性抗体の発生率を比較することによってインビボで評価することができる。いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチド（及びしたがって本開示のキメラ定常ドメイン）を組み込む抗体の免疫原性が低減される。他の実施形態では、免疫原性は、アイソタイプマッチ対照と著しく異なるものではないか、又はアイソタイプマッチ対照よりも2倍、3倍、若しくは5倍以上低くない。同様に、Cmax、C平均、曲線下面積、及び半減期などの薬物動態パラメータは、好ましくは、アイソタイプマッチ対照と著しく異なるものではないか、又はそれよりも少なくとも2、3、若しくは5倍以下低くない。そのようなPKパラメータの実質的な保持又は改善は、本開示の抗体が、強化された除去メカニズムを引き起こす実質的なコンフォメーション変化を受けていないことを示すことができる。

40

【0088】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、（例えば、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む）野生型IgG1定常ドメインを含む抗体と比較して、発現系における発現増加を示す。いくつかの実施形態では、野生型IgG1重鎖定常ドメインを含む抗体と比較した増加は、少なくとも5%の増加、少なくとも10%の増加、

50

少なくとも10%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも40%の増加、少なくとも50%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも90%の増加、又は少なくとも100%の増加である。ある特定の態様では、抗体の発現増加は、分泌タンパク質、例えば、抗体の産生の増加、及び／又はインビトロ発現系、例えば、抗体発現系から得られる総タンパク質収率の増加によって証明される。いくつかの実施形態では、発現系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）安定発現系である。CHO安定発現系における発現増加は、セクション8.1.6に記載されるように好適に評価することができ、タンパク質産生は、ドキシサイクリンを用いた培養物を複数日間誘導することによって刺激される。他の実施形態では、発現系は、HEK293ベースの発現系、例えば、Exp293F（商標）発現系である。

10

【0089】

6.2.3. 融合タンパク質

いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチドは、二量体化して、融合タンパク質を形成する。本開示の融合タンパク質は、典型的には、本開示の組換えポリペプチドを含むか、又はそれからなり、組換えポリペプチドは、各々、キメラ定常ドメインと、1つ以上の異種ポリペプチドと、任意選択的に、組換えポリペプチド内の1つ以上のドメインを分離する1つ以上のリンカーと、を含む。

【0090】

融合タンパク質は、本開示の1つ以上の組換えポリペプチドから構成され得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、2つの組換えポリペプチドから構成される。2つの組換えポリペプチドは、同一であってもよく、それによってホモ二量体を形成するか、又は異なるものであってもよく、それによってヘテロ二量体を形成する。2つの組換えポリペプチドは、一般に、各組換えポリペプチドのキメラ定常ドメインを介して一緒に二量体化するように構成される。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のポリペプチド鎖は、二量体化組換えポリペプチドと会合している。したがって、融合タンパク質は、2つ、3つ、4つ以上のポリペプチド鎖を含み得る。

20

【0091】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、キメラ定常ドメイン及び異種ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質中の異種ポリペプチドは、操作された形態の抗原結合ドメインを含む、免疫グロブリン定常ドメインに天然に連結されていないポリペプチドである。異種ポリペプチドは、目的の任意の他のタンパク質分子であり得る。例示的な異種ポリペプチドとしては、サイトカイン、リガンド、病原体に対するペプチド抗原、細胞外受容体ドメイン及びその機能的断片（例えば、可溶性受容体）、並びに非天然抗原結合ドメイン（例えば、scFv、ドメイン交換Fabなどの操作された抗原結合ドメイン）が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、抗体であり得る。組換えポリペプチド中のキメラ定常ドメインと細胞外ドメインを組み合わせたことができる例示的な受容体タンパク質は、当該技術分野で既知である（例えば、Klinkert, et al., 1997, J Neuroimmunol 72 (2): 163-8、Milligan et al., 2004, Curr Pharm Des 10 (17): 1989-2001、及びSchwache & Muller-Newen, 2012, Eur J Cell Biol 91 (6-7): 428-34を参照されたい）。

30

40

【0092】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ホモ二量体である。他の実施形態では、融合タンパク質は、ヘテロ二量体である。

ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、単一特異性である（例えば、単一の標的分子に特異的な標的結合ドメイン（複数可）を含むか、又は単一のリガンドドメインを含む）。他の実施形態では、融合タンパク質は多重特異性である（例えば、異なる標的分子に各々特異的な2つ以上の標的結合ドメインを含むか、又は2つ以上の異なるリガンドド

50

メインを含む)。ほとんどの融合タンパク質は、組換えポリペプチドのキメラ定常ドメインを介した二量体化によって多量体である。

【0093】

いくつかの実施形態では、ADCC又はADCPなどのFcγ受容体結合に依存するエフェクター機能は、例えば、野生型IgG1定常重鎖ドメインを含む融合タンパク質と比べて、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、又はバックグラウンドレベルまで低減される。そのような機能としては、細胞死滅又は食作用、B細胞活性化、及びサイトカインなどの炎症性メディエーターの放出が挙げられる。そのような効果のいくつかは、EC50の測定によって定量化され得る。ある特定の実施形態では、本開示のキメラ定常ドメインを含む融合タンパク質は、インビトロ又はエキスピボ細胞死滅アッセイで測定（任意選択的に、少なくとも10nMの融合タンパク質濃度で測定）した場合、野生型定常領域を有する好適なアイソタイプマッチ対照融合タンパク質と比較して、20%未満の細胞分解（例えば、%細胞傷害）、10%未満の細胞分解、5%未満の細胞分解、4%未満の細胞分解、3%未満の細胞分解、2%未満の細胞分解、又は0%の細胞分解若しくは検出不能な細胞分解の細胞傷害活性を示す。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチドを含む融合タンパク質は、野生型IgG1定常ドメインを含む融合タンパク質よりも、ヒトFc受容体（FcR）への少なくとも5倍低減された結合、少なくとも10倍低減された結合、少なくとも50倍低減された結合、少なくとも100倍低減された結合、少なくとも500倍低減された結合、少なくとも1,000倍低減された結合、少なくとも5,000倍低減された結合、又は少なくとも10,000倍低減された結合を示す。FcRは、例えば、FcRγ1、FcRγ2A、FcRγ2B、FcRγ3A、又はFcRγ3Bであり得る。FcR結合は、例えば、セクション8.1.4に記載されるように、ELISAによって決定することができる。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、本開示のキメラ定常ドメインを組み込む融合タンパク質の標的への結合親和性は、適切な重鎖定常ドメイン（例えば、野生型IgG1）と比べて、キメラ定常ドメインによって実質的に影響されない。すなわち、結合親和性は、典型的には、アイソタイプマッチド野生型定常ドメインを有する好適な対照融合タンパク質の実験誤差内で、又は少なくとも2又は3の係数内で同じである。受容体ーリガンド結合を阻害する能力（例えば、EC50）、又は受容体をアンタゴナイズする能力など、FcγR結合に依存しない機能的特性についても同様である。

30

【0096】

いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチド（及びしたがって本開示のキメラ定常ドメイン）を組み込む融合タンパク質の免疫原性が低減される。他の実施形態では、免疫原性は、アイソタイプマッチ対照と著しく異なるものではないか、又はアイソタイプマッチ対照よりも2倍、3倍、若しくは5倍以上低くない。同様に、C_{max}、C_{平均}、曲線下面積、及び半減期などの薬物動態パラメータは、好ましくは、アイソタイプマッチ対照と著しく異なるものではないか、又はそれよりも少なくとも2、3、若しくは5倍以下低くない。そのようなPKパラメータの実質的な保持又は改善は、本開示の融合タンパク質が、強化された除去メカニズムを引き起こす実質的なコンフォメーション変化を受けていないことを示すことができる。

40

【0097】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質は、（例えば、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む）野生型IgG1定常ドメインを含む融合タンパク質と比較して、発現系における発現増加を示し得る。いくつかの実施形態では、野生型IgG1重鎖定常ドメインを含む融合タンパク質と比較した増加は、少なくとも5%の増加、少なくとも10%の増加、少なくとも10%の増加、少なくとも20%の増加、少なくとも25%の増加、少なくとも30%の増加、少なくとも40%の増加、少なく

50

とも50%の増加、少なくとも60%の増加、少なくとも70%の増加、少なくとも80%の増加、少なくとも90%の増加、又は少なくとも100%の増加である。ある特定の態様では、融合タンパク質の発現増加は、分泌タンパク質、例えば、融合タンパク質の産生の増加、及び／又はインビトロ発現系、例えば、融合タンパク質発現系から得られる総タンパク質収率の増加によって証明される。いくつかの実施形態では、発現系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）安定発現系である。CHO安定発現系における発現増加は、セクション8.1.6に記載されるように好適に評価することができ、タンパク質産生は、ドキシサイクリンを用いた培養物を複数日間誘導することによって刺激される。他の実施形態では、発現系は、HEK293ベースの発現系、例えば、Exp293F発現系である。

10

【0098】

6.2.4. 標的結合ドメイン

本開示の組換えポリペプチドは、1つ以上の標的結合ドメイン（例えば、1つ、2つ、3つ、又はそれ以上の標的結合ドメイン）を含み得、各標的結合ドメインは、選択された標的分子に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、単一の標的結合ドメインを含む。標的結合ドメインは、キメラ定常ドメインに対するN末端であり得るか、又はキメラ定常ドメインに対するC末端であり得る。いくつかの実施形態では、単一の標的結合ドメインは、リンカーを介してキメラ定常ドメインに付着される。

【0099】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、2つ以上の標的結合ドメインを含む。2つ以上の標的結合ドメインは、同一であってもよく、異なってもよい。いくつかの実施形態では、2つ以上の標的結合ドメインは同一であり、標的分子上の同じエピトープに結合する。他の実施形態では、2つ以上の標的結合ドメインは、異なるものであり、標的分子上の異なるエピトープに結合するか、又は異なる標的分子に結合するかのいずれかである。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、3つ以上の標的結合ドメインを含む。そのような実施形態では、標的結合ドメインのうちの2つは、同一であり、第1の標的分子上の同じエピトープに結合することができ、残りの標的結合ドメイン（複数可）は、異なっており、第1の標的分子上の異なるエピトープに結合するか、又は異なる標的分子に結合する。組換えポリペプチドが2つ以上の標的結合ドメインを含む場合、2つ以上の標的結合ドメインの各々は、キメラ定常ドメインに対してN末端であり得るか、2つ以上の標的結合ドメインの各々は、キメラ定常ドメインに対してC末端であり得るか、又は1つ（以上）の標的結合ドメインは、キメラ定常ドメインに対してN末端であり得、他の標的結合ドメイン（複数可）は、キメラ定常ドメインに対してC末端である。2つ以上の標的結合ドメイン及びキメラ定常ドメインは、1つ以上のリンカーを介して分離され得る。

20

30

【0100】

標的結合ドメインは、目的の任意のエピトープ及び／又は標的分子に特異的であり得る。標的分子は、ヒト、哺乳動物、又は細菌であり得る。標的は、ウイルス及び細菌の両方の微生物病原体、並びに腫瘍からのタンパク質、糖タンパク質、及び炭水化物などの抗原であり得る。

40

【0101】

標的結合ドメインは、抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合断片であり得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、市販の抗体のドメインである。

ある特定の態様では、本開示の組換えポリペプチドに含まれる標的結合ドメインは、選択された標的分子又はそのエピトープに特異的に結合する任意のタイプの抗体断片であり得る。抗体断片としては、V_H（又はV_H）断片、V_L（又はV_L）断片、F_ab断片、F_(a b')₂断片、s c F_v断片、F_v断片、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディが挙げられるが、これらに限定されない。抗原結合ドメインが2つの別個のポリペプチド鎖（例えば、F_ab）を含む場合、第1のポリペプチド鎖（例えば、V_Hを含む）は、組換えポリペプチドに含まれ得、第2のポリペプチド鎖（例えば、V

50

Lを含む)は、組換えポリペプチドに含まれるVHと会合することができるポリペプチドに含まれ得る。本開示の定常ドメインを含む抗体分子の例示的な標的は、タンパク質、炭水化物、及び脂質などの細胞表面発現抗原である。いくつかの実施形態では、標的分子は、タンパク質分子である。例示的な標的分子には、ヒトクロトーベータ(「KLB」)、ヒト線維芽細胞成長因子受容体1cアイソフォーム(「FGFR1c」)、ヒト線維芽細胞成長因子受容体3(「FGFR3」)、ヒトCD63、及びヒトアミロイド前駆体様タンパク質2(APLP2)が含まれる。例示的なKLB標的化ドメインは、WO2021/091953A1の表2A及び2Bに記載されている。例示的なFGFR1c標的化ドメインは、WO2021/091953A1の表3A及び3Bに示されている。例示的なFGFR3結合ドメインは、WO2021/091953A1の表4に記載されている。例示的なAPLP2結合ドメインは、WO2021/091953A1の表5に記載されている。例示的なCD3結合ドメインは、WO2021/091953A1の表6に記載されている。結合ドメインは、WO2021/091953A1に記載される2+1 N末端scFv形式、又はWO2021/091953のN末端scFvがN末端Fabで置き換えられる2+1 N-Fab形式で構成することができる。WO2021/091953A1の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0102】

他の態様では、本開示の組換えポリペプチドに含まれる標的結合ドメインは、選択された標的分子に特異的に結合する任意のタイプの受容体又はその標的結合部分であり得る。

20

6.2.4.1. Fab

Fabドメインは、伝統的に、パパイン等の酵素を使用した免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生された。本開示の組換えポリペプチドを含む抗体では、Fabドメインは、典型的には、組換えポリペプチドに含まれるFabの少なくとも一部分で組換え的に発現される。

【0103】

Fabドメインは、任意の好適な種由来の定常ドメイン配列及び可変領域配列を含むことができ、したがって、マウス、キメラ、ヒト、又はヒト化されたものであってもよい。いくつかの実施形態では、可変領域配列及び／又は定常ドメイン領域配列は、既知の抗体に由来する。既知の抗体の例は、上記で提供される。

30

【0104】

Fabドメインは、典型的には、VLドメインに付着したCLドメインと対合するVHドメインに付着したCH1ドメインを含む。野生型免疫グロブリンにおいて、VHドメインは、VLドメインと対合してFv領域を構成し、CH1ドメインは、CLドメインと対合して結合モジュールを更に安定化する。2つの定常ドメイン間のジスルフィド結合は、Fabドメインを更に安定化することができる。

【0105】

本開示の組換えポリペプチドを含む抗体について、特に軽鎖が共通又はユニバーサル軽鎖ではない場合、同じ抗原結合ドメインに属するFabドメインの正確な会合を可能にし、異なる抗原結合ドメインに属するFabドメインの異常な対合を最小限にするために、Fabヘテロ二量体化戦略を使用することが有利である。例えば、以下の表1に示されるFabヘテロ二量体化戦略を使用することができる：

40

【0106】

50

【表 1】

表 1 Fab ヘテロ二量体化戦略					
戦略	VH	CH1	VL	CL	参考文献
CrossMabCH1-CL	WT	CL ドメイン	WT	CH1 ドメイン	Schaefer <i>et al.</i> , 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573.
直交性 Fab VHVRD1CH1C RD2- VLVRD1C λ CR D2	39K、62E	H172A、F174G	1R、38D、(36F)	L135Y、S176W	Lewis <i>et al.</i> , 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
直交性 Fab VHVRD2CH1wt -VLVRD2C λ wt	39Y	WT	38R	WT	Lewis <i>et al.</i> , 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
TCR C α C β	39K	TCR C α	38D	TCR C β	Wu <i>et al.</i> , 2015, MAbs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K、S114A	Golay <i>et al.</i> , 2016, J Immunol 196:3199-211.
MUT4	WT	L143Q、S188V	WT	V133T、S176V	Golay <i>et al.</i> , 2016, J Immunol 196:3199-211.
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor <i>et al.</i> , 2015, MAbs 7:377-89; Mazor <i>et al.</i> , 2015, MAbs 7:461-669.
ドメイン交換	WT	CH3 + ノブ 又はホール変異	WT	CH3 + ホール 又はノブ変異	Wozniak-Knopp <i>et al.</i> , 2018, PLoSONE13(4):e0195442

10

20

【0107】

したがって、ある特定の実施形態では、Fabの2つのポリペプチド間の正しい会合は、例えば、WO2009/080251に記載されるように、FabのVLドメイン及びVHドメインを互いに交換するか、又はCH1ドメイン及びCLドメインを互いに交換することによって促進される。

30

【0108】

正しいFab対合はまた、FabのCH1ドメインに1つ以上のアミノ酸改変及びCLドメインに1つ以上のアミノ酸改変を導入することによって、並びに／又はVHドメインに1つ以上のアミノ酸改変及びVLドメインに1つ以上のアミノ酸改変を導入することによって促進することができる。改変されるアミノ酸は、典型的には、Fab構成要素が、他のFabの構成要素よりもむしろ互いと優先的に対合するようにVH:VL及びCH1:CL界面の一部である。

【0109】

一実施形態では、1つ以上のアミノ酸改変は、残基のKabat番号付けによって示されるように、可変(VH、VL)及び定常(CH1、CL)ドメインの保存されたフレームワーク残基に限定される。Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13:1619-1633は、Kabat、Chothia、及びIMGTの番号付けスキームに基づくフレームワーク残基の定義を提供する。

40

【0110】

一実施形態では、VHドメイン及びCH1ドメイン並びに／又はVLドメイン及びCLドメインにおいて導入される改変は、互いに相補的である。重鎖及び軽鎖界面における相補性は、立体接触及び疎水性接触、静電／電荷相互作用、又は様々な相互作用の組み合わせに基づいて達成され得る。タンパク質表面間の相補性は、ロック及びキー適合(lock and key fit)、ノブ・イントゥ・ホール(knob into hole)、突起及び空洞(protrusion and cavity)、ドナー及びアク

50

セプターなどの観点から、文献において広く記載されており、これらは全て、2つの相互作用する表面間の構造的及び化学的一致の性質を示唆している。

【0111】

一実施形態では、1つ以上の導入された改変は、F a b 構成要素の界面にわたって新しい水素結合を導入する。一実施形態では、1つ以上の導入された改変は、F a b 構成要素の界面にわたって新しい塩橋を導入する。例示的な置換は、W O 2 0 1 4 / 1 5 0 9 7 3 及び W O 2 0 1 4 / 0 8 2 1 7 9 に記載されており、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0112】

いくつかの実施形態では、F a b ドメインは、C H 1 ドメインに 1 9 2 E 置換、及び C L ドメインに 1 1 4 A 及び 1 3 7 K 置換を含み、これにより、C H 1 ドメインと C L ドメインとの間に塩橋が導入される（例えば、G o l a y e t a l . , 2 0 1 6 , J I m m u n o l 1 9 6 : 3 1 9 9 - 2 1 1 を参照されたい）。

【0113】

いくつかの実施形態では、F a b ドメインは、C H 1 ドメイン内の 1 4 3 Q 及び 1 8 8 V 置換、並びに C L ドメイン内の 1 1 3 T 及び 1 7 6 V 置換を含み、これは、C H 1 ドメインと C L ドメインとの間の疎水性及び極性接触領域を交換するのに役立つ（例えば、G o l a y e t a l . , 2 0 1 6 , J I m m u n o l 1 9 6 : 3 1 9 9 - 2 1 1 を参照されたい）。

【0114】

いくつかの実施形態では、F a b ドメインは、F a b ドメインの正しいアセンブリを促進する直交性 F a b 界面を導入するための、V H 、C H 1 、V L 、C L ドメインの一部又は全部における改変を含むことができる（L e w i s e t a l . , 2 0 1 4 N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 3 2 : 1 9 1 - 1 9 8 ）。実施形態では、3 9 K 、6 2 E の改変が V H ドメインに導入され、H 1 7 2 A 、F 1 7 4 G の改変が C H 1 ドメインに導入され、1 R 、3 8 D 、（3 6 F ）の改変が V L ドメインに導入され、L 1 3 5 Y 、S 1 7 6 W の改変が C L ドメインに導入される。別の実施形態では、3 9 Y 改変が V H ドメインに導入され、3 8 R 改変が V L ドメインに導入される。

【0115】

F a b ドメインはまた、天然の C H 1 : C L ジスルフィド結合を、操作されたジスルフィド結合で置き換えるように改変することができ、それによって、F a b 構成要素の対合の効率を増加させる。例えば、操作されたジスルフィド結合は、C H 1 ドメインに 1 2 6 C を導入し、C L ドメインに 1 2 1 C を導入することによって導入することができる（例えば、M a z o r e t a l . , 2 0 1 5 , M A b s 7 : 3 7 7 - 8 9 を参照されたい）。

【0116】

F a b ドメインは、C H 1 ドメイン及び C L ドメインを、正しいアセンブリを促進する代替ドメインで置き換えることによっても改変され得る。例えば、W u e t a l . , 2 0 1 5 , M A b s 7 : 3 6 4 - 7 6 は、C H 1 ドメインを T 細胞受容体の定常ドメインで置換し、C L ドメインを T 細胞受容体の b b ドメインで置換し、これらのドメイン置換を、V L ドメインに 3 8 D 改変を導入し、V H ドメインに 3 9 K 改変を導入することによる V L ドメインと V H ドメインとの間の追加の電荷-電荷相互作用で対合することを記載する。

【0117】

正しい V H - V L 対合を促進するための F a b ヘテロ二量体化戦略の使用の代わりに、又はそれに加えて、共通の軽鎖（ユニバーサル軽鎖とも称される）の V L を、本開示の組換えポリペプチド又は抗体の各 F a b V L 領域に使用することができる。様々な実施形態では、本明細書に記載の共通軽鎖を用いることは、元の同族 V L を用いることと比較して、組換えポリペプチド又は抗体の不適切な種の数減少させる。様々な実施形態では、組換えポリペプチド又は抗体の V L ドメインは、共通の軽鎖を含む単一特異性抗体から同

10

20

30

40

50

定される。様々な実施形態では、組換えポリペプチド又は抗体のVH領域は、限定されたヒト軽鎖レパートリー、又は単一のヒト軽鎖を発現するように事前に操作されているマウスB細胞内でインビボで再編成されるヒト重鎖可変遺伝子セグメントを含み、ヒト重鎖と同族であり、目的の抗原への曝露に応答して、2つの可能なヒトVLのうちの1つ又は1つと同族である複数のヒトVHを含む抗体レパートリーを生成し、この抗体レパートリーは、目的の抗原に特異的である。共通の軽鎖は、再構成されたヒトVκ1-39Jκ5配列又は再構成されたヒトVκ3-20Jκ1配列に由来するものであり、体細胞変異型（例えば、親和性成熟型）を含む。例えば、米国特許第10,412,940号を参照されたい。

【0118】

10

6.2.4.2. scFv

一本鎖Fv又は「scFv」抗体断片は、単一のポリペプチド鎖内の抗体のVHドメイン及びVLドメインを含み、一本鎖ポリペプチド（例えば、本開示の組換えポリペプチド）として発現することができ、それらが由来する無傷の抗体の特異性を保持する。一般に、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間に、scFvが標的結合のために所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを更に含む。scFvのVH鎖及びVL鎖を接続するのに好適なリンカーの例は、セクション6.2.5において特定されるリンカーである。

【0119】

本明細書で使用される場合、指定されない限り、scFvは、例えば、ポリペプチドのN末端及びC末端に関して、いずれかの順序でVL可変領域及びVH可変領域を有してもよく、scFvは、VL-リンカー-VHを含んでもよく、又はVH-リンカー-VLを含んでもよい。

20

【0120】

scFvは、マウス、ヒト、又はヒト化のVH配列及びVL配列などの任意の好適な種由来のVH配列及びVL配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、scFvは、既知の抗体からのVH配列及びVL配列を含むことができる。既知の抗体の例は、上記で提供される。

【0121】

scFvコード核酸を作製するために、VH及びVLコードDNA断片は、リンカーをコードする、例えば、セクション6.2.5に記載されるリンカー（典型的にはアミノ酸グリシン及びセリン、例えば、アミノ酸配列(Gly4~Ser)3（配列番号13）を含有する配列のリピート）のいずれかをコードする別の断片に作動可能に連結され、VH及びVL配列は、連続した単鎖タンパク質として発現され得、VL及びVH領域は、可撓性リンカーによって接合される（例えば、Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554を参照されたい）。

30

【0122】

6.2.5. リンカー

40

ある特定の態様では、本開示は、組換えポリペプチドの2つ以上の構成要素がペプチドリンカー（利便性のために本明細書では「リンカー」と称されることがある）によって互いに接続される組換えポリペプチドを提供する。限定ではなく例として、リンカーを使用して、（a）標的結合ドメイン及びキメラ定常ドメイン、（b）第1の標的結合ドメイン及び第2の標的結合ドメイン、又は（c）標的結合ドメイン内の異なるドメイン（例えば、scFv内のVHドメイン及びVLドメイン）を接続することができる。

【0123】

ペプチドリンカーは、2アミノ酸～60アミノ酸以上の範囲とすることができ、ある特定の態様では、ペプチドリンカーは、3アミノ酸～50アミノ酸、4～30アミノ酸、5～25アミノ酸、10～25アミノ酸、10アミノ酸～60アミノ酸、12アミノ酸～2

50

0 アミノ酸、20 アミノ酸～50 アミノ酸、又は25 アミノ酸～35 アミノ酸長の範囲とすることができる。

【0124】

特定の態様では、ペプチドリンカーは、少なくとも5 アミノ酸、少なくとも6 アミノ酸、又は少なくとも7 アミノ酸長であり、任意選択的に、最大30 アミノ酸、最大40 アミノ酸、最大50 アミノ酸、又は最大60 アミノ酸長である。

【0125】

前述のいくつかの実施形態では、リンカーは、5 アミノ酸～50 アミノ酸長の範囲、例えば、5～50、5～45、5～40、5～35、5～30、5～25、又は5～20 アミノ酸長の範囲である。前述の他の実施形態では、リンカーは、6 アミノ酸～50 アミノ酸長の範囲、例えば、6～50、6～45、6～40、6～35、6～30、6～25、又は6～20 アミノ酸長の範囲である。前述の更に他の実施形態では、リンカーは、7 アミノ酸～50 アミノ酸長の範囲、例えば、7～50、7～45、7～40、7～35、7～30、7～25、又は7～20 アミノ酸長の範囲である。

10

【0126】

荷電（例えば、荷電親水性リンカー）及び／又は柔軟なリンカーが特に好ましい。

本開示の組換えポリペプチドに使用され得る柔軟なリンカーの例としては、Chen et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-1369 及び Klein et al., 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27 (10): 325-330 に開示されるものが挙げられる。特に有用な可撓性リンカーは、グリシン及びセリンの繰り返し、例えば、 G_nS （配列番号33）若しくは SG_n （配列番号34）のモノマー若しくはマルチマーであるか、又はこれらを含み、 n は、1～10の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。一実施形態では、リンカーは、 G_4S （配列番号11）、例えば、 $(GGGG)_n$ （配列番号35）の繰り返しのモノマー若しくはマルチマーであるか、又はこれを含む。

20

【0127】

ポリグリシンリンカーは、本開示の組換えポリペプチドにおいて好適に使用することができる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、2つの連続したグリシン（2 Gly）、3つの連続したグリシン（3 Gly）、4つの連続したグリシン（4 Gly）（配列番号36）、5つの連続したグリシン（5 Gly）（配列番号37）、6つの連続したグリシン（6 Gly）（配列番号38）、7つの連続したグリシン（7 Gly）（配列番号39）、8つの連続したグリシン（8 Gly）（配列番号40）又は9つの連続したグリシン（9 Gly）（配列番号41）を含む。

30

【0128】

6.3. 核酸及び宿主細胞

別の態様では、本開示は、本開示のキメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗体、及び融合タンパク質をコードする核酸を提供する。いくつかの実施形態では、キメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗体、及び融合タンパク質は、単一の核酸によってコードされる。抗体又は融合タンパク質が2つ以上のポリペプチド鎖から構成される他の実施形態では、抗体又は融合タンパク質は、複数の（例えば、2つ、3つ、4つ以上の）核酸によってコードすることができる。

40

【0129】

単一の核酸は、単一のポリペプチド鎖を含む抗体若しくは融合タンパク質、2つ以上のポリペプチド鎖を含む抗体若しくは融合タンパク質、又は3つ以上のポリペプチド鎖を含む抗体若しくは融合タンパク質の一部分をコードすることができる（例えば、単一の核酸は、3つ、4つそれ以上のポリペプチド鎖を含む抗体若しくは融合タンパク質の2つのポリペプチド鎖、又は4つ以上のポリペプチド鎖を含む抗体若しくは融合タンパク質の3つのポリペプチド鎖をコードすることができる）。発現を別々に制御するために、2つ以上のポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームは、別々の転写調節エレ

50

ント（例えば、プロモーター及び／又はエンハンサー）の制御下におくことができる。2つ以上のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームは、同じ転写調節エレメントによって制御され、内部リボソーム進入部位（IRES）配列によって分離され、別々のポリペプチドへの翻訳を可能にすることもできる。

【0130】

いくつかの実施形態では、2つ以上のポリペプチド鎖を含むキメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗原、又は融合タンパク質は、2つ以上の核酸によってコードされる。キメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗原、又は融合タンパク質をコードする核酸の数は、キメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗原、又は融合タンパク質中のポリペプチド鎖の数以下（例えば、2つ以上のポリペプチド鎖が単一の核酸によってコードされる場合）であり得る。

10

【0131】

本開示の核酸は、DNA又はRNA（例えば、mRNA）であり得る。

別の態様では、本開示は、本開示の核酸を含有する宿主細胞及びベクターを提供する。核酸は、本明細書において以下により詳細に記載されるように、単一のベクター中に存在してもよく、又は同じ宿主細胞若しくは別個の宿主細胞中に存在する別個のベクター中に存在してもよい。

【0132】

6.3.1. ベクター

本開示は、本明細書に記載されるキメラ定常ドメイン、組換えポリペプチド、抗原、又は融合タンパク質、例えば、抗体のポリペプチド鎖のうちの1つ又は2つをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。ベクターは、ウイルス、プラスミド、コスミド、ラムダファージ、又は酵母人工染色体（YAC）を含むが、これらに限定されない。

20

【0133】

多数のベクター系を用いることができる。例えば、ベクターの1つのクラスは、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス、MMTV若しくはMOMLV）、又はSV40ウイルス等の動物ウイルスに由来するDNAエレメントを利用する。別のクラスのベクターは、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、及びフラビウイルスなどのRNAウイルスに由来するRNAエレメントを利用する。

30

【0134】

追加的に、DNAを染色体に安定的に組み込んだ細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択することができる。マーカーは、例えば、栄養要求性宿主に対するプロトトロピー（prototropy）、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）、又は銅などの重金属に対する耐性などを提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結されるか、又は共形質転換によって同じ細胞内に導入されるかのいずれかであり得る。mRNAの最適な合成のために、追加のエレメントも必要とされ得る。これらのエレメントは、スプライシングナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終結シグナルを含み得る。

【0135】

発現ベクター又は構築物を含有するDNA配列が発現のために調製されると、発現ベクターを適切な宿主細胞にトランスフェクトするか、又は導入することができる。これを達成するために、例えば、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、レトロウイルス形質導入、ウイルストランスフェクション、遺伝子銃、脂質ベースのトランスフェクション、又は他の従来技法などの様々な技法が用いられ得る。得られたトランスフェクトされた細胞を培養し、発現されたポリペプチドを回収及び／又は精製するための方法及び条件は、当業者に既知であり、本明細書に基づいて、用いられる特異的発現ベクター及び哺乳動物宿主細胞に応じて変化又は最適化され得る。

40

【0136】

6.3.2. 細胞

50

本開示はまた、本開示の核酸を含む宿主細胞を提供する。

一実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載の1つ以上の核酸を含むように遺伝子操作される。

【0137】

一実施形態では、宿主細胞は、発現カセットを使用することによって遺伝子操作される。「発現カセット」という語句は、そのような配列と互換性のある宿主における遺伝子の発現に影響を与えることができるヌクレオチド配列を指す。そのようなカセットには、プロモーター、イントロンを有する又は有しないオープンリーディングフレーム、及び終結シグナルが含まれ得る。発現にもたらすのに必要な、又は役立つ追加の因子、例えば、誘導性プロモーターも使用されてもよい。

【0138】

本開示はまた、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞を提供する。

細胞は、限定されないが、真核細胞、細菌細胞、昆虫細胞、又はヒト細胞であり得る。好適な真核細胞としては、Vero細胞、HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞、及びMDCKII細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好適な昆虫細胞としては、限定されないが、Sf9細胞が挙げられる。

【0139】

6.4. 薬学的組成物

本開示の抗体及び融合タンパク質は、抗体及び融合タンパク質並びに1つ以上の担体、賦形剤、及び／又は希釈剤を含む組成物の形態にあり得る。組成物は、獣医学的使用又はヒトにおける薬学的使用などの特定の使用のために製剤化され得る。組成物の形態（例えば、乾燥粉末、液体製剤など）と、使用される賦形剤、希釈剤及び／又は担体は、抗体又は融合タンパク質の意図される用途、及び治療的用途場合、投与様式に依存するであろう。

【0140】

治療用途の場合、組成物は、薬学的に許容される担体を含む滅菌の薬学的組成物の一部として供給され得る。この組成物は、（患者に投与する所望の方法に応じて）任意の好適な形態にあり得る。薬学的組成物は、経口、経皮、皮下、鼻腔内、静脈内、筋肉内、腫瘍内、髄腔内、局部、又は局所などの様々な経路によって患者に投与され得る。いずれかの所与の場合における投与のための最も好適な経路は、特定の抗体、対象、並びに疾患の性質及び重症度、並びに対象の身体状態に依存するであろう。典型的には、薬学的組成物は、静脈内又は皮下に投与されるであろう。

【0141】

薬学的組成物は、用量当たりの本開示の所定量の及び抗体又は融合タンパク質を含有する単位剤形で便利に提示することができる。単位用量に含まれる抗体又は融合タンパク質の量は、当該技術分野において周知である他の要因と同様に、治療されている疾患に依存するであろう。そのような単位投薬量は、単回投与に好適な量の抗体又は融合タンパク質を含有する凍結乾燥された乾燥粉末の形態、又は液体の形態にあり得る。乾燥粉末単位剤形は、シリンジ、好適な量の希釈剤、及び／又は投与に有用な他の構成要素とともにキットに包装することができる。液体形態の単位投薬量は、単回投与に好適な量の抗体又は融合タンパク質を予め充填したシリンジの形態で都合よく供給してもよい。

【0142】

薬学的組成物はまた、複数回の投与に好適な量の抗体又は融合タンパク質を含有することから大量に供給され得る。

薬学的組成物は、所望の純度を有する抗体又は融合タンパク質を、当該技術分野で典型的に用いられる任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤（これらの全ては本明細書では「担体」と称される）、すなわち、緩衝剤、安定化剤、保存剤、等張化剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤、及び他の様々な添加剤と混合することによって、凍結乾燥された製剤又は水溶液として保存するために調製され得る。Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 23rd

10

20

30

40

50

edition (Adejare, ed. 2020) を参照されたい。そのような添加剤は、用いられる投薬量及び濃度においてレシピエントに対して無毒であるべきである。

【0143】

緩衝剤は、生理学的条件に近い範囲でpHを維持するのに役立つ。それらは、多種多様な濃度で存在し得るが、典型的には、約2mM～約50mMの範囲の濃度で存在するであろう。本開示で使用するための好適な緩衝剤としては、有機酸及び無機酸の両方並びにその塩、例えば、クエン酸緩衝液（例えば、クエン酸－ナトリウム－クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸－ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝液（例えば、コハク酸－コハク酸－ナトリウム混合物、コハク酸－水酸化ナトリウム混合物、コハク酸－コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸－酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸－酒石酸カリウム混合物、酒石酸－水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝液（例えば、フマル酸－フマル酸－ナトリウム混合物、フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸－ナトリウム－フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝液（例えば、グルコン酸－グリコン酸ナトリウム（sodium glyconate）混合物、グルコン酸－水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸－グリコン酸カリウム（potassium glyconate）混合物など）、シュウ酸緩衝液（例えば、シュウ酸－シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸－水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸－シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝液（例えば、乳酸－乳酸ナトリウム混合物、乳酸－水酸化ナトリウム混合物、乳酸－乳酸カリウム混合物など）、及び酢酸緩衝液（例えば、酢酸－酢酸ナトリウム混合物、酢酸－水酸化ナトリウム混合物など）が挙げられる。追加的に、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、及びトリメチルアミン塩（例えば、Tris）が使用され得る。

10

20

【0144】

保存剤は、微生物の増殖を遅延させるために添加されてもよく、約0.2%～1%（w/v）の範囲の量で添加され得る。本開示で使用するのに好適な保存剤としては、フェノール、ベンジルアルコール、メタ－クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハライド（benzalconium halide）（例えば、塩化物、臭化物、及びヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウム、及びアルキルパラベン（例えば、メチル又はプロピルパラベン）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、及び3－ペンタノールが挙げられる。時に「安定剤」として知られている等張化剤は、本開示の液体組成物の等張性を確保するために添加され得、多価糖アルコール、例えば、三価以上の糖アルコール（例えば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなど）を含む。安定剤とは、機能において、増量剤から治療薬を可溶化するか、又は変性若しくは容器壁への付着を防ぐのに役立つ添加剤までの範囲であり得る幅広いカテゴリーの賦形剤を指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール（上で列挙した）、アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L－ロイシン、2－フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど）、有機糖又は糖アルコール（例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール（myoinisitol）、ガラクトール、グリセロールなど、イノシトールなどのシクリトールを含む）、ポリエチレングリコール、アミノ酸ポリマー、含硫還元剤（例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、α－モノチオグリセロール、及びチオ硫酸ナトリウムなど）、低分子量ポリペプチド（例えば、10残基以下のペプチド）、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなど）、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドンなど）、単糖類（例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコースなど）、二糖類（例えば、ラクトース、マルトース、スクロース及びトレハロースなど）、三糖類（例えば、ラフィノースなど）、及び多糖類（例えば、デキストランなど）であり得る。安定剤は、抗体又は融合タンパク質の重量当たり0.5～10重量%の範囲の量で存在

30

40

50

してもよい。

【0145】

非イオン性界面活性剤又は洗剤（「湿潤剤」としても知られる）を添加して、糖タンパク質の可溶化を助けるとともに、攪拌誘導性凝集から糖タンパク質を保護することができ、これにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、製剤を負荷のかかる剪断面に曝露することも可能になる。好適な非イオン性界面活性剤としては、ポリソルベート（20、80等）、ポリオキサマー（polyoxamer）（184、188等）、及びプルロニック（登録商標）ポリオールが挙げられる。非イオン性界面活性剤は、約0.05 mg/mL～約1.0 mg/mL（例えば、約0.07 mg/mL～約0.2 mg/mL）の範囲で存在し得る。

10

【0146】

追加の様々な賦形剤としては、増量剤（例えば、デンプン）、キレート剤（例えば、EDTA）、抗酸化物質（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE）、及び共溶媒が挙げられる。

【0147】

6.4.1. 送達のための薬学的組成物

本開示の抗体又は融合タンパク質は、遺伝子治療に有用な任意の方法によって、例えば、mRNAとして、又は好適なプロモーターの制御下で、抗体又は融合タンパク質をコードするウイルスベクターを介して送達され得る。

【0148】

例示的な遺伝子治療ベクターとしては、アデノウイルス又はAAVベースの治療薬が挙げられる。本明細書における方法、使用又は組成物において使用するためのアデノウイルスベース又はAAVベースの治療薬の非限定的な例としては、例えば、がんの治療における使用のための、野生型ヒト腫瘍抑制タンパク質p53をコードする組換えアデノウイルスベクターであるrAd-p53（Gendicine（登録商標）、Genkaxin（登録商標）としても知られている、Qi et al., 2006, Modern Oncology, 14:1295-1297）；宿主p53を不活性化するためのE1B遺伝子を欠くアデノウイルスであるAd5-d11520（H101又はONYX-015とも呼ばれる；例えば、Russell et al., 2012, Nature Biotechnology 30:658-670を参照されたい）；例えば、がんの治療における使用のための、サイトカインGM-CSFを含有するアデノウイルスであるAD5-D24-GM-CSF（Ceruleo et al., 2010, Cancer Res. 70:4297）；例えば、がんの治療における使用のための、HSVチミジンキナーゼ遺伝子を有する複製欠損性アデノウイルスであるrAd-HSVtk（Cerepro（登録商標）、Ark Therapeuticsとして開発、例えば、米国特許第6,579,855号を参照；AdvantageneによりProstateAtak（商標）として開発；国際PCT出願第WO2005/049094号）、例えばがんの治療のために、化学放射線誘導性EGR-1プロモーターの制御下でヒト腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）を発現する複製欠損性アデノウイルスベクターであるrAd-TNF α （TNFerade（商標）、GenVec、Rasmussen et al., 2002, Cancer Gene Ther. 9:951-7、例えばがんの治療のために、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーターの指示下でヒトインターフェロンベータ遺伝子を発現する、E1及びE3遺伝子が欠失されているアデノウイルス血清型5ベクターであるAd-IFN β （BG 00001及びH5.110CMVhIFN- β , Biogen; Sterman et al., 2010, Mol. Ther. 18:852-860）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0149】

核酸分子（例えば、mRNA）又はウイルスは、薬学的組成物中の唯一の薬学的活性成分として製剤化され得るか、又は治療される特定の疾患のための他の活性剤と組み合わせられ得る。任意選択的に、他の薬剤、医薬品、担体、アジュバント、希釈剤を、本明細書で

50

提供される組成物中に含めることができる。例えば、湿潤剤、乳化剤及びラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、並びに着色剤、放出剤（release agent）、コーティング剤、甘味料、香味料及び芳香剤、保存剤、抗酸化剤、キレート剤及び不活性ガスのうちのいずれか1つ以上もまた、組成物中に存在し得る。組成物に含まれ得る例示的な他の薬剤及び賦形剤としては、例えば、水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど、及び金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸及びリン酸等が挙げられる。

10

【0150】

7. 具体的な実施形態

様々な具体的な実施形態を例解し、記載してきたが、本開示（複数可）の趣旨及び範囲から逸脱することなく様々な変更を行うことができることが理解されるであろう。本開示は、以下に記載される番号付き群A、群B、群C及び群Dによって例示される。特に明記しない限り、特定の群の番号付き実施形態のうちのいずれかの特徴は、他の群の番号付き実施形態に準用される。

【0151】

群A：番号付き実施形態

1. キメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチドであって、N末端からC末端へ、

(a) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(i) 216～225位（EU番号付け）のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHT（配列番号24）、

(ii) 226～229位（EU番号付け）のヒトIgG1コアヒンジアミノ酸配列CPPC（配列番号25）、

(iii) 230～238位（EU番号付け）のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVAGP（配列番号42）、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(b) ヒトIgG1の239～340位（EU番号付け）のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH2ドメインと、

(c) ヒトIgG1の341～447位（EU番号付け）のヒトIgG1 CH3ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換を含む、CH3ドメインであって、任意選択的に、置換が、ノブ置換（例えば、T366W）、ホール置換（例えば、T366S、L368A、Y407V）、スター変異（例えば、H435R、Y436F）、ジスルフィド架橋を導入する変異（例えば、S354C若しくはE357C）、又は前述のうちの2つ以上の組み合わせから選択される、CH3ドメインと、を含む、組換えポリペプチド。

20

30

40

【0152】

2. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1に記載の組換えポリペプチド。

【0153】

3. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも96%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1又は実施形態2に記載の組換えポリペプチド。

50

【0154】

4. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1～3のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0155】

5. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1～4のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

【0156】

6. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1～5のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0157】

7. キメラ定常ドメインが、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態1～6のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

20

【0158】

8. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインのFc受容体への結合を低減し、かつ／又はエフェクター機能を低減する、実施形態1～7のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0159】

9. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、G237位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0160】

10. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、D265位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態1～9のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

【0161】

11. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換D265A（EU番号付け）を含む、実施形態10に記載の組換えポリペプチド。

12. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、N297位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0162】

13. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換N297A（EU番号付け）を含む、実施形態12に記載の組換えポリペプチド。

40

14. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換N297D（EU番号付け）を含む、実施形態12に記載の組換えポリペプチド。

【0163】

15. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、P329位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態1～14のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0164】

16. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P329A（EU番号付け）を含む、実施形態15に記載の組換えポリペプチド。

50

17. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P329G (EU番号付け)を含む、実施形態15に記載の組換えポリペプチド。

【0165】

18. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、A330位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含む、実施形態1~17のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0166】

19. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、P331位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含む、実施形態1~18のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0167】

20. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P331S (EU番号付け)を含む、実施形態19に記載の組換えポリペプチド。

21. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、D265位及びN297位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態1~20のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0168】

22. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、D265A及びN297A (EU番号付け)を含むか、又はそれらからなる、実施形態21に記載の組換えポリペプチド。

【0169】

23. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインと別の定常ドメインとのヘテロ二量体会合を提供する、実施形態1~22のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0170】

24. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、S354位又はE357 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含む、実施形態1~23のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0171】

25. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換S354C又はE357C (EU番号付け)を含む、実施形態24に記載の組換えポリペプチド。

26. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、T366位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含む、実施形態1~25のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0172】

27. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換T366W (EU番号付け)を含む、実施形態26に記載の組換えポリペプチド。

28. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、S354位及びT366位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態1~27のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0173】

29. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、S354C及びT366W (EU番号付け)を含むか、又はそれらからなる、実施形態28に記載の組換えポリペプチド。

【0174】

30. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、Y349位 (EU番号付け)のアミノ酸置換を含む、実施形態1~23のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0175】

31. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換Y349

10

20

30

40

50

C (EU 番号付け) を含む、実施形態 30 に記載の組換えポリペプチド。

32. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、Y407 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含む、実施形態 1~23、30、又は 31 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0176】

33. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換 Y407V (EU 番号付け) を含む、実施形態 32 に記載の組換えポリペプチド。

34. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、T366 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含む、実施形態 32 又は実施形態 33 に記載の組換えポリペプチド。

【0177】

35. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換 T366S (EU 番号付け) を含む、実施形態 34 に記載の組換えポリペプチド。

36. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、L368 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含む、実施形態 32~35 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0178】

37. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換 L368A (EU 番号付け) を含む、実施形態 36 に記載の組換えポリペプチド。

38. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、Y349、T366、L368、及び Y407 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態 1~23、又は 30~37 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0179】

39. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、Y349C、T366S、L368A、及び Y407V (EU 番号付け) を含むか、又はそれらからなる、実施形態 38 に記載の組換えポリペプチド。

【0180】

40. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、組換えポリペプチドの選択的精製を提供する、実施形態 1~39 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

41. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、H435 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含む、実施形態 40 に記載の組換えポリペプチド。

【0181】

42. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換 H435R (EU 番号付け) を含む、実施形態 41 に記載の組換えポリペプチド。

43. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、Y436 位 (EU 番号付け) のアミノ酸置換を含む、実施形態 40 に記載の組換えポリペプチド。

【0182】

44. 任意選択的な 1 つ以上の CH3 ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換 Y436F (EU 番号付け) を含む、実施形態 41 に記載の組換えポリペプチド。

45. 組換えポリペプチドが、抗原結合タンパク質である、実施形態 1~44 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0183】

46. IgG1 CH1 ドメイン又はその断片若しくはバリエントを更に含む、実施形態 1~45 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

47. IgG1 CH1 の断片が、DKKV (配列番号 31) を含むか、又はそれからなる、実施形態 46 に記載の組換えポリペプチド。

【0184】

48. IgG1 CH1 の断片が、DKRV (配列番号 32) を含むか、又はそれからなる、実施形態 46 の組換えポリペプチド。

49. 少なくとも 1 つの標的結合ドメインを含む、実施形態 1~48 のいずれか 1 つに

10

20

30

40

50

記載の組換えポリペプチド。

【0185】

50. 少なくとも2つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～49のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

51. 少なくとも3つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～50のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0186】

52. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、Fabを含む、実施形態49～51のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

53. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、scFvを含む、実施形態49～52のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。 10

【0187】

54. 第1の標的結合ドメインとしてのFab及び標的結合ドメインとしてのscFvを含む、実施形態49～53のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

55. キメラ定常ドメインのN末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態49～54のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0188】

56. キメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態49～55のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

57. キメラ定常ドメインのN末端にある少なくとも第1の標的結合ドメインと、キメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも第2の標的結合ドメインと、を含む、実施形態49～56のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。 20

【0189】

58. N末端からC末端へ、scFv、Fab、及びキメラ定常ドメインを含む、実施形態49～57のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

59. 組換えポリペプチドが、抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）であるか、又は抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部を形成する、実施形態1～58のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0190】

60. 組換えポリペプチドが、一価抗体であるか、又は一価抗体の一部を形成する、実施形態1～59のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。 30

61. 組換えポリペプチドが、二価抗体であるか、又は二価抗体の一部を形成する、実施形態1～59のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0191】

62. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態61に記載の組換えポリペプチド。

63. 組換えポリペプチドが、三価抗体であるか、又は三価抗体の一部を形成する、実施形態1～59のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0192】

64. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態63に記載の組換えポリペプチド。 40

65. 組換えポリペプチドが、三重特異性抗体であるか、又は三重特異性抗体の一部を形成する、実施形態63に記載の組換えポリペプチド。

【0193】

66. 組換えポリペプチドが、四価抗体であるか、又は四価抗体の一部を形成する、実施形態1～59のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

67. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態66に記載の組換えポリペプチド。

【0194】

68. 組換えポリペプチドが、三重特異性抗体であるか、又は三重特異性抗体の一部を 50

形成する、実施形態 66 に記載の組換えポリペプチド。

69. 組換えポリペプチドが、融合タンパク質であるか、又は融合タンパク質の一部を形成する、実施形態 1～49 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0195】

70. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 20 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～69 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0196】

71. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 10 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～69 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0197】

72. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 5 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～71 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0198】

73. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 4 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～72 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0199】

74. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 3 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～73 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0200】

75. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 2 % 未満の細胞傷害活性を示す、実施形態 59～74 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0201】

76. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で 0 % の細胞溶解を示す、実施形態 59～75 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0202】

77. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも 10 nM の抗体又は融合タンパク質濃度で検出不可能な細胞溶解を示す、実施形態 59～69 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0203】

78. 抗体又は融合タンパク質が、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及び IgG1 CH3 を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体と比較して、発現系において発現増加を示す、実施形態 59～77 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0204】

79. 発現系が、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 安定発現系である、実施形態 78 に記載の組換えポリペプチド。

80. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも 5 % である、実施形態 78 又は実施形態 79 に記載の組換えポリペプチド。

【0205】

81. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも 10 % である、実施形態 78～80 のいずれか 1 つに記載の組換えポリペプチド。

【0206】

82. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、

10

20

30

40

50

少なくとも15%である、実施形態78～81のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0207】

83. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも20%である、実施形態78～82のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0208】

84. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも25%である、実施形態78～83のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0209】

85. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも30%である、実施形態78～84のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0210】

86. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも40%である、実施形態78～85のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0211】

87. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも50%である、実施形態78～86のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0212】

88. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも60%である、実施形態78～87のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0213】

89. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも70%である、実施形態78～88のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0214】

90. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも80%である、実施形態78～89のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0215】

91. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも90%である、実施形態78～90のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0216】

92. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも100%である、実施形態78～91のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0217】

93. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも5倍低減された、ヒトFc受容体(FcR)に対する結合を示す、実施形態1～92のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0218】

94. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも10倍低減

10

20

30

40

50

された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～93のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0219】

95. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも50倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～94のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0220】

96. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも100倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～95のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0221】

97. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも500倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～96のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0222】

98. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも1,000倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～97のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0223】

99. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも5,000倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～98のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0224】

100. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも10,000倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態1～99のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0225】

101. FcRが、FcRγ1である、実施形態93～100のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

102. FcRが、FcRγ2Aである、実施形態93～100のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0226】

103. FcRが、FcRγ2Bである、実施形態93～100のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

104. FcRが、FcRγ3Aである、実施形態93～100のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0227】

105. FcRが、FcRγ3Bである、実施形態93～100のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

106. 実施形態1～105のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドを含む、組成物。

【0228】

107. 組成物が、1つ以上の賦形剤及び／又は薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である、実施形態106に記載の組成物。

10

20

30

40

50

108. 実施形態1～105のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドをコードする、核酸又は複数の核酸。

【0229】

109. 実施形態1～105のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド又は実施形態108に記載の核酸（複数可）を発現するように操作された、宿主細胞。

110. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる重鎖定常（CH）領域を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、組換えポリペプチドであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、組換えポリペプチド。

10

【0230】

111. CH領域が、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも96%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態110に記載の組換えポリペプチド。

【0231】

112. CH領域が、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態110又は実施形態111に記載の組換えポリペプチド。

20

【0232】

113. CH領域が、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態110～112のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0233】

114. CH領域が、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態110～113のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

【0234】

115. CH領域が、配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21若しくは配列番号22のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、実施形態110～114のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0235】

116. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインのFc受容体への結合を低減し、かつ／又はエフェクター機能を低減する、実施形態110～115のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

【0236】

117. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、G237位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～116のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0237】

118. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、D265位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～117のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0238】

50

119. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換D265A（EU番号付け）を含む、実施形態118に記載の組換えポリペプチド。

120. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、N297位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～119のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0239】

121. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換N297A（EU番号付け）を含む、実施形態120に記載の組換えポリペプチド。

122. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換N297D（EU番号付け）を含む、実施形態120に記載の組換えポリペプチド。

10

【0240】

123. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、P329位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～122のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0241】

124. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P329A（EU番号付け）を含む、実施形態123に記載の組換えポリペプチド。

125. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P329G（EU番号付け）を含む、実施形態123に記載の組換えポリペプチド。

【0242】

126. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、A330位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～125のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

20

【0243】

127. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、P331位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～126のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0244】

128. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換P331S（EU番号付け）を含む、実施形態127に記載の組換えポリペプチド。

30

129. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、D265位及びN297位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態110～128のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0245】

130. 任意選択的な1つ以上のCH₂ドメインアミノ酸置換が、D265A及びN297A（EU番号付け）を含むか、又はそれらからなる、実施形態129に記載の組換えポリペプチド。

【0246】

131. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインと別の定常ドメインとのヘテロ二量体会合を提供する、実施形態110～130のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

【0247】

132. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、S354位又はE357（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～131のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0248】

133. 任意選択的な1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換S354C又はE357C（EU番号付け）を含む、実施形態132に記載の組換えポリペプチド。

【0249】

50

134. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、T366位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～133のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0250】

135. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換T366W（EU番号付け）を含む、実施形態134に記載の組換えポリペプチド。

136. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、S354位及びT366位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態110～135のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0251】

137. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、S354C及びT366W（EU番号付け）を含むか、又はそれらからなる、実施形態136に記載の組換えポリペプチド。

【0252】

138. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、Y349位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～137のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0253】

139. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換Y349C（EU番号付け）を含む、実施形態138に記載の組換えポリペプチド。

140. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、Y407位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態110～131、138、又は139のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0254】

141. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換Y407V（EU番号付け）を含む、実施形態140に記載の組換えポリペプチド。

142. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、T366位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態140又は実施形態141に記載の組換えポリペプチド。

【0255】

143. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換T366S（EU番号付け）を含む、実施形態142に記載の組換えポリペプチド。

144. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、L368位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態140～143のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0256】

145. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換L368A（EU番号付け）を含む、実施形態144に記載の組換えポリペプチド。

146. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、Y349、T366、L368、及びY407位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含むか、又はそれらからなる、実施形態110～131、又は140～145のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0257】

147. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、Y349C、T366S、L368A、及びY407V（EU番号付け）を含むか、又はそれらからなる、実施形態146に記載の組換えポリペプチド。

【0258】

148. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、組換えポリペプチドの選択的精製を提供する、実施形態110～147のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0259】

149. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、H435位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態148に記載の組換えポリペプチド。

150. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換H435R（EU番号付け）を含む、実施形態149に記載の組換えポリペプチド。

【0260】

151. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、Y436位（EU番号付け）のアミノ酸置換を含む、実施形態148に記載の組換えポリペプチド。

152. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、アミノ酸置換Y436F（EU番号付け）を含む、実施形態151に記載の組換えポリペプチド。

10

【0261】

153. 組換えポリペプチドが、抗原結合タンパク質である、実施形態110～152のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

154. IgG1 CH1ドメイン又はその断片を更に含む、実施形態110～153のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0262】

155. IgG1 CH1の断片が、DKKV（配列番号31）を含むか、又はそれからなる、実施形態154に記載の組換えポリペプチド。

156. IgG1 CH1の断片が、DKRV（配列番号32）を含むか、又はそれからなる、実施形態154に記載の組換えポリペプチド。

20

【0263】

157. 少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態110～156のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

158. 少なくとも2つの標的結合ドメインを含む、実施形態110～157のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0264】

159. 少なくとも3つの標的結合ドメインを含む、実施形態110～158のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

160. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、Fabを含む、実施形態157～159のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

【0265】

161. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、scFvを含む、実施形態157～160のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

162. 第1の標的結合ドメインとしてのFab及び第2の標的結合ドメインとしてのscFvを含む、実施形態157～161のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0266】

163. キメラ定常ドメインのN末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態157～160のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

164. キメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態157～163のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

【0267】

165. キメラ定常ドメインのN末端にある少なくとも第1の標的結合ドメインと、キメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも第2の標的結合ドメインと、を含む、実施形態157～164のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0268】

166. N末端からC末端へ、scFv、Fab、及びキメラ定常ドメインを含む、実施形態157～165のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

167. 組換えポリペプチドが、抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）であるか、又は抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部を形成する、実施形態110～166のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

50

【0269】

168. 組換えポリペプチドが、一価抗体であるか、又は一価抗体の一部を形成する、実施形態110～167のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

169. 組換えポリペプチドが、二価抗体であるか、又は二価抗体の一部を形成する、実施形態110～167のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0270】

170. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態169に記載の組換えポリペプチド。

171. 組換えポリペプチドが、三価抗体であるか、又は三価抗体の一部を形成する、実施形態110～167のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

【0271】

172. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態171に記載の組換えポリペプチド。

173. 組換えポリペプチドが、三重特異性抗体であるか、又は三重特異性抗体の一部を形成する、実施形態171に記載の組換えポリペプチド。

【0272】

174. 組換えポリペプチドが、四価抗体であるか、又は四価抗体の一部を形成する、実施形態110～167のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

175. 組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であるか、又は二重特異性抗体の一部を形成する、実施形態174に記載の組換えポリペプチド。

20

【0273】

176. 組換えポリペプチドが、三重特異性抗体であるか、又は三重特異性抗体の一部を形成する、実施形態174に記載の組換えポリペプチド。

177. 組換えポリペプチドが、融合タンパク質であるか、又は融合タンパク質の一部を形成する、実施形態110～157のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0274】

178. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で20%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～171のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0275】

179. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で10%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～178のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

【0276】

180. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で5%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～179のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0277】

181. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で4%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～180のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

【0278】

182. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で3%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～181のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0279】

183. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で2%未満の細胞傷害活性を示す、実施形態167～182のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0280】

50

184. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で0%の細胞溶解を示す、実施形態167~183のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0281】

185. 抗体又は融合タンパク質が、少なくとも10 nMの抗体又は融合タンパク質濃度で検出不可能な細胞溶解を示す、実施形態167~171のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0282】

186. 抗体又は融合タンパク質が、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含む抗体と比較して、発現系において発現増加を示す、実施形態167~185のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

【0283】

187. 発現系が、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）安定発現系である、実施形態186に記載の組換えポリペプチド。

188. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも5%である、実施形態186又は実施形態187に記載の組換えポリペプチド。

【0284】

189. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも10%である、実施形態186~188のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

20

【0285】

190. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも15%である、実施形態186~189のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0286】

191. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも20%である、実施形態186~190のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0287】

192. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも25%である、実施形態186~191のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

30

【0288】

193. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも30%である、実施形態186~192のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0289】

194. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも40%である、実施形態186~193のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

40

【0290】

195. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも50%である、実施形態186~194のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0291】

196. 野生型IgG1定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも60%である、実施形態186~195のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0292】

50

197. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも70%である、実施形態186～196のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0293】

198. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも80%である、実施形態186～197のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0294】

199. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも90%である、実施形態186～198のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0295】

200. 野生型 IgG1 定常ドメインを含む抗体又は融合タンパク質と比較した増加が、少なくとも100%である、実施形態186～199のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0296】

201. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも5倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～200のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0297】

202. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも10倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～201のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0298】

203. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも50倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～202のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0299】

204. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも100倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～203のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0300】

205. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも500倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～204のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0301】

206. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも1,000倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～205のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0302】

207. 組換えポリペプチドが、IgG1 ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型 IgG1 定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも5,000倍低減された、ヒトFc受容体 (FcR) に対する結合を示す、実施形態110～206のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0303】

208. 組換えポリペプチドが、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2、及びIgG1 CH3を含む野生型IgG1定常ドメインを含むポリペプチドよりも少なくとも10,000倍低減された、ヒトFc受容体(FcR)に対する結合を示す、実施形態110~207のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0304】

209. FcRが、FcRγ1である、実施形態201~208のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

210. FcRが、FcRγ2Aである、実施形態201~208のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0305】

211. FcRが、FcRγ2Bである、実施形態201~208のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

212. FcRが、FcRγ3Aである、実施形態201~208のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

【0306】

213. FcRが、FcRγ3Bである、実施形態201~208のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド。

214. 実施形態110~213のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドを含む、組成物。

【0307】

215. 組成物が、1つ以上の賦形剤及び／又は薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である、実施形態214に記載の組成物。

216. 実施形態110~215のいずれか1つに記載の組換えポリペプチドをコードする、核酸又は複数の核酸。

【0308】

217. 実施形態110~213のいずれか1つに記載の組換えポリペプチド又は実施形態216に記載の核酸(複数可)を発現するように操作された、宿主細胞。

218. キメラ定常ドメインを含む組換えポリペプチドを産生する方法であって、組換えポリペプチドが発現される条件下で、請求項109又は請求項217に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

【0309】

219. 組換えポリペプチドを回収し、任意選択的に精製することを更に含む、請求項218に記載の方法。

群B：番号付き実施形態

1. 定常ドメインを含む融合タンパク質の産生を増加させるための方法であって、N末端からC末端へ、

(a) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(i) 216~225位(EU番号付け)のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHT(配列番号24)、

(ii) 226~229位(EU番号付け)のヒトIgG1コアヒンジアミノ酸配列CPPC(配列番号25)、

(iii) 230~238位(EU番号付け)のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVAGP(配列番号42)、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(b) ヒトIgG1の239~340位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S(EU番号付け)のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH2ドメインと、

(c) ヒトIgG1の341~447位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH3ドメ

10

20

30

40

50

インアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換を含む、CH3ドメインであって、任意選択的に、置換が、ノブ置換（例えば、T366W）、ホール置換（例えば、T366S、L368A、Y407V）、スター変異（例えば、H435R、Y436F）、ジスルフィド架橋を導入する変異（例えば、S354C若しくはE357C）、又は前述のうちの2つ以上の組み合わせから選択される、CH3ドメインと、を含む、キメラ定常ドメインを有するポリペプチドを発現することを含む、方法。

【0310】

2. 方法が、対照定常ドメインを含むバリエント融合タンパク質の発現と比べて発現を増加させる、実施形態1に記載の方法。

3. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号1の定常ドメインである、実施形態2に記載の方法。

10

【0311】

4. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号9の定常ドメインである、実施形態2に記載の方法。

【0312】

5. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号10の定常ドメインである、実施形態2に記載の方法。

20

【0313】

6. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも10%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

7. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも15%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

【0314】

8. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも20%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

9. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも30%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

30

【0315】

10. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも40%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

11. バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が、少なくとも50%である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の方法。

【0316】

12. 定常ドメインを含む融合タンパク質の活性を増加させるための方法であって、N末端からC末端へ、

(a) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(i) 216～225位（EU番号付け）のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHT（配列番号24）、

40

(ii) 226～229位（EU番号付け）のヒトIgG1コアヒンジアミノ酸配列CPPC（配列番号25）、

(iii) 230～238位（EU番号付け）のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVAGP（配列番号42）、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(b) ヒトIgG1の239～340位（EU番号付け）のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH2ドメインと、

50

(c) ヒトIgG1の341～447位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH3ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換を含む、CH3ドメインであって、任意選択的に、置換が、ノブ置換(例えば、T366W)、ホール置換(例えば、T366S、L368A、Y407V)、スター変異(例えば、H435R、Y436F)、ジスルフィド架橋を導入する変異(例えば、S354C若しくはE357C)、又は前述のうちの2つ以上の組み合わせから選択される、CH3ドメインと、を含む、キメラ定常ドメインを有するポリペプチドを発現することを含む、方法。

【0317】

13. 方法が、対照定常ドメインを含むバリエント融合タンパク質の発現と比べて発現を増加させる、実施形態6に記載の方法。

10

14. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号1の定常ドメインである、実施形態13に記載の方法。

【0318】

15. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号9の定常ドメインである、実施形態13に記載の方法。

【0319】

16. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号10の定常ドメインである、実施形態13に記載の方法。

20

【0320】

17. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも10%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

18. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも15%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

【0321】

19. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも20%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

20. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも30%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

30

【0322】

21. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも40%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

22. バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも50%である、実施形態13～16のいずれか1つに記載の方法。

【0323】

23. 定常ドメインを含む融合タンパク質の発現及び活性を増加させるための方法であって、N末端からC末端へ、

(a) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

40

(i) 216～225位(EU番号付け)のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHT(配列番号24)、

(ii) 226～229位(EU番号付け)のヒトIgG1コアヒンジアミノ酸配列CPPC(配列番号25)、

(iii) 230～238位(EU番号付け)のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVAGP(配列番号42)、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(b) ヒトIgG1の239～340位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S(EU番号付け)のうちの

50

1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH₂ドメインと、

(c) ヒトIgG1の341～447位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH₃ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH₃ドメインアミノ酸置換を含む、CH₃ドメインであって、任意選択的に、置換が、ノブ置換(例えば、T366W)、ホール置換(例えば、T366S、L368A、Y407V)、スター変異(例えば、H435R、Y436F)、ジスルフィド架橋を導入する変異(例えば、S354C若しくはE357C)、又は前述のうちの2つ以上の組み合わせから選択される、CH₃ドメインと、を含む、キメラ定常ドメインを有するポリペプチドを発現することを含む、方法。

【0324】

24. 方法が、対照定常ドメインを含むバリエント融合タンパク質の発現と比べて発現及び活性を増加させる、実施形態23に記載の方法。 10

25. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号1の定常ドメインである、実施形態24に記載の方法。

【0325】

26. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号9の定常ドメインである、実施形態24に記載の方法。

【0326】

27. 対照定常ドメインが、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う又は伴わない配列番号10の定常ドメインである、実施形態24に記載の方法。 20

【0327】

28.

(a) バリエント融合タンパク質と比べた発現の増加が少なくとも10%であり、

(b) バリエント融合タンパク質と比べた活性の増加が、少なくとも10%である、実施形態24～27のいずれか1つに記載の方法。

【0328】

29. バリエント融合ポリペプチドと比べた発現の増加が、少なくとも15%である、実施形態28に記載の方法。 30

30. バリエント融合ポリペプチドと比べた発現の増加が、少なくとも20%である、実施形態28に記載の方法。

【0329】

31. バリエント融合ポリペプチドと比べた発現の増加が、少なくとも30%である、実施形態28に記載の方法。

32. バリエント融合ポリペプチドと比べた発現の増加が、少なくとも40%である、実施形態28に記載の方法。

【0330】

33. バリエント融合ポリペプチドと比べた発現の増加が、少なくとも50%である、実施形態28に記載の方法。 40

34. バリエント融合ポリペプチドと比べた活性の増加が、少なくとも15%である、実施形態28～33のいずれか1つに記載の方法。

【0331】

35. バリエント融合ポリペプチドと比べた活性の増加が、少なくとも20%である、実施形態28～33のいずれか1つに記載の方法。

36. バリエント融合ポリペプチドと比べた活性の増加が、少なくとも30%である、実施形態28～33のいずれか1つに記載の方法。

【0332】

37. バリエント融合ポリペプチドと比べた活性の増加が、少なくとも40%である、実施形態28～33のいずれか1つに記載の方法。 50

38. バリエント融合ポリペプチドと比べた活性の増加が、少なくとも50%である、実施形態28～33のいずれか1つに記載の方法。

【0333】

39. 任意選択的な1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインのFc受容体への結合を低減し、かつ／又はエフェクター機能を低減する、実施形態1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0334】

40. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、キメラ定常ドメインと別の定常ドメインとのヘテロ二量体会合を提供する、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。

【0335】

41. 任意選択的な1つ以上のCH3ドメインアミノ酸置換が、融合タンパク質の選択的精製を提供する、実施形態1～40のいずれか1つに記載の方法。

42. 融合タンパク質が、抗原結合タンパク質である、実施形態1～41のいずれか1つに記載の方法。

【0336】

43. キメラ定常ドメインが、IgG1 CH1ドメイン又はその断片を含み、任意選択的に、IgG1 CH1の断片が、DKKV（配列番号31）又はDKRV（配列番号32）を含むか、又はそれからなる、実施形態1～42のいずれか1つに記載の方法。

【0337】

44. 融合タンパク質が、少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～43のいずれか1つに記載の方法。

45. 融合タンパク質が、少なくとも2つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～44のいずれか1つに記載の方法。

【0338】

46. 融合タンパク質が、少なくとも3つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～45のいずれか1つに記載の方法。

47. 融合タンパク質が、少なくとも1つのFabを含む、実施形態1～46のいずれか1つに記載の方法。

【0339】

48. 融合タンパク質が、少なくとも1つのscFvを含む、実施形態1～47のいずれか1つに記載の方法。

49. 融合タンパク質が、少なくとも1つのFab及び少なくとも1つのscFvを含む、実施形態1～48のいずれか1つに記載の方法。

【0340】

50. 融合タンパク質が、2つのFab及び1つのscFvを含む、実施形態1～49のいずれか1つに記載の方法。

51. 融合タンパク質が、キメラ定常ドメインのN末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～50のいずれか1つに記載の方法。

【0341】

52. 融合タンパク質が、キメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも1つの標的結合ドメインを含む、実施形態1～51のいずれか1つに記載の方法。

53. 融合タンパク質が、キメラ定常ドメインのN末端にある第1の標的結合ドメイン、及びキメラ定常ドメインのC末端にある少なくとも第2の標的結合ドメインを含む、実施形態1～52のいずれか1つに記載の方法。

【0342】

54. 融合タンパク質が、N末端からC末端へ、scFv、Fab、及びキメラ定常ドメインを含む、実施形態1～53のいずれか1つに記載の方法。

55. 融合タンパク質が、抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部であるか、又は抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部を形成する、実施形態1～54のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 つに記載の方法。

【0343】

56. 融合タンパク質が、実施形態 1 及び 39～41 のいずれか 1 つで定義される 2 つのキメラ定常ドメインを含む二量体であり、任意選択的に、各キメラ定常ドメインが、配列番号 3、15、16、17、18、19、20、21、22 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する定常ドメインから独立して選択される、実施形態 1～55 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0344】

57. 融合タンパク質が、ホモ二量体である、実施形態 56 に記載の方法。

58. 融合タンパク質が、ヘテロ二量体である、実施形態 56 に記載の方法。

10

59. キメラ定常ドメインの一方がノブ置換を含み、他方のキメラ定常ドメインがホール置換を含む、実施形態 58 に記載の方法。

【0345】

60. キメラ定常ドメインが、スター変異を含む、実施形態 58 又は実施形態 59 に記載の方法。

61. 融合タンパク質が、2 つのポリペプチド鎖を含む、実施形態 1～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0346】

62. 融合タンパク質が、3 つのポリペプチド鎖を含む、実施形態 1～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

63. 融合タンパク質が、4 つのポリペプチド鎖を含む、実施形態 1～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0347】

64. 融合タンパク質を発現することが、融合タンパク質が発現される条件下で、融合タンパク質を発現するように操作された宿主細胞を培養することを含む、実施形態 1～63 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0348】

65. 宿主細胞が、哺乳動物宿主細胞である、実施形態 64 に記載の方法。

66. 発現された融合タンパク質を回収し、任意選択的に、精製することを更に含む、実施形態 64 又は実施形態 65 に記載の方法。

30

【0349】

67. 宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞、又は HEK293 若しくは誘導体（例えば、Exp1293F）細胞である、実施形態 64～66 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0350】

68. 当該の発現ステップの前に、宿主細胞に、融合タンパク質をコードする核酸分子又は複数の核酸分子を導入することを更に含む、実施形態 1～67 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0351】

69. 核酸分子又は複数の核酸分子が、1 つ以上の宿主細胞発現ベクターに含まれる、実施形態 64 に記載の方法。

40

70. 実施形態 1～69 のいずれか 1 つに記載の方法によって産生される融合タンパク質の、集団。

【0352】

71. 少なくとも 10,000 個の融合タンパク質を含む、実施形態 70 に記載の集団。

72. ヘテロ二量体化又は精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異を伴う、又は伴わない配列番号 1、配列番号 9、又は配列番号 10 のアミノ酸配列を含む対照定常ドメインを含む融合タンパク質の集団と比較してより高い活性を特徴とする）、実施形態 70 又は実施形態 71 に記載の集団。

50

【0353】

群C：番号付き実施形態

1. 第2のポリペプチド鎖と会合した第1のポリペプチド鎖を含む、融合タンパク質であって、

(a) 第1のポリペプチド鎖が、配列番号1と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む第1のキメラ定常ドメインを含むが、但し、キメラ定常ドメインは、

(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、

(ii) 第2のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する1つ以上のアミノ酸置換を有し、

(b) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号1と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む第2のキメラ定常ドメインを含むが、但し、キメラ定常ドメインは、

(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、

(ii) 第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する1つ以上のアミノ酸置換を有する、融合タンパク質。

【0354】

2. 第2のポリペプチド鎖と会合した第1のポリペプチド鎖を含む、融合タンパク質であって、

(a) 第1のポリペプチド鎖が、第1のキメラ定常ドメインを含み、第1のキメラ定常ドメインが、N末端からC末端へ、

(i) キメラ免疫グロブリンヒンジであって、

(1) 216～225位(EU番号付け)のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHT(配列番号24)、

(2) 226～229位(EU番号付け)のヒトIgG1コアヒンジアミノ酸配列CPPC(配列番号25)、

(3) 230～238位(EU番号付け)のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVAGP(配列番号42)、を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(ii) ヒトIgG1の237～340位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S(EU番号付け)のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH2ドメインと、

(iii) ヒトIgG1の341～447位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH3ドメインアミノ酸配列を含む、CH3ドメインと、

(iv) 第2のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する1つ以上のアミノ酸置換と、

(v) 任意選択的に、エフェクター機能を低減し、かつ／又は精製を促進するための1つ以上のアミノ酸置換と、を含み、

(b) 第2のポリペプチド鎖が、第2のキメラ定常ドメインを含み、第2のキメラ定常ドメインが、N末端からC末端へ、

(i) ヒトIgG1の216～227位(EU番号付け)のヒトIgG1上部ヒンジアミノ酸配列EPKSCDKTHTCP(配列番号43)及びヒトIgG2の228～236位(EU番号付け)のヒトIgG2下部ヒンジアミノ酸配列PCPAPPVA(配列番号44)を含む、キメラ免疫グロブリンヒンジと、

(ii) ヒトIgG1の237～340位(EU番号付け)のヒトIgG1 CH2ドメインアミノ酸配列を含み、任意選択的に、1つ以上のCH2ドメインアミノ酸置換を含む、CH2ドメインであって、任意選択的に、CH2が、アミノ酸置換H268Q、K274Q、Y296F、A327G、A330S、及びP331S(EU番号付け)のうちの1つ以上を有する場合、それらは同時に生じない、CH2ドメインと、

10

20

30

40

50

(iii) ヒト IgG1 の 341～447 位 (EU 番号付け) の ヒト IgG1 CH3 ドメイン アミノ酸配列を含む、CH3 ドメインと、

(iv) 第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する1つ以上のアミノ酸置換と、

(c) 任意選択的に、エフェクター機能を低減し、かつ／又は精製を促進するための1つ以上のアミノ酸置換と、を含む、融合タンパク質。

【0355】

3. 第1のキメラ定常ドメイン及び第2のキメラ定常ドメインが各々、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれらなる、実施形態2に記載の融合タンパク質。

10

【0356】

4. 第1のキメラ定常ドメイン及び第2のキメラ定常ドメインが各々、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも96%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれらなる、実施形態1又は実施形態2に記載の融合タンパク質。

【0357】

5. 第1のキメラ定常ドメイン及び第2のキメラ定常ドメインが各々、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれらなる、実施形態1又は実施形態2に記載の融合タンパク質。

【0358】

6. 第1のキメラ定常ドメイン及び第2のキメラ定常ドメインが各々、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれらなる、実施形態1又は実施形態2に記載の融合タンパク質。

20

【0359】

7. 第1のキメラ定常ドメイン及び第2のキメラ定常ドメインが各々、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれらなる、実施形態1又は実施形態2に記載の融合タンパク質。

【0360】

8. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号15のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号16のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

30

【0361】

9. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号17のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号16のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0362】

10. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号15のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号18のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0363】

11. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号17のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号18のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

40

【0364】

12. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号19のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号20のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0365】

13. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号19のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号22のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

50

【0366】

14. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号21のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号20のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0367】

15. 第1のキメラ定常ドメインが配列番号21のアミノ酸配列を含み、第1のキメラ定常ドメインが配列番号22のアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0368】

16. 融合タンパク質が、少なくとも1つの標的結合ドメインを含む抗原結合タンパク質である、実施形態1～15のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

10

17. 融合タンパク質が、抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部であるか、又は抗体（任意選択的に、多重特異性抗体）の一部を形成する、実施形態1～16のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0369】

18. 少なくとも2つの標的結合ドメインを含む、実施形態16又は実施形態17に記載の融合タンパク質。

19. 融合タンパク質が、二価抗体であるか、又は二価抗体の一部を形成する、実施形態18に記載の融合タンパク質。

【0370】

20

20. 少なくとも3つの標的結合ドメインを含む、実施形態16～18のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

21. 融合タンパク質が、三価抗体であるか、又は三価抗体の一部を形成する、実施形態20に記載の融合タンパク質。

【0371】

22. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、Fabを含む、実施形態16～21のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

23. 少なくとも1つの標的結合ドメインが、scFvを含む、実施形態16～21のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0372】

30

24. 第1の標的結合ドメインとしてのFab及び第2の標的結合ドメインとしてのscFvを含む、実施形態16～21のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

25. 第1の標的結合ドメインとしてのFab、第2の標的結合ドメインとしてのscFv、及び第3の標的結合ドメインとしてのFabを含む、実施形態20又は実施形態21に記載の融合タンパク質。

【0373】

26. 第3のポリペプチド鎖及び第4のポリペプチド鎖を含み、

(a) 第1のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域(VH1)、CH1ドメイン、及び第1の定常ドメインを含み、

(b) 第2のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域(VH2)、CH1ドメイン、及び第2の定常ドメインを含み、

40

(c) 第3のポリペプチド鎖が、第1のFabドメインを形成するための、VH1に会合した第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む第1の軽鎖を含み、

(d) 第4のポリペプチド鎖が、第2のFabドメインを形成するための、VH2に会合した第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む第1の軽鎖を含む、実施形態16～25のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【0374】

27. VH1及びVH2が、同一である、実施形態26に記載の融合タンパク質。

28. VH1及びVH2が、異なる、実施形態26に記載の融合タンパク質。

29. 第1のFabドメイン及び第2のFabドメインが、同じ標的分子上の異なるエ

50

ピトープに結合する、実施形態 28 に記載の融合タンパク質。

【0375】

30. 第1のFabドメイン及び第2のFabドメインが、異なる標的分子に結合する、実施形態 28 に記載の融合タンパク質。

31. 第3のポリペプチド鎖及び第4のポリペプチド鎖を含み、

(a) 第1のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、scFv、任意選択的なリンカー、第1の重鎖可変領域(VH1)、CH1ドメイン、及び第1の定常ドメインを含み、

(b) 第2のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域(VH2)、CH1ドメイン、及び第2の定常ドメインを含み、任意選択的に、VH2が、VH1と同一であり、

(c) 第3のポリペプチド鎖が、第1のFabドメインを形成するための、VH1に会合した第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む第1の軽鎖を含み、

(d) 第4のポリペプチド鎖が、第2のFabドメインを形成するための、VH2に会合した第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む第1の軽鎖を含む、実施形態 20 又は実施形態 21 に記載の融合タンパク質。

10

【0376】

32. 第3のポリペプチド鎖及び第4のポリペプチド鎖を含み、

(a) 第1のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域(VH1)、CH1ドメイン、及び第1の定常ドメインを含み、

(b) 第2のポリペプチド鎖が、N末端からC末端へ、scFv、任意選択的なリンカー、第2の重鎖可変領域(VH2)、CH1ドメイン、及び第2の定常ドメインを含み、任意選択的に、VH2が、VH1と同一であり、

(c) 第3のポリペプチド鎖が、第1のFabドメインを形成するための、VH1に会合した第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む第1の軽鎖を含み、

(d) 第4のポリペプチド鎖が、第2のFabドメインを形成するための、VH2に会合した第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む第1の軽鎖を含む、実施形態 20 又は実施形態 21 に記載の融合タンパク質。

20

【0377】

33. scFvが、N末端からC末端へ、VH3-任意選択的なリンカー-VL3の順に配置された、第3の重鎖可変領域(VH2)及び第3の軽鎖可変領域(VL3)を含む、実施形態 31 又は実施形態 32 に記載の融合タンパク質。

30

【0378】

34. scFvが、N末端からC末端へ、VL3-任意選択的なリンカー-VH3の順に配置された、第3の重鎖可変領域(VH2)及び第3の軽鎖可変領域(VL3)を含む、実施形態 31 又は実施形態 32 に記載の融合タンパク質。

【0379】

35. scFvが、第1のFabドメイン及び／又は第2のFabドメインとは異なる標的分子に結合する、実施形態 31～34 のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

36. 以下：

(a) 第1及び第2のキメラ定常ドメイン内の、EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236に配列E-L-L-G(配列番号23)、並びに／又は

(b) ヘテロ二量体化若しくは精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／若しくはスター変異を伴う若しくは伴わない配列番号10のアミノ酸配列を有する第1及び第2のキメラ定常ドメイン、を含むバリエーションタンパク質と比較して、発現系において少なくとも10%の発現増加を示す、実施形態 1～35 のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

40

【0380】

37. 発現系が、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)発現系、又はHEK293若しくは誘導体(例えば、Exp293F)発現系である、実施形態 36 に記載の融合タンパク質。

50

【0381】

38. 発現の増加が、少なくとも20%又は少なくとも30%である、実施形態36又は実施形態37に記載の融合タンパク質。

39. 以下：

(a) 第1及び第2のキメラ定常ドメイン内の、EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236に配列E-L-L-G（配列番号23）、並びに／又は

(b) ヘテロ二量体化若しくは精製を可能にする変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／若しくはスター変異を伴う若しくは伴わない配列番号9のアミノ酸配列を有する第1及び第2のキメラ定常ドメイン、を含むバリエーションタンパク質と比較して、少なくとも5倍低減された、ヒトFc受容体（FcR）に対する結合を示す、実施形態1～38のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

10

【0382】

40. 結合の低減が、少なくとも10倍、又は少なくとも20倍である、実施形態39に記載の融合タンパク質。

41. FcRが、FcRγ1である、実施形態39又は実施形態40に記載の融合タンパク質。

【0383】

42. FcRが、FcRγ2Aである、実施形態39又は実施形態40に記載の融合タンパク質。

43. FcRが、FcRγ2Bである、実施形態39又は実施形態40に記載の融合タンパク質。

20

【0384】

44. FcRが、FcRγ3Aである、実施形態39又は実施形態40に記載の融合タンパク質。

45. FcRが、FcRγ3Bである、実施形態39又は実施形態40に記載の融合タンパク質。

【0385】

46. 実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質を含む、組成物。

47. 組成物が、1つ以上の賦形剤及び／又は薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である、実施形態46に記載の組成物。

30

【0386】

48. 実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質をコードする、核酸又は複数の核酸。

49. 実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質を発現するように操作された、宿主細胞。

【0387】

50. 実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質をコードする1つ以上の発現ベクターを含む、宿主細胞。

51. CHO細胞、又はHEK293細胞若しくは誘導体（例えば、Exp i 293 F）細胞である、実施形態49又は実施形態50に記載の宿主細胞。

40

【0388】

52. 実施形態49～51のいずれか1つに記載の宿主細胞を培養することと、任意選択的に、発現されたタンパク質を回収及び／又は精製することと、を含む、実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質を産生する、方法。

【0389】

53. 実施形態1～45のいずれか1つに記載の融合タンパク質の、集団。

54. 実施形態52のいずれか1つに記載の方法によって産生される、実施形態53に記載の融合タンパク質の集団。

【0390】

55. 少なくとも10,000個の融合タンパク質を含む、実施形態53又は実施形態

50

54に記載の集団。

群D：番号付き実施形態

1. 定常ドメインを含む組換えタンパク質であって、定常ドメインが、

- (a) 配列番号3のアミノ酸配列、
- (b) 配列番号15のアミノ酸配列、
- (c) 配列番号16のアミノ酸配列、
- (d) 配列番号17のアミノ酸配列、
- (e) 配列番号18のアミノ酸配列、
- (f) 配列番号19のアミノ酸配列、
- (g) 配列番号20のアミノ酸配列、
- (h) 配列番号21のアミノ酸配列、
- (i) 配列番号22のアミノ酸配列、

(j) 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号18のうちのいずれか1つと少なくとも97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するが、但し、Fcドメインは、(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、(ii) 任意選択的に、(1) スター変異、及び／又は(2) ノブ又はホール変異、及び／又は(3) S354C若しくはE357C変異(EU番号付けによって定義される)を有する、組換えタンパク質。

【0391】

2. 多量体である、実施形態1に記載の組換えタンパク質。

3. 2つのポリペプチド鎖を含む、実施形態2に記載の組換えタンパク質。

4. 3つのポリペプチド鎖を含む、実施形態2に記載の組換えタンパク質。

【0392】

5. 4つのポリペプチド鎖を含む、実施形態2に記載の組換えタンパク質。

6. Fcホモ二量体を含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載の組換えタンパク質。

【0393】

7. 配列番号3のアミノ酸配列を各々が有する2つの定常ドメインを含む、実施形態6に記載の組換えタンパク質。

8. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも97%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの同一の定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、アミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有する、実施形態6に記載の組換えタンパク質。

【0394】

9. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの同一の定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、アミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有する、実施形態6に記載の組換えタンパク質。

【0395】

10. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22のうちのいずれか1つと少なくとも99%を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの同一の定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、アミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有する、実施形態6に記載の組換えタンパク質。

【0396】

11. 配列番号3と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの同一の定常ドメインを含む、実施形態6に記載の組換えタンパク質。

12. Fcヘテロ二量体を含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載の組換えタンパク質。

【0397】

13. 配列番号15のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号16のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0398】

14. 配列番号15のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号18のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0399】

15. 配列番号17のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号16のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0400】

16. 配列番号17のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号18のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0401】

17. 配列番号19のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号20のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0402】

18. 配列番号19のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号22のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0403】

19. 配列番号21のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号20のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0404】

20. 配列番号21のアミノ酸配列を有する第1の定常ドメインと、配列番号22のアミノ酸配列を有する第2の定常ドメインと、を含む、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0405】

21. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、又は配列番号18のいずれか1つと少なくとも97%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの異なる定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、(ii) 任意選択的に、(1) スター変異、及び／又は(2) ノブ又はホール変異、及び／又は(3) S354C若しくはE357C変異(EU番号付けによって定義される)を有する、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0406】

22. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、又は配列番号18のいずれか1つと少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの異なる定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、(ii) 任意選択的に、(1) スター変異、及び／又は(2) ノブ又はホール変異、及び／又は(3) S354C若しくはE357C変異(EU番号付けによって定義される)を有する、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

10

20

30

40

50

【0407】

23. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、又は配列番号18のいずれか1つと少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を各々が有する2つの異なる定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、(ii)任意選択的に、(1)スター変異、及び／又は(2)ノブ又はホール変異、及び／又は(3)S354C若しくはE357C変異(EU番号付けによって定義される)を有する、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0408】

24. 配列番号3、配列番号15、配列番号16、配列番号17、又は配列番号18のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を各々が有する2つの異なる定常ドメインを含むが、但し、Fcドメインは、(i) EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236にP-V-A-不在の配列を有し、(ii)任意選択的に、(1)スター変異、及び／又は(2)ノブ又はホール変異、及び／又は(3)S354C若しくはE357C変異(EU番号付けによって定義される)を有する、実施形態12に記載の組換えタンパク質。

【0409】

25. 実施形態1～24のいずれか1つに記載のタンパク質をコードする、核酸又は複数の核酸。

26. 宿主細胞であって、

(a) 実施形態1～24のいずれか1つに記載の組換えタンパク質を発現するように操作され、かつ／又は、

(b) 実施形態1～24のいずれか1つに記載の組換えタンパク質をコードする1つ以上の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【0410】

27. CHO細胞、又はHEK293細胞若しくは誘導体(例えば、Exp293F)細胞である、実施形態26に記載の宿主細胞。

28. 組換えタンパク質が発現されるように、実施形態26又は実施形態27に記載の宿主細胞を培養することと、任意選択的に、発現されたタンパク質を回収及び／又は精製することと、を含む、実施形態1～24のいずれか1つに記載の組換えタンパク質を産生する、方法。

【0411】

29. ポリペプチドの産生を増加させるための方法であって、実施形態1～24のいずれか1つに定義されるタンパク質としてポリペプチドを発現させることを含む、方法。

30. タンパク質が発現されるように、実施形態25～27のいずれか1つに記載の宿主細胞を培養することと、任意選択的に、発現されたタンパク質を回収及び／又は精製することと、を含む、実施形態29に記載の方法。

【0412】

31. 方法が、対照定常ドメイン又は定常ドメインの対を含むバリエーションタンパク質の発現と比べて発現を増加させる、実施形態29又は実施形態30に記載の方法。

32. 対照定常ドメインが、又は定常ドメインの対が、EU番号付けによって定義されるアミノ酸233～236に配列E-L-L-G(配列番号23)を有する、実施形態31に記載の方法。

【0413】

33. 対照定常ドメインが、又は定常ドメインの対が、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする1つ以上の変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異及び／又はジスルフィド架橋を導入する変異(例えば、S354C又はE357C)を伴う又は伴わない配列番号1のアミノ酸配列を有する、実施形態31に記載の方法。

【0414】

34. 対照定常ドメインが、又は定常ドメインの対が、ヘテロ二量体化又は精製を可能

10

20

30

40

50

にする1つ以上の変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異及び／又はジスルフィド架橋を導入する変異（例えば、S 3 5 4 C又はE 3 5 7 C）を伴う又は伴わない配列番号9のアミノ酸配列を有する、実施形態31に記載の方法。

【0415】

35．対照定常ドメインが、又は定常ドメインの対が、ヘテロ二量体化又は精製を可能にする1つ以上の変異、例えば、ノブ・イン・ホール変異及び／又はスター変異及び／又はジスルフィド架橋を導入する変異（例えば、S 3 5 4 C又はE 3 5 7 C）を伴う又は伴わない配列番号10のアミノ酸配列を有する、実施形態31に記載の方法。

【0416】

36．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも10%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。 10

37．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも15%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。

【0417】

38．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも20%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。

39．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも30%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。

【0418】

40．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも40%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。 20

41．バリエーションタンパク質と比べた発現及び／又は活性の増加が、少なくとも50%である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。

【0419】

42．実施形態1～24のいずれか1つに記載のタンパク質の、集団。

43．実施形態28～41のいずれか1つに記載の方法によって産生される、実施形態42に記載のタンパク質の集団。

【0420】

44．少なくとも10,000個のタンパク質を含む、実施形態42に記載の集団。

45．実施形態32～35のいずれか1つで定義される、対照定常ドメイン又は定常ドメインの対を含むタンパク質の集団と比較してより高い活性を特徴とする、実施形態42～44のいずれか1つに記載の集団。 30

【0421】

46．タンパク質の集団と、1つ以上の賦形剤及び／又は薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物の形態にある、実施形態42～45のいずれか1つに記載の集団。

【実施例】

【0422】

8．実施例

8．1．材料及び方法

8．1．1．実験構築物

以下に示されるIgG1 PVAドメイン及び対照定常ドメインを含む抗体構築物を生成した。試験構築物及び対照構築物の構成要素を以下の表2に記載する。

【0423】

【表 2 - 1】

表 2-試験構築物及び対照構築物の構成要素の配列		
説明	アミノ酸配列	配列番号
hIgG1(216-447; EU 番号付け) hIgG1 ヒンジ及びFc。	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	1
hIgG1 PVA: IgG2 ベースのヒンジ領域 及び IgG1 CH2 及び CH3 を含む、バリエーション hIgG1 ヒンジ及びFc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	2
hIgG1 PVA スター: IgG2 ベースのヒンジ領域 及び IgG1 CH2 及びス ター変異を有する CH3 を含 む、バリエーション hIgG1 ヒ ンジ及びFc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	3
hIgG1s: IgG2 ベースのヒンジ領域 及び IgG4 CH2 及び IgG1 CH3 を含む、バリエーション hIgG1 ヒンジ及びFc	DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	4
hIgG1 N180G、 別名 N297G: 描画された配列に N180G 変異(EU 番号付けによる N297G)を有する、バリア ント hIgG1 ヒンジ及びFc	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	5
hIgG2(216-447;EU 番号付け) UniProt P01859 による hIgG2 ヒンジ及びFc	ERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT VHLDWLNGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	6

【 0 4 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

表 2-試験構築物及び対照構築物の構成要素の配列		
説明	アミノ酸配列	配列番号
hIgG2(216-447;EU 番号付け) 描画された配列の 159 位に S から A への置換 (DISVE(配列番号 45)→DIAVE(配列番号 46))を有する、バリエント hIgG2 配列。別段示されない限り、バリエント hIgG2 配列を本明細書に例示される構築物に使用した。	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK	7
hIgG4(216-447;EU 番号付け):	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK	8
hIgG4 S108P: S108P 変異(EU 番号付けによる S228P)を有する、バリエント hIgG4 ヒンジ及び Fc。	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK	9
hIgG4s: S108P 変異(EU 番号付けによる S228P)を有する IgG2 ベースのヒンジ領域、及び IgG1 CH2 及び CH3 を有する、バリエント hIgG4 ヒンジ及び Fc	ESKYGPPCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK	10
G ₄ S (配列番号 11):	GGGGS	11
7-アミノ酸リンカー	GGGGSGG	12
15-アミノ酸リンカー	3xG ₄ S (すなわち、GGGGSGGGGSGGGGS)	13
30-アミノ酸リンカー	6xG ₄ S (すなわち、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)	14

【 0 4 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

表 2-試験構築物及び対照構築物の構成要素の配列		
説明	アミノ酸配列	配列番号
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ノブ IgG2 ベースのヒンジ領域 及び IgG1 CH2 及びノブ 変異 T366W を有する CH3 を有する、バリアン ト hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	15
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ノブ_スター IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ノブ変異 T366W 及びス ター変異 H435R、Y436F を有する CH3 を有する、 バリエーション hIgG1 ヒンジ 及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQ KSLSLSPGK	17
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ノ ブ_Cys IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ノブ変異 T366W 及び Cys 変異 S354C を有する CH3 を有する、バリエーション hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	19
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ノ ブ_Cys_スター IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ノブ変異 T366W、Cys 変 異 S354C 変異及びスター 変異 H435R、Y436F を有 する CH3 を有する、バリエ ーション hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYT QKSLSLSPGK	21

【 0 4 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

表 2-試験構築物及び対照構築物の構成要素の配列		
説明	アミノ酸配列	配列番号
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ホール IgG2 ベースのヒンジ領域 及び IgG1 CH2 及びホー ル変異 T366S、L368A、 Y407V を有する CH3 を 有する、バリエーション hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	16
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ホール_スター IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ホール変異 T366S、 L368A、Y407V 及びスタ ー変異 H435R、Y436F を 有する CH3 を有する、バ リエーション hIgG1 ヒンジ及 び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQ KSLSLSPGK	18
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ホール_Cys IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ホール変異 T366S、 L368A、Y407V 及び Cys 変異 S354C を有する CH3 を有する、バリエーション hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	20
IgG1PVA_ヒンジ-Fc ホール_Cys_スター IgG2 ベースのヒンジ領域 並びに IgG1 CH2 並びに ホール変異 T366S、 L368A、Y407V、Cys 変 異 S354C 及びスター変異 H435R、Y436F を有する CH3 を有する、バリアン ト hIgG1 ヒンジ及び Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQ KSLSLSPGK	22

【0427】

試験構築物及び対照構築物は、以下の表 3 に示されるように、様々な二重特異性及び三
 重特異性結合分子を含み、表 3 は、本明細書に記載される研究を通して利用される様々な
 対照及び試験構築物の説明を提供する。ある特定の二重特異性抗体は、3つの抗原結合部
 位（そのうち、第 1 の部位は、F G F R 1 c に結合し、第 2 の部位は、K L B の G H 1 ド
 メインに結合し、第 3 の部位は、K L B の G H 2 ドメインに結合する）と、I g G F c
 ドメイン（例えば、I g G 1 P V A、I g G 1 N 1 8 0 G（E U 番号付けによる N 2
 9 7 G）、I g G 4、又は I g G 4 s）と、異なる長さのリンカーと、を含んだ。いくつ
 かの事例では、K L B の G H 2 ドメインに結合する抗原結合部位は、F a b 又は s c F v

であり、二重特異性抗体の第 1 のアーム上の F G F R 1 c に結合する F a b の N 末端に接続され、一方、K L B の G H 1 ドメインに結合する F a b は、二重特異性抗体の第 2 のアーム上に位置する。

【 0 4 2 8 】

【表 3 - 1】

表 3-対照及び試験抗体構築物の説明	
分子	説明
hIgG1 対照	IgG1 ヒンジ及び Fc (hIgG1 216-447; EU 番号付け)。
hIgG4 対照	IgG4 S108P ヒンジ及び Fc。
His hFGF21	6xHis タグ(配列番号 47)付きヒト FGF21。
AF1d、IgG1	代替形式抗体 hIgG1 ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF2d、IgG1	代替形式抗体。 hIgG1 ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1-7、IgG1 PVA	代替形式抗体 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、7 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1-15、IgG1 PVA	代替形式抗体 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、15 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。

【 0 4 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

表 3-対照及び試験抗体構築物の説明	
分子	説明
AF1-30、IgG1 PVA 又は AF1a、IgG1 PVA	代替形式抗体 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1-7、IgG4 S108P	代替形式抗体 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、7 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1-15、IgG4 S108P	代替形式抗体 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、15 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1-30、IgG4 S108P 又は AF1-b、IgG4 S108P	代替形式抗体 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF2a、IgG1 PVA	代替形式抗体。 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。

10

20

30

40

【 0 4 3 0 】

【表 3 - 3】

表 3-対照及び試験抗体構築物の説明	
分子	説明
AF2b、IgG4 S108P	代替形式抗体。 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF1c、IgG1 N180G	代替形式抗体 hIgG1 ヒンジ及び Fc N180G を含む。 抗体は、2+1 N-scFv 形式を有する。 scFv は、15 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、一方、他方の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF2c、IgG1 N180G	代替形式抗体。 hIgG1 ヒンジ及び Fc N180G を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、30 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF3a、IgG1 PVA	代替形式抗体。 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、15 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。
AF3b、IgG4 S108P	代替形式抗体。 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。 抗体は、2+1 N-Fab 形式を有する。 外部 Fab は、15 アミノ酸リンカーを介して内部 Fab に接続され、第 3 の Fab は、抗体の反対側のアーム上にある。

【 0 4 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

表 3-対照及び試験抗体構築物の説明	
分子	説明
AF4、IgG4s	代替形式抗体。 IgG4s ヒンジ及び Fc を含む。
AF5-a、IgG1 PVA	代替形式抗体。 hIgG1 PVA ヒンジ及び Fc を含む。
AF5-b、IgG4 S108P	代替形式抗体。 hIgG4 S108P ヒンジ及び Fc を含む。
mAb1、IgG1	IgG1 対照。
mAb2、IgG4 S108P	IgG4 S108P 対照。
mAb3、IgG4s	IgG4s 対照。

10

【0432】

20

8. 1. 2. ベクター構築

抗 K L B G H 1 F a b、抗 K L B G H 2 F a b、抗 K L B G H 2 s c F v、及び抗 F G F R 1 c F a b ドメインをコードする DNA 断片、様々なアミノ酸リンカー、並びに様々な I g G ヒンジ及び F c ドメインは、Integrated DNA Technologies, Inc. (San Diego, California) 又は Geneart / Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany) によって合成された。

【0433】

個々のポリペプチド鎖のための哺乳動物発現ベクターは、以下のアプローチのうちの 1 つによって作製した：NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit (New England Biolabs Inc.) を使用すること；制限消化、続いて New England Biolabs Inc. によって提供される標準的な分子クローニングプロトコルに従うライゲーションによって；又は p c D N A 3 . 4 T o p o 発現系 (Life Technologies) への即座に使用可能な構築物における DNA 合成及びクローニングによって。DNA を、製造業者のプロトコルに従って、単一のプラスミドとして、又は重鎖及び軽鎖対としてトランスフェクトした。50 ml の細胞培養上清を採取し、HiTrap (商標) Protein G HP、HiTrap Protein A FF、又は MabSelect SuRe pcc カラム (Cytiva) を介して精製のために処理した。

30

【0434】

ある特定の構築物を、一過性トランスフェクションによって Expi293F (商標) 細胞内で発現させた (Thermo Fisher Scientific)。Expi293F 上清中のタンパク質を、HiTrap (商標) Protein G HP 又は MabSelect SuRe pcc カラム (Cytiva) のいずれかを備えた、ProteinMaker システム (Protein BioSolutions, Gaithersburg, MD) を使用して精製した。単一ステップの溶出後、抗体を中和し、5% グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の最終緩衝液に透析し、等分し、-80℃ で保存した。一部の構築物については、HiPrep 26 / 60 Sephacryl S-200 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーの追加のステップを使用した。

40

50

【0435】

他の発現ベクターは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）発現系で安定的に発現させた。CHO安定発現からのこれらの抗体の精製は、上記の同様の手順に従った。

8.1.3. BiacoreによるFc受容体結合の動態測定

要約すると、表面プラズモン共鳴（SPR）実験を、カルボキシメチルデキストランコーティングされた（CM-5）チップを用いるBiacore T200機器上で25℃で実施した。標準的なアミンカップリング化学を使用して、マウスモノクローナル抗ペンタヒスチジン抗体（GE Healthcare）をCM-5センサーチップの表面上に固定した。Hisタグ付けされたヒト、サル又はマウスのFcγRタンパク質の140RU-376RUを抗ペンタヒスチジンアミンカップリングCM-5チップ上に捕捉し、抗体のストック溶液を捕捉されたタンパク質上に50μl/分で2分間注入し、連続的に希釈した（6μM～24.7nM）。mAb結合応答を監視し、低親和性受容体について、定常状態結合平衡を計算した。Scrubber 2.0曲線適合ソフトウェアを使用してデータを処理し、1:1結合モデルへあてはめることによって、動的会合（ka）及び解離（kd）速度定数を決定した。結合解離平衡定数（KD）及び解離半減期（t1/2）を、動的速度定数から以下のように計算した：KD（M）=kd/ka及びt1/2（分）=（ln2/（60*kd））。いくつかのKDを、定常平衡解離定数を使用して導出し、NB=結合が観察されなかった、IC=低特異的RUシグナルによる不確定な親和性決定。

【0436】

8.1.4. 酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）

マイクロタイタープレートのウェルを、100μlのPBS中の4μg/mlの6x-Hisタグ（配列番号47）モノクローナル抗体（4E3D10H2/E3）（Thermoscientific）でコーティングし（18時間、4℃）、次いでブロッキング緩衝液（PBS中の2%BSA）で室温で1時間ブロッキングした。異なるFc受容体（2μg/ml、100μl/ウェル）を複製物に充填し、室温で1時間インキュベートした。一方、抗体をブロック緩衝液中の6.0×10⁻⁶Mの開始濃度から1:5の比で希釈した。次いで、希釈した抗体（100μl）をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG、F(ab')₂検出抗体100μl/ウェル（ブロッキング緩衝液中1:5000）を室温で1時間添加し、100μlのペルオキシダーゼ基質（KPL-TMB）を30分間添加することによって反応を視覚化した。反応を100μlのTMB停止緩衝液で停止し、ELISAプレートリーダー（Envision、PerkinElmer）を使用して450nmで吸光度を測定した。プレートを、各ステップの後、洗浄緩衝液（PBS、pH7.4、0.05%（v/v）のTween20を含有）で3回洗浄した。

【0437】

8.1.5. サロゲートADCCアッセイ

8.1.5.1. 標的細胞

HEK293/hFGFR1c/hKLB/hCD20：内因性FGFR1がCRISPR-Cas9によって切除されたHEK293細胞を、完全長ヒトCD20（hCD20、受託番号NP_690605.1のアミノ酸M1～P297）、FGFR1c（hFGFR1c、受託番号NP_075594のアミノ酸M1～R731）、及びKLB（hKLB、受託番号NP_783864.1のアミノ酸M1～S1044）を構成的に発現させるように操作した。細胞を、全ての受容体の高発現について分類した。

【0438】

8.1.5.2. レポーター細胞

Jurkat/NFAT-Luc/FcγR3a 176Val：Jurkat T細胞を、高親和性ヒトFcγR3a 176Valアロタイプ受容体（受託番号P08637 VAR_003960のアミノ酸M1～K254）とともに、Nuclear Factor of Activated T細胞（NFAT）ルシフェラーゼレポーター構

築物を安定的に発現させるように操作した。

【0439】

8.1.5.3. アッセイ設定

実験の3日前に、Jurkatレポーター細胞を、RPMI1640+10%FBS+P/S/G+0.5μg/mlのピューロマイシン+500μg/mlのG418成長培地中で 1.25×10^5 細胞/mlに分割した。実験日に、標的細胞及びレポーター細胞をアッセイ培地(RPMI+10%FBS+P/S/G)に移し、1:1の比(各細胞型: 3×10^4 /ウェル)で96ウェルの白色マイクロタイタープレートに添加した。多重特異性抗FGFR1c/KLB抗体及びhIgG4 S108Pアイソタイプ対照抗体を、73.2pM~300nMの最終濃度の範囲で7点、1:4連続希釈で滴定し、最後の8番目の点には抗体を含有させず、二重で細胞に添加した。プレートを37℃/5%CO₂で4.6時間インキュベートした後、等体積のONE-Glo(商標)(Promega)試薬を添加して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を検出した。放出された光は、マルチラベルプレートリーダーEnvision(PerkinElmer)上の相対光単位(RLU)で捕捉された。抗体のEC50値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して、8点用量応答曲線上の4パラメータロジスティック方程式(バックグラウンドシグナルを含む)から決定した。最大倍率誘導は、次の方程式を使用して計算した。

倍率誘導 = 各抗体の試験用量範囲内の最大平均RLU / 平均RLU (バックグラウンドシグナル = 抗体なし)

8.1.6. 安定した発現及び抗体価

様々なIgGサブクラスを有する異なる抗体をコードする組換えタンパク質を、発現プラスミドにクローニングし、CHO細胞にトランスフェクトし、400mg/Lのヒグロマイシンで12~14日間選択した後、安定的にトランスフェクトしたプールを単離した。懸濁液中で化学的に定義されたタンパク質を含まない培地中で増殖させた安定なCHO細胞プールを使用して、試験用のタンパク質を産生した。

【0440】

タンパク質は、0.5mg/Lのドキシサイクリンで5日間細胞培養を誘導し、条件培地を採取することによって産生された。タンパク質力価は、様々な濃度の既知の標準に対してタンパク質Aセンサーを使用して、Octet機器(ForteBio)で決定した。

【0441】

8.1.7. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

異なるIgGヒンジ及びFcドメインを含む抗体は、血清応答要素(SRE)を含有するプロモーターの制御下で、ヒトFGFR1c及びKLB、並びにルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定して発現したHEK293.SREluc.hFGFR1c/hKLB細胞を使用してそれらのアゴニスト活性について試験した。6xHisタグ(配列番号47)を有する組換えヒトFGF21を陽性対照として使用し、FGF21から得られた最大レポーター活性を100%活性として定義した。細胞を、6xHis-FGF21(配列番号47として開示された「HHHHHHH」)で6時間処理し、次いでルシフェラーゼアッセイに供した。個々の抗体によって誘導された活性パーセントを、FGF21による最大活性に対して正規化した。EC50を決定するために用量-応答アッセイを実施した。抗FeLD1アイソタイプ(hIgG4-S108P)対照抗体を陰性対照として使用した。

【0442】

8.1.8. ヒト初代脂肪細胞シグナル伝達アッセイ

皮下前脂肪細胞から分化したヒト初代脂肪細胞は、Zen-Bio Inc(Durham, NC)から得た。細胞を、無血清培地中で4時間培養し、次いで、逐次希釈した抗体で15分間処理した。細胞を、処理された細胞溶解物(PerkinElmer, Shelton, CT)中のホスホERKを測定するAlphaScreen(商標)Sur

eFire (商標) ERKアッセイキット用の溶解緩衝液を使用して溶解した。SureFire (商標) ERKアッセイは、製造業者のプロトコルに従って実施した。Hisタグ付きヒトFGF21及びアイソタイプ対照ヒトIgG4抗体を、それぞれ、陽性対照及び陰性対照として試験した。FGFR1c/KLB二重特異性抗体もまた、実験に含めた。

【0443】

8.1.9. フロー結合アッセイ

標的プロテインXを過剰発現するBaF3細胞を、 1×10^6 細胞/mLでFACS洗浄緩衝液(1%FBSを含むPBS)中に再懸濁した。染色は、1ウェル当たり 1×10^5 細胞で実施した。抗体を 1.3×10^{-7} Mの開始濃度から1:5の比で希釈した。次いで、希釈した抗体を細胞を含有するウェルに添加した。細胞を2~8℃で30分間染色し、FACS洗浄緩衝液で2回洗浄した。AF647コンジュゲートヤギ抗hFc Fab(Jackson Immuno Research、109-607-008、1:400)をウェルに添加し、2~8℃で30分間細胞をインキュベートした。次に、細胞を洗浄して余分な抗体を除去し、2%のパラホルムアルデヒド中で2~8℃で30分間固定した。2回洗浄した後、BD LSR Fortessa (商標) FACS機器を使用して、染色細胞を分析した。結果をFlowJoによって分析した。FSC/SSCゲートを使用して、単核細胞を選択した。

【0444】

8.1.10. 陰性染色電子顕微鏡法(EM)

異なるヒンジ配列(IgG1、IgG1-PVA、及びIgG2)を含有する抗CD40抗体を有するC末端myc-myc-6xHisタグ付きCD40エクトドメイン(残基(res.)20~193)の複合体を、Superdex 200インクリーズ(increease)10/300カラムを使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって単離した。約0.02mg/mLのタンパク質濃度で精製された試料を400メッシュの炭素フィルムCuグリッド(Electron Microscopy Sciences)に適用し、NanoW(Nanoprobes)又はVitroease Methylamine Tungstate(Thermo Fisher)で陰性染色した。

【0445】

陰性染色EMグリッドをGlacios TEM(Thermo Fisher)に挿入し、CETAカメラ(Thermo Fisher)で撮像した。EPUを使用して、73,000倍の公称倍率で自動データ収集を実施した。EMデータは、RELION 4.0を使用して処理した。粒子を最初に、Laplacian of Gaussianアルゴリズムを使用してピッキングして、2Dテンプレートを生成し、その後、これをテンプレートベースの粒子ピッキングに使用した。粒子画像を、複数ラウンドの2D分類に供し、各ラウンド後に、IgGの明確な特徴を有するクラス平均に属する粒子を選択した。結合したCD40の拡散密度は、そうでなければFc領域からの際立った特徴を欠く2つのFabアームの割り当てを可能にした。各々がCD40に結合した2つのFabの識別可能な特徴を有するクラス平均を、Fab-Fab角度決定のために選択した。Fab-Fab角度は、ImageJの角度ツールを使用して手動で測定され、2つのCD40結合Fabアームの長軸を通して描かれる線間の角度である。

【0446】

8.2. 実施例1: IgG1 PVAの設計、クローニング、及び発現

8.2.1. 概要

IgG1Fc及びIgG4Fcは、異なるFcγ受容体結合能及び電荷分布を有し、これは、Fab、scFv、及び代替形式抗体融合タンパク質などの抗体構築ブロックとの最適なFc機能関与及び様々な適合性のための選択肢を提供する。IgG1及びIgG4のヒンジ領域も、異なる長さ及び柔軟性を有する。IgG4(S108P、又はS228P、EU番号付け)は、Fcエフェクター機能の低減が必要とされる、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、及びイキセキズマブなどの複数の承認された抗体製品で利用されている。

特定の免疫グロブリンサブクラスに対する抗体構築ブロック（例えば、F a b、s c F v）の好みのために、F c ガンマ受容体結合の低減及びF c 受容体エフェクター機能の低減を実証する、I g G 4（S 1 0 8 P）とは異なるヒトI g G 1 F c ベースの代替及び天然配列バリエーションが求められた。

【0447】

図4は、様々な野生型と改変ヒトI g G 1及びI g G 4ヒンジ領域との間の配列を有する様々なI g G ヒンジ／F c バリエーションのアラインメント、並びにアミノ酸226から447（EU番号付け）までの、使用されるC H 2及びC H 3 F c 領域の説明を示す。h I g G 1 P V Aは、そうでなければ完全にI g G 1バックグラウンド（例えば、I g G 1上部ヒンジ、C H 2、及びC H 3領域）の下部ヒンジ領域におけるP V A変異を含むように設計した。

10

【0448】

h I g G 1 P V Aの特性を試験するために、h I g G 1 P V Aを、2 + 1 N - s c F v又は2 + 1 N - F a b形式のいずれかを有する代替形式抗体に組み込んだ（2 + 1 N - s c F v形式の例解については、例えば、図5を参照されたい；2 + 1 N - F a b形式では、N末端s c F vドメインをF a bドメインに置き換える）。

【0449】

8.2.2. 結果

様々なI g G ヒンジ及びF c ドメインを組み込んだ対照及び二重特異性抗体を首尾よく発現させ、精製した。

20

【0450】

C H O細胞で発現された場合、s c F vとF a bとの間の様々なリンカー長を有するI g G 1 P V A骨格中のA F 1構築物は、I g G 4 S 1 0 8 Pを含む構築物よりも高い抗体価（総抗体種として測定された）を有した（図5）。

【0451】

8.3. 実施例2：F c ガンマ受容体の結合動態

8.3.1. 概要

異なるヒンジF c領域を有する様々な抗体のF c ガンマ受容体への結合親和性及びシグナルを、セクション8.1.3に記載されるように、B i a c o r eによって測定した。

【0452】

30

8.3.1.1. 結果

結果を以下の表4及び5に示す。

【0453】

40

50

【表 4】

表 4								
様々な Fc バリエントを有する抗体のヒト Fc γ R 結合への結合シグナル								
	FcR 捕捉 (RU)	615.9 $\pm$ 0.8	164.4 $\pm$ 0.4	364.4 $\pm$ 0.6	378.2 $\pm$ 1	208 $\pm$ 1.7	899 $\pm$ 2.7	548 $\pm$ 2.4
抗体	Fc バリエント	ヒト Fc γ RI	ヒト Fc γ RIIa (R131)	ヒト Fc γ RIIa (H131)	ヒト Fc γ RIIb	ヒト Fc γ RIIIa (F176)	ヒト Fc γ RIIIa (V176)	ヒト Fc γ RIIIb
mAb1	hIgG1	1606	457	614	833	322	2228	1028
mAb2	hIgG4 S108P	1475	181	393	737	28	429	-2
mAb3	hIgG4s	36	340	419	226	6	34	-8
AF2a	hIgG1 PVA	6	91	21	-1	4	144	-5
AF2c	hIgG1 N180G	518	-5	-9	-9	-5	-11	-7

10

20

【 0 4 5 4 】

30

40

50

【表 5】

表 5								
高及び低親和性 Fcγ R 結合の KD(M)値								
抗体	Fc バリエーション	ヒト FcγRI	ヒト FcγRIIa (R131)	ヒト FcγRIIa (H131)	ヒト FcγRIIb	ヒト FcγRIIIa (F176)	ヒト FcγRIIIa (V176)	ヒト FcγRIIIb
mAb1	hIgG1	1.76E-09	3.40E-07	3.40E-07	5.40E-07	1.02E-06	6.20E-07	1.02E-06
mAb2	hIgG4 S108P	5.35E-09	5.70E-06	1.50E-06	7.20E-07	WB	4.90E-06	NB
mAb3	hIgG4s	NB	1.32E-06	1.61E-06	1.23E-05	NB	WB	NB
AF2a	hIgG1 PVA	NB	WB	WB	NB	NB	7.20E-05	NB
AF2c	hIgG1 N180G	2.21E-06	NB	NB	NB	NB	NB	NB

10

20

【0455】

30

表 5 において、NB は、結合なしを指し、WB は、弱い結合を指す

I g G 1 P V A は、F c γ R 1、F c γ R 2 b、F c γ R 3 a (F 1 7 6)、F c γ R 3 b に結合シグナルを有しない。F c γ R 2 a (R 1 3 1 及び H 1 3 1 の両方) に対する結合シグナルは低い、I g G 1 及び I g G 4 S 1 0 8 P と比較して著しく低下したレベル (それぞれ 9 1 及び 2 1 R U) である。I g G 1 P V A は、K D = 7 . 2 × 1 0 − 0 5 M で、F c γ R 3 a (V 1 7 6) への弱〜中程度の結合シグナル (1 4 4 R U) を有し、個のシグナルは、I g G 1 及び I g G 4 S 1 0 8 P の結合シグナルよりもはるかに弱い (表 4 及び 5) 。

【0456】

40

8. 4. 実施例 3 : F c ガンマ受容体への E L I S A 結合

8. 4. 1. 概要

様々な I g G ヒンジ及び F c 領域を含む F G F R 1 c / K L B 二重特異性抗体の結合を、セクション 5. 1. 4 に記載されるように、E L I S A によって評価した。

【0457】

8. 4. 2. 結果

様々な F c ガンマ受容体に結合する対照及び試験抗体の能力を示す結合曲線が、図 6 A ~ 6 G に描画される。野生型 I g G 1 ヒンジ及び F c ドメインを保有する抗体は、h F C R γ 1 への最高の結合を実証した。h F C R γ 1 の結合は、I g G 1 P V A で著しく減少し、I g G 4 s への同様の結合を示した (図 6 A) 。I g G 1 N 1 8 0 G との結合も同様に低減した。I g G 4 S 1 0 8 P は、野生型 I g G 1 と比べて、h F C R γ 1 への

50

結合がわずかに低減したことを実証した。hFCRγ3A (V158) 及び hFCRγ3A (F158) の結合において同様の傾向が観察された (図6E、6F)。hFCRγ2A (H131)、hFCRγ2A (R131) では、結合のごくわずかな差が観察された (図6B及び6C)。しかしながら、IgG1 PVAは、hFCRγ2Bにおいて、IgG4 S108Pよりも結合が弱く、IgG1よりもわずかに弱い (図6D)。hFCRγ3Bにおいて、IgG1 PVAは、IgG1よりも結合が少ない (図6G)。

【0458】

8.5. 実施例4：抗体依存性細胞傷害

8.5.1. 概要

セクション8.1.5に記載の代用抗体依存性細胞傷害 (ADCC) アッセイを利用して、IgG1 PVAの細胞傷害活性を決定し、他のIgGバリエーション (例えば、IgG1 N180G及びIgG4 S108P) の細胞傷害活性と比較した。

10

【0459】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を誘導するNK細胞上に顕著に発現するFcγR3aと相互作用するhFGFR1c及びhKLBを標的とする多重特異性抗体の能力を、レポーター細胞及び抗体に結合した標的細胞を使用してサロゲートバイオアッセイにおいて測定した。このアッセイでは、操作されたJurkat T細胞は、高親和性ヒトFcγR3a 176Valアロタイプ受容体 (Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a^{176Val}) とともに、転写因子NFAT (NFAT-Luc) の制御下で、レポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現する。標的細胞は、完全長ヒトFGFR1c及びヒトKLBと組み合わせてヒトCD20を発現するように操作されたHEK293細胞である。レポーター細胞を標的細胞とインキュベートし、標的細胞に結合したヒトIgG1抗体のFcドメインを介するFcγR3aの係合は、レポーター細胞における転写因子NFATの活性化につながり、ルシフェラーゼの発現を駆動し、ルシフェラーゼは次いで発光読み出しによって測定される。

20

【0460】

8.5.2. 結果

ADCCアッセイからの代表的なデータを図7及び8に描画する。野生型IgG1、AF1d IgG1及びAF2d IgG1を有する代替形式抗体のみが、それぞれ1.9倍 (EC50=307pM) 及び3.4倍 (EC50=1.04nM) のルシフェラーゼシグナルの誘導を示した。IgG1 PVA、IgG1 N180G、又はIgG4 S108Pを有する2+1 N-scfv又は2+1 N-Fab形式の代替形式抗体のいずれも、サロゲートADCCアッセイで活性を示さなかった。

30

【0461】

8.6. 実施例5：分子活性

8.6.1. 概要

セクション6.1.7及び8.1.8に記載のルシフェラーゼレポーターアッセイ及びヒト一次脂肪細胞シグナル伝達アッセイを使用して、IgG1 PVA及び対照を含むFGFR1c/KLB二重特異性抗体の活性を試験した。

【0462】

40

8.6.2. 結果

HEK.293SRELuc.hFGFR1c/hKLBにおける代替形式抗体の活性を、図9 (2+1 N-scfv、AF1a、1b) 及び図10 (2+1 N-Fab、AF2a、2b、3a、3b) に示す。ヒト脂肪細胞における活性を図11に示す (AF1a、1b、3a、3b)。HEK.FGFR1c/KLB細胞 (図9) 及びヒト脂肪細胞 (図11) の両方において、IgG1 PVA (AF1a) を組み込んだ2+1 N-scfv形式を有する抗体は、IgG4 S108P (AF1b) を有する抗体よりも優れたアゴニスト活性を示した。抗体AF2a (IgG1 PVAにおける2+1 N-Fab形式) は、レポーター細胞アッセイにおいて、AF2b (IgG4 S108Pと同じ抗体) よりも大きい最大活性化をもたらした (図10)。

50

【0463】

8.7. 実施例6：標的細胞結合

8.7.1. 概要

プロテインXに結合する4つの抗原結合ドメインを有する多重特異性四価抗体であるAF5-a及びAF5-bを、セクション8.1.1及び8.1.2に記載されるように設計及び製造し、AF5-a及びAF5-bは、それぞれ、ヒトIgG1 PVA又はIgG4 S108P骨格のいずれかに連結された同じセットの抗原結合アームを含むように設計された。セクション8.1.9に記載のフロー結合アッセイを使用して、AF5-a、AF5-b、及び非結合アイソタイプ対照抗体の結合特性を評価した。

【0464】

8.7.2. 結果

予想どおり、アイソタイプ対照抗体は、結合親和性を示さなかった。対照的に、AF5-a及びAF5-bの両方が、プロテインX過剰発現細胞への結合を示した。より具体的には、AF5-aは、AF5-bよりも高い最大MFIシグナルを有し（図12）、これは、IgG1 PVA骨格が、IgG4 S108P骨格よりも高い有効性と関連付けられたことを示す。

【0465】

8.8. 実施例7：3つの異なるヒンジ配列に関連するFab-Fab角度

8.8.1. 概要

異なるIgGヒンジ配列に結合したCD40結合抗CD40IgG抗体のFab-fab角度を、セクション8.1.10に記載されるように計算した。

【0466】

8.8.2. 結果

3つのIgG-CD40複合体を評価した：IgG1-CD40複合体、IgG1-PVA-CD40複合体、及びIgG2-CD40複合体。IgG1-CD40、IgG1-PVA-CD40、及びIgG2-CD40について、それぞれ、2D分類における粒子の約35%、35%、及び11%が、IgG様特徴を有したが、Fabアーム同定における曖昧さのために、Fab-Fab角度を割り当てられなかった。図13C~Eに示される2D分類実行について、ごく少数の粒子（すなわち、2%未満）のみが、IgG様特徴を欠く「ジャンク」2Dクラスに分類された。

【0467】

2Dクラス平均及び粒子集団パーセンテージから決定したFab-Fab角度を表6に記載する。

【0468】

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6			
IgG-CD40 複合体	図示	Fab-Fab 角度	粒子集団%
IgG1-CD40	図 13C: i1	61°	16
IgG1-CD40	図 13C: i2	210°	10
IgG1-CD40	図 13C: i5	84°	5
IgG1-CD40	図 13C: i6	103°	5
IgG1-CD40	図 13C: ii1	175°	5
IgG1-CD40	図 13C: ii2	61°	4
IgG1-CD40	図 13C: ii4	73°	3
IgG1-CD40	図 13C: ii5	109°	3
IgG1-CD40	図 13C: iii1	210°	3
IgG1-CD40	図 13C: iii3	126°	3
IgG1-CD40	図 13C: iii4	58°	2
IgG1-CD40	図 13C: iv2	75°	2
IgG1-CD40	図 13C: iv3	135°	1
IgG1-CD40	図 13C: v3	178°	1
IgG1-CD40	図 13C: iv5	103°	1
IgG1-PVA-CD40	図 13D: i1	65°	22
IgG1-PVA-CD40	図 13D: i3	177°	6
IgG1-PVA-CD40	図 13D: i4	164°	6
IgG1-PVA-CD40	図 13D: i5	53°	6
IgG1-PVA-CD40	図 13D: i6	207°	6
IgG1-PVA-CD40	図 13D: ii3	50°	4
IgG1-PVA-CD40	図 13D: ii5	231°	3
IgG1-PVA-CD40	図 13D: ii6	69°	3
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iii4	56°	2
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iii5	58°	2
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iv3	61°	1
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iv4	62°	1
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iv5	158°	1
IgG1-PVA-CD40	図 13D: iv6	138°	1
IgG2-CD40	図 13E: i1	93°	17
IgG2-CD40	図 13E: i2	82°	11
IgG2-CD40	図 13E: i3	94°	7
IgG2-CD40	図 13E: i4	88°	7
IgG2-CD40	図 13E: i5	86°	6
IgG2-CD40	図 13E: i6	87°	6
IgG2-CD40	図 13E: ii1	86°	6
IgG2-CD40	図 13E: ii2	218°	5

10

20

30

40

【 0 4 6 9 】

【表 6－2】

表 6			
IgG2-CD40	☒ 13E: ii3	105°	4
IgG2-CD40	☒ 13E: ii4	155°	4
IgG2-CD40	☒ 13E: ii5	81°	4
IgG2-CD40	☒ 13E: ii6	219°	3
IgG2-CD40	☒ 13E: iii1	93°	3
IgG2-CD40	☒ 13E: iii2	89°	3
IgG2-CD40	☒ 13E: iii3	111°	2

10

【 0 4 7 0 】

理論によって拘束されることなく、IgG1－PVA－Fcドメインは、標的結合に好適Fab－Fab角度で抗体調製物中の分子のパーセンテージを増加させることによって、抗体調製物の増加した標的結合をもたらすと考えられる。

【 0 4 7 1 】

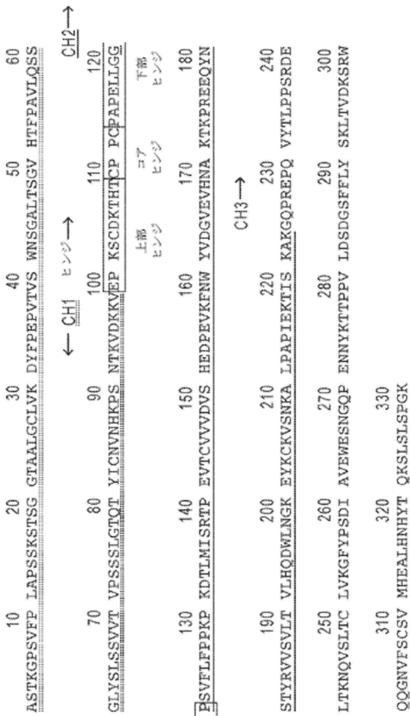
9．参考文献の引用

本出願で引用される全ての刊行物、特許、特許出願、及び他の文書は、各個々の刊行物、特許、特許出願、又は他の文書が、全ての目的のために参照により組み込まれることが個別に示されているのと同じ程度に、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に組み込まれる参照のうちの1つ以上の教示と本開示との間に矛盾がある場合には、本明細書の教示が意図される。

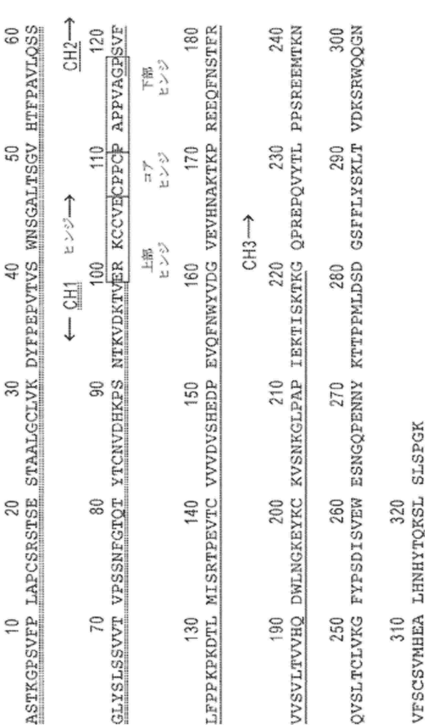
20

【図面】

【図 1】



【図 2】

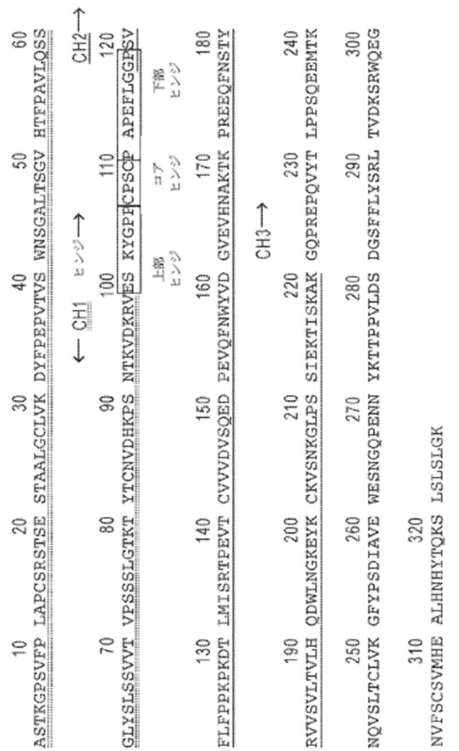


30

40

50

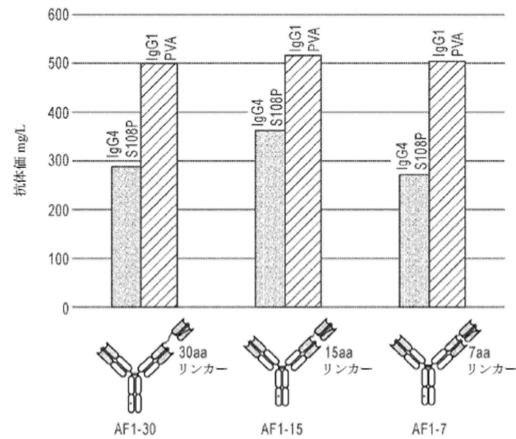
【図 3】



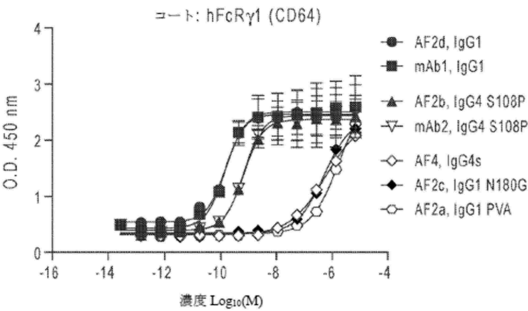
【図 4】

	上部ヒンジ	コアヒンジ	下部ヒンジ										CH2	CH3
構築物	216-225 (IgG1)		622	822	1022	1222	1422	1622	1822	2022	2222	2422	CH2	CH3
hIgG1 PVA	EPKSCDKTHT	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG1	IgG1
hIgG1s	EPKSCDKTHT	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG1	IgG1
hIgG1	EPKSCDKTHT	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG1	IgG1
hIgG2	ERK CCVE	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG2	IgG2
hIgG4 S108P	ESKYGPP	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG4	IgG4
hIgG4s	ESKYGPP	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	IgG4	IgG4

【図 5】



【図 6 A】



10

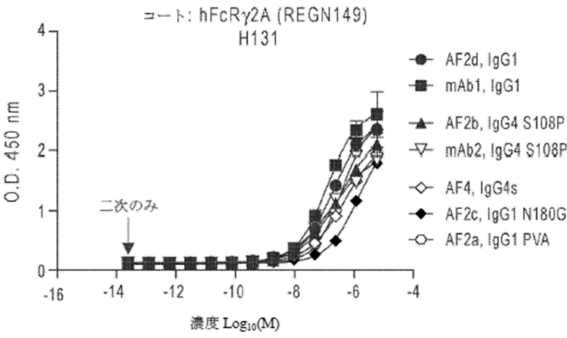
20

30

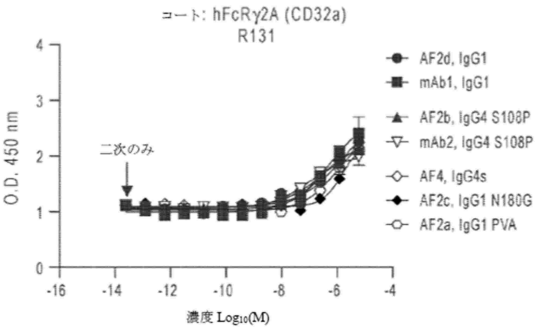
40

50

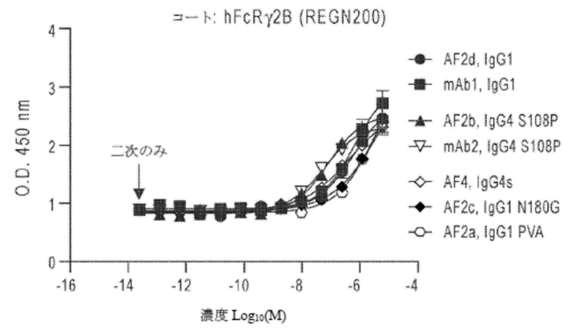
【図 6 B】



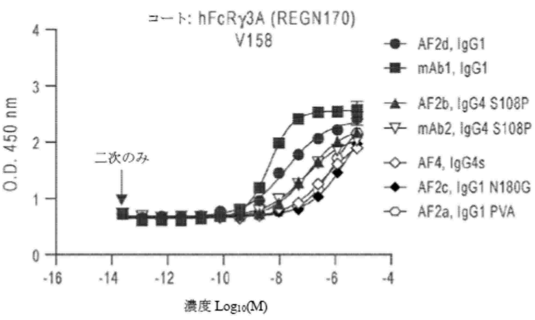
【図 6 C】



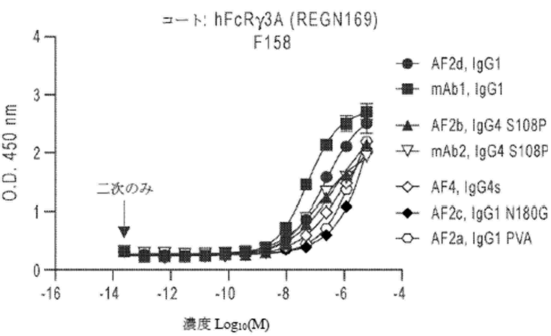
【図 6 D】



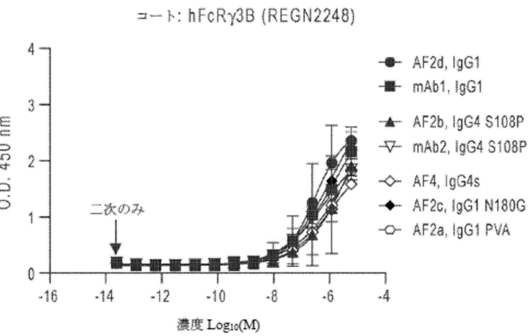
【図 6 E】



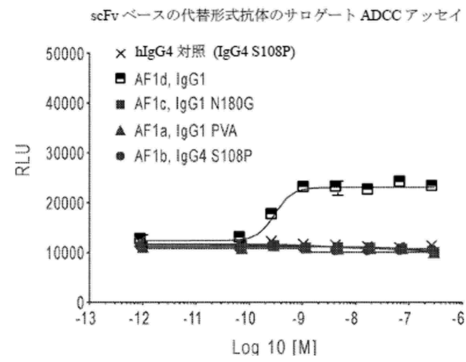
【図 6 F】



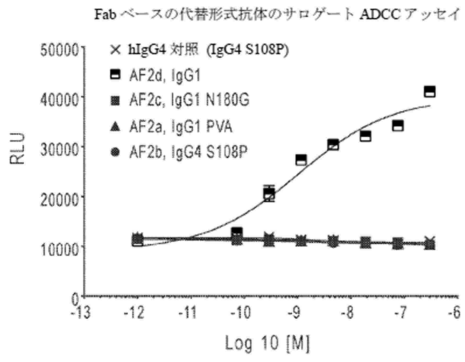
【図 6 G】



【図 7】

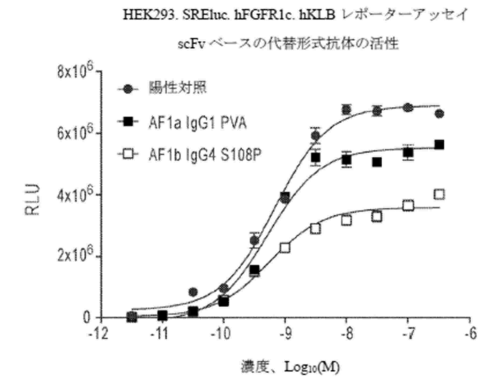


【図 8】

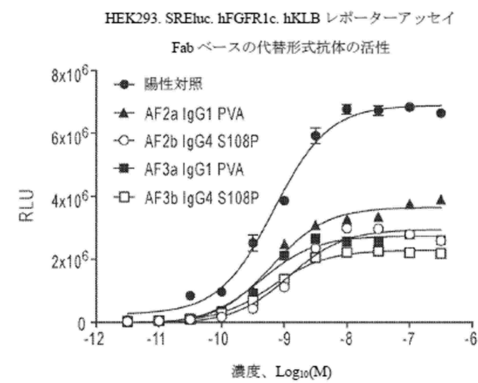


10

【図 9】



【図 10】



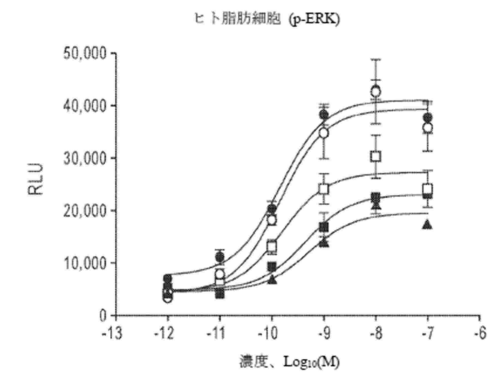
20

30

40

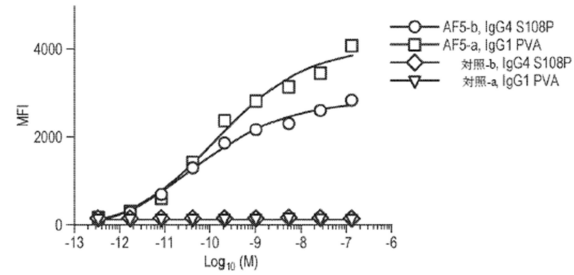
50

【図 1 1】



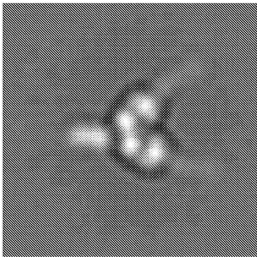
	EC50 (M)	FGF21 の活性%
● His.hFGF21	1.4E-10	100.0
○ AF1a, IgG1 PVA	1.4E-10	95.2
■ AF3a, IgG1 PVA	4.3E-10	50.7
□ AF1b, IgG4 S108P	1.6E-10	62.2
▲ AF3b, IgG4 S108P	5.1E-10	41.1

【図 1 2】

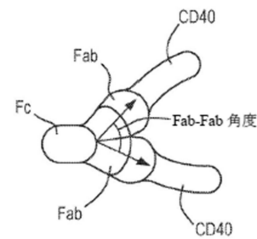


10

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



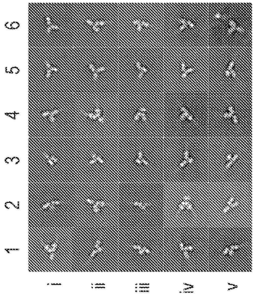
20

30

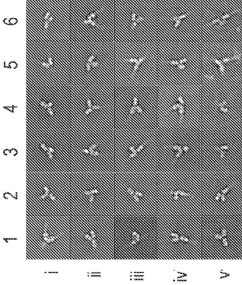
40

50

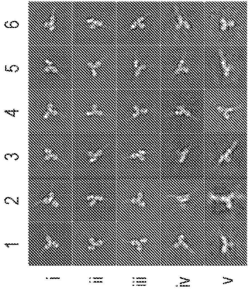
【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



【図 1 3 E】



【配列表】

2025514763000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2023/066036
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. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.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:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
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)
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, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/150266 A1 (TAVOTEK BIOTHERAPEUTICS HONG KONG LTD [CN]) 29 July 2021 (2021-07-29)	1, 4-6, 11-13, 18-20, 29, 32, 34-50
Y	the whole document in particular, pages 29-30 and SEQ ID NO:28	2, 3, 7-10, 14-17, 21-28, 30, 31, 33
Y	----- WO 2014/121087 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 7 August 2014 (2014-08-07) cited in the application the whole document in particular, pages 3-5 and 39-41 ----- -/-	2, 3, 7-10, 14-17, 21-28, 30, 31, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

26 July 2023

Date of mailing of the international search report

04/08/2023

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

Authorized officer

Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066036

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. KINDER ET AL: "Engineered Protease-resistant Antibodies with Selectable Cell-killing Functions", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 288, no. 43, 25 October 2013 (2013-10-25), pages 30843-30854, XP055165750, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.486142 the whole document in particular, page 30846 -----	2,3, 7-10, 14-17, 21-28, 30,31,33
Y	WO 2012/087746 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]; STROHL WILLIAM [US] ET AL.) 28 June 2012 (2012-06-28) the whole document in particular, page 13 and SEQ ID NO:7 -----	2,3, 7-10, 14-17, 21-28, 30,31,33
Y	WO 2021/091953 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 14 May 2021 (2021-05-14) the whole document in particular, pages 18-20, 26-28, 30 and 47-51 -----	7-10, 14-17, 21-28, 30,31,33
Y	US 2010/322934 A1 (IMHOFF-JUNG SABINE [DE] ET AL) 23 December 2010 (2010-12-23) the whole document in particular, paragraphs 50 and 84 -----	7-10, 14-17, 21-28
Y	US 2010/331527 A1 (DAVIS SAMUEL [US] ET AL) 30 December 2010 (2010-12-30) the whole document in particular, page 7 and example 8 -----	7-10, 14-17, 21-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/066036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021150266 A1	29-07-2021	CN 115551538 A	30-12-2022
		EP 4093430 A1	30-11-2022
		JP 2023511236 A	16-03-2023
		US 2023068783 A1	02-03-2023
		WO 2021150266 A1	29-07-2021
WO 2014121087 A1	07-08-2014	AR 095115 A1	30-09-2015
		AU 2014212148 A1	20-08-2015
		AU 2019200764 A1	21-02-2019
		BR 112015017778 A2	21-11-2017
		CA 2899457 A1	07-08-2014
		CN 104955844 A	30-09-2015
		DK 2951207 T3	05-11-2018
		EA 201591407 A1	30-12-2015
		EP 2951207 A1	09-12-2015
		EP 3406634 A1	28-11-2018
		ES 2687866 T3	29-10-2018
		HK 1217955 A1	27-01-2017
		HU E040415 T2	28-03-2019
		JP 6422445 B2	14-11-2018
		JP 6687702 B2	28-04-2020
		JP 6895558 B2	30-06-2021
		JP 2016507525 A	10-03-2016
		JP 2019031529 A	28-02-2019
		JP 2020114242 A	30-07-2020
		KR 20150110571 A	02-10-2015
		MX 360746 B	15-11-2018
		MY 176294 A	27-07-2020
		MY 189467 A	15-02-2022
		NZ 710598 A	28-08-2020
		PL 2951207 T3	31-12-2018
		SG 10201706226Q A	30-08-2017
		SG 11201505072R A	30-07-2015
		TW 201514206 A	16-04-2015
		TW 201835108 A	01-10-2018
		US 2014243504 A1	28-08-2014
		US 2016347839 A1	01-12-2016
		US 2018371090 A1	27-12-2018
		US 2021246207 A1	12-08-2021
		WO 2014121087 A1	07-08-2014
		ZA 201504697 B	27-07-2016
WO 2012087746 A1	28-06-2012	AU 2011349719 A1	04-07-2013
		BR 112013018317 A2	21-03-2017
		CA 2822366 A1	28-06-2012
		CN 103260640 A	21-08-2013
		CO 6741179 A2	30-08-2013
		CR 20130292 A	03-10-2013
		CY 1118923 T1	10-01-2018
		DK 2654780 T3	10-04-2017
		EA 201390958 A1	29-11-2013
		EC SP13012712 A	30-08-2013
		EP 2654780 A1	30-10-2013
		ES 2623912 T3	12-07-2017
		GT 201300167 A	26-09-2014
		HR P20170595 T1	16-06-2017
		HU E033205 T2	28-11-2017
		IL 226987 A	31-07-2017

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/066036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 6012624 B2	25-10-2016
		JP 2014504301 A	20-02-2014
		KR 20140003485 A	09-01-2014
		LT 2654780 T	27-03-2017
		MX 347077 B	10-04-2017
		MY 162489 A	15-06-2017
		NI 201300057 A	25-02-2014
		NZ 612379 A	31-10-2014
		PL 2654780 T3	31-07-2017
		PT 2654780 T	06-04-2017
		SG 191233 A1	31-07-2013
		US 2013011386 A1	10-01-2013
		US 2015139984 A1	21-05-2015
		WO 2012087746 A1	28-06-2012
		ZA 201305538 B	28-01-2015

WO 2021091953 A1	14-05-2021	AU 2020379735 A1	26-05-2022
		BR 112022008552 A2	09-08-2022
		CA 3157075 A1	14-05-2021
		CN 114786730 A	22-07-2022
		EP 4054646 A1	14-09-2022
		IL 292698 A	01-07-2022
		JP 2022553830 A	26-12-2022
		KR 20220093363 A	05-07-2022
		TW 202134277 A	16-09-2021
		US 2021130477 A1	06-05-2021
		US 2022251220 A1	11-08-2022
		WO 2021091953 A1	14-05-2021

US 2010322934 A1	23-12-2010	AR 077111 A1	03-08-2011
		AU 2010262130 A1	15-12-2011
		BR PI1010109 A2	15-03-2016
		CA 2764393 A1	23-12-2010
		CL 2011003149 A1	20-07-2012
		CN 102803295 A	28-11-2012
		EP 2443153 A1	25-04-2012
		ES 2442917 T3	14-02-2014
		HK 1174645 A1	14-06-2013
		JP 5689118 B2	25-03-2015
		JP 2012530089 A	29-11-2012
		KR 20120028382 A	22-03-2012
		PE 20120414 A1	04-05-2012
		RU 2012101485 A	27-07-2013
		SG 177272 A1	28-02-2012
		TW 201111394 A	01-04-2011
		US 2010322934 A1	23-12-2010
		US 2015044214 A1	12-02-2015
		WO 2010145793 A1	23-12-2010
		ZA 201108922 B	29-08-2012

US 2010331527 A1	30-12-2010	AU 2010265933 A1	19-01-2012
		AU 2015207952 A1	20-08-2015
		BR PI1015561 A2	13-10-2020
		CA 2766220 A1	29-12-2010
		CN 102471378 A	23-05-2012
		CN 103833855 A	04-06-2014
		DK 2975051 T3	26-04-2021
		EP 2445936 A1	02-05-2012

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/066036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2975051 A1	20-01-2016
		EP 3916011 A1	01-12-2021
		ES 2865648 T3	15-10-2021
		HK 1219283 A1	28-04-2017
		HR P20210637 T1	20-08-2021
		HU E054257 T2	30-08-2021
		IL 265732 A	30-05-2019
		JP 5816170 B2	18-11-2015
		JP 6247673 B2	13-12-2017
		JP 7153048 B2	13-10-2022
		JP 2012531439 A	10-12-2012
		JP 2015227386 A	17-12-2015
		JP 2018035193 A	08-03-2018
		JP 2021004261 A	14-01-2021
		JP 2022173489 A	18-11-2022
		KR 20120027055 A	20-03-2012
		KR 20140112569 A	23-09-2014
		KR 20160141879 A	09-12-2016
		KR 20180034638 A	04-04-2018
		KR 20180110190 A	08-10-2018
		LT 2975051 T	12-07-2021
		MX 342623 B	06-10-2016
		MX 368932 B	22-10-2019
		MY 152963 A	15-12-2014
		MY 164121 A	30-11-2017
		MY 192182 A	04-08-2022
		PL 2975051 T3	20-09-2021
		PT 2975051 T	04-05-2021
		RU 2012102602 A	10-08-2013
		RU 2014114172 A	20-10-2015
		RU 2015140911 A	30-03-2017
		SG 176868 A1	28-02-2012
		SI 2975051 T1	31-08-2021
		TW 201116625 A	16-05-2011
		US 2010331527 A1	30-12-2010
		US 2014248664 A1	04-09-2014
		US 2016251395 A1	01-09-2016
		US 2019031713 A1	31-01-2019
		US 2022024973 A1	27-01-2022
		US 2022389055 A1	08-12-2022
		WO 2010151792 A1	29-12-2010

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

,MC,ME,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,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,MG,MK,MN,MU,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 中村 美樹

- (72)発明者 アヴァル、ナガ スハシニ
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 デイビス、サミュエル
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 リン、チャーヤン
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内
- (72)発明者 シェン、ヤン
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA89X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25
CA44
4C085 AA14 BB11 BB36 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26