(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 4 月 10 日(10.04.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/054804 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/46 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/077172

(22) 国際出願日: 2013 年 10 月 4 日(04.10.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/710,221 2012 年 10 月 5 日(05.10.2012) US

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 丹羽 倫平(NIWA Rinpei); 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 土屋 摩珠(TSUCHIYA Mami); 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 村上 拓也(MURAKAMI Takuya); 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 手塚 雄太(TEZUKA Yuta); 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 濱田 百合子, 外(HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号 虎ノ門イーストビルディング１０階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2014/054804 A1

(54) **Title**: HETERODIMERIC PROTEIN COMPOSITION

(54) 発明の名称 : ヘテロダイマータンパク質組成物

(57) **Abstract**: The present invention can provide: a heterodimeric protein composition which is a protein comprising a first polypeptide containing an immunoglobulin heavy-chain constant region and a second polypeptide containing a CL-Fc fragment that is a fusion of an immunoglobulin light-chain constant region (CL) and an Fc region, wherein a Cys residue involved in the disulfide bond between the CL region and a CH1 region is deleted or substituted; a method for purifying the protein composition; a method for producing the protein composition; DNA encoding the protein composition; and a vector.

(57) 要約: 本発明によれば、イムノグロブリン重鎖定常領域を含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖定常領域（ＣＬ）とＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつＣＬとＣＨ１のジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質組成物、該タンパク質組成物の精製方法、該タンパク質組成物の製造方法、該タンパク質組成物をコードするＤＮＡおよびベクターを提供することができる。

明　細　書

発明の名称 ： ヘテロダイマータンパク質組成物

技術分野

[0001] 本発明は、効率的かつ安定に分離、精製されるヘテロダイマータンパク質組成物に関する。

背景技術

[0002] モノクローナル抗体は、抗原に対する高い結合親和性と特異性を有する生体高分子であり、分子標的治療薬として癌または免疫疾患などの治療に応用されている。治療用のモノクローナル抗体として広く用いられているイムノグロブリンＧ（以下、ＩｇＧと略記する）の作用機序は、抗原の中和作用、受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト作用、アポトーシス誘導作用、ファゴサイトーシス、補体またはエフェクター細胞依存的傷害活性の誘導、並びに化学療法剤、毒素および放射性同位体の輸送、などが知られている。

[0003] ＩｇＧ抗体は、２本の抗体重鎖（以下、Ｈ鎖と略記する）および２本の抗体軽鎖（以下、Ｌ鎖と略記する）からなるテトラマー分子であり、抗原結合部位である可変領域と一定のアミノ酸配列からなる定常領域を構成する（図１）。

[0004] 抗体の各構造に基いて、様々な機能に関与することが知られている。抗原結合部位は重鎖可変領域（以下、ＶＨと略記する）と軽鎖可変領域（以下、ＶＬと略記する）により形成されており、一次配列および高次構造の可変性により多様な抗原特異性と結合親和性をもたらす。

[0005] ＩｇＧＨ鎖の定常領域（以下、ＣＨと略記する）はＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３の各ドメインからなり、この内Ｆｃ領域（以下、単にＦｃとも記載する）はヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３からなる領域を指す。Ｆｃは、白血球細胞上のＦｃγ受容体（以下、ＦｃγＲと略記する）と結合して炎症性メディエーターの放出、貪食作用、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ＡＤＣＣと略記する）に関与すると共に、補体成分と結合することで補体依存性細胞傷害

活性（以下、ＣＤＣと略記する）にも関与する。

[0006] また、ＩｇＧ抗体のＦｃは、エンドソームでの低ｐＨ条件において胎児性Ｆｃ受容体（以下、ＦｃＲｎと略記する）に結合し、リソソームでの分解を回避することで、血中半減期の延長にも関与している。Ｆｃ領域の一次配列はサブクラス（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）ごとに異なっており、ＦｃγＲ、ＦｃＲｎ、補体成分に対する結合活性が異なるため、生物学的性質の違いをもたらす（非特許文献１）。

[0007] ＩｇＧ抗体分子はＶＨ、ＣＨ１、ＶＬ、Ｌ鎖定常領域（以下ＣＬと略記する）からなるＦａｂと呼ばれる領域を２つ有し、この２つのＦａｂにより抗原分子に対し２価で結合する。この２価結合活性は、抗原に対すアビディティーを上昇させるだけでなく、細胞膜表面に存在する受容体などの抗原分子に結合する場合、抗原の架橋による細胞内シグナルを誘導する場合がある。

[0008] このようなＩｇＧ抗体の２価結合活性を回避するために、抗原結合部位を１つ（一価）にした一価抗体またはＦｃγＲ結合活性を無くすアミノ酸残基置換を含むＦｃ ｖａｒｉａｎｔを有する抗体ｖａｒｉａｎｔの作製など、抗体工学的な検討がなされている。一方、抗原結合部位を含むＦａｂ断片は、抗原に対して一価の結合活性を示すが、Ｆｃが無いために血中半減期が短く、治療薬として有用ではない（非特許文献２）。

[0009] 一方バイスペシフィック抗体は、その二重特異性によって、従来のＩｇＧモノクローナル抗体では発揮することの出来ない作用機序を可能にする。例えば、ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ ｃｅｌｌ ｅｎｇａｇｅｒ［ＢｉＴＥ（登録商標）］は、ＣＤ３と癌抗原との両方に結合することで、Ｔ細胞を動員して癌細胞を効率的に傷害する（非特許文献３）。また、抑制性のＦｃγ受容体であるＦｃγＲＩＩｂと受容体を架橋することで、活性化した細胞内シグナルを抑制できる可能性がある（非特許文献４、５）。

[0010] バイスペシフィック抗体の最初の作製技術はクアドローマ（ｑｕａｄｒｏｍａ）と呼ばれる、二つのハイブリドーマをさらに融合した細胞による生産法である。二種のＨ鎖と二種のＬ鎖からなる４量体は、理論上最大１０通り

の組み合わせの混合物として生産され、目的のバイスペシフィック活性を有する抗体はそのうちのたった一種であり、類似の物理化学的性質を有する副産物から目的のバイスペシフィック抗体を分離することが困難である（非特許文献６）。

[0011] バイスペシフィック抗体の副産物の種類を減らすための方法として、異なるＨ鎖同士の”ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓな会合“を安定化するアミノ酸残基置換をＣＨ３ドメインに導入する方法（非特許文献７、８、９および特許文献４）、およびＩｇＧ１抗体およびＩｇＡ抗体のキメラ型のＣＨ３ドメインを用いることで、Ｈ鎖のヘテロな組合せを安定化させる方法が知られている（特許文献１）。

[0012] これに対して、バイスペシフィック抗体を発現させた場合に生じる、同種のＨ鎖同士の“ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓな会合”による望まれない副産物を、精製の段階で除去する方法も報告されており、ＩｇＧ抗体サブクラスのプロテインＡへの結合活性の違いを利用した精製方法が知られている。

[0013] Ｌｉｎｄｈｏｆｅｒらは、ラットＩｇＧ２ｂはプロテインＡに結合せず、マウスＩｇＧ２ａはプロテインＡに結合する特徴を利用して、ラットＩｇＧ２ｂおよびマウスＩｇＧ２ａから構成されるバイスペシフィック抗体の精製方法を開示している。即ち、ラットＩｇＧ２ｂおよびマウスＩｇＧ２ａのヘテロダイマーならびにマウスＩｇＧ２ａホモダイマーは、プロテインＡに結合し、溶出時のｐＨを調節することによりヘテロダイメリックなバイスペシフィック抗体を分離できることが知られている（非特許文献１０）。

[0014] さらにＳａｍｕｅｌらは、プロテインＡへのアフィニティの違いを利用して精製法によってヒトＩｇＧ型のバイスペシフィック抗体を特異的に精製する方法を提示している。バイスペシフィック抗体を構成する異なる２本のＨ鎖のうち、一方のＨ鎖のＣＨ３ドメインにＥＵインデックスの４３５位のＡｒｇおよび４３６位のＰｈｅのアミノ酸残基改変を行うことで、プロテインＡに対する結合活性を低下させた結果、溶出時のｐＨを調節することで、プロテインＡに対するアフィニティが異なる３種類の分子から、ヘテロダイメ

リックなＩｇＧ型バイスペシフィック抗体を分離精製できることが開示されている（特許文献２）。

[0015] ヘテロダイマー構造を応用した抗体分子の１つとして、ヒトκ型軽鎖とヒトＩｇＧ１のＦｃを融合させた融合タンパク質とヒトＩｇＧ１抗体Ｈ鎖とのヘテロダイマー型一価抗体が報告されている（特許文献３）。

[0016] しかし、このような分子を発現させた場合、Ｈ鎖－Ｈ鎖ホモダイマーは分泌されないが、Ｈ鎖－融合タンパク質ヘテロダイマー、融合タンパク質ホモダイマーおよび多量体も培養上清中に分泌されること、更に、分泌されたタンパク質から特異的なヘテロダイマー型一価抗体を取得するために、Ｈ鎖にタグ配列を融合させる必要があり、このタグを用いた精製が必要とされることなどが知られている。このような一価抗体分子を医薬として用いる場合は、予期せぬ生物活性を持つ可能性がある多量体による副作用、および煩雑で高コストなタグ配列を利用したアフィニティ精製が課題である。

先行技術文献

特許文献

[0017] 特許文献1：国際公開第２００７／１１０２０５号

特許文献2：国際公開第２０１０／１５１７９２号

特許文献3：国際公開第２００７／０４８０３７号

特許文献4：国際公開第２００９／０８９００４号

非特許文献

[0018] 非特許文献1：Ｃａｔｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗ，２００６；６：３４３．

非特許文献2：Ｌａｂｒｊｉｎ Ａ Ｆ ｅｔ ａｌ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００８；２０：１

非特許文献3：Ｗｏｌｆ ｅｔ ａｌ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ，２００５；１０：１２３７

非特許文献4：Ｋｕｆｅｒ ｅｔ ａｌ，ＴＲＥＮＤＳ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２００４；２２：２３８

非特許文献5：Ｊａｃｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１０；２８５：２０８５０

非特許文献6：Ｃａｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２００１；２４８：７

非特許文献7：Ｒｉｄｗａｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．，１９９６；９：６１７

非特許文献8：Ｍｅｒｃｈａｎｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１９９８；１６：６７７

非特許文献9：Ｇｕｎａｓｅｋａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１０；２８５：１９６３７

非特許文献10：Ｌｉｎｄｈｏｆｅｒ　Ｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１９９５；１５５：２１９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0019] これまでに知られていたヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマー形成効率が低く、不安定であり、特異的にヘテロダイマータンパク質分子を生成させ、分離および精製することが困難であった。従って、効率的かつ安定に生産できるヘテロダイマータンパク質組成物、該タンパク質組成物の精製方法および製造方法が求められている。

課題を解決するための手段

[0020] 本発明は、以下の（１）～（２４）に関する。

（１）イムノグロブリンＣＨを含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリンＣＬとＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ、ＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質。

（２）イムノグロブリンＣＨを含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリンＣＬとＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなる

タンパク質であって、かつ、該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質。

（３）前記第２ポリペプチドが、ＫａｂａｔらによるＥＵインデックス（以下、ＥＵインデックスと記す）２１４位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、（１）または（２）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（４）前記第１ポリペプチドがＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドがＣＬドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むポリペプチドである、（１）～（３）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（５）前記ＣＨ結合体が、抗ＣＨ１ドメイン抗体、抗ヒンジ抗体、抗ＣＨ２ドメイン抗体、抗ＣＨ３ドメイン抗体、Ｆｃ受容体タンパク質、プロテインＡおよびプロテインＧから選ばれるいずれか１つの結合体である、（２）～（４）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（６）イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４から選ばれるいずれか１つのサブクラスである、（１）～（５）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（７）前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス４３５位のアミノ酸残基がＡｒｇに置換されたポリペプチドである、（１）～（６）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（８）イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ４である（１）～（７）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（９）前記第１ポリペプチドが、ＥＵインデックス１３１位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、（８）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１０）前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス２２８位のアミノ酸残基がＰｒｏに置換されたポリペプチドである、

（９）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１１）前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス４０９位のアミノ酸残基がＬｙｓに置換されたポリペプチドである、（１０）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１２）前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス２３５位のアミノ酸残基がＧｌｕに置換されたポリペプチドである、（１１）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１３）イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ１である、（１）～（７）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１４）前記第１ポリペプチドが、ＥＵインデックスの２２０位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、（１３）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１５）前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックスの２１６～２２０位のアミノ酸残基が欠損したヒンジドメインを含むペプチドまたはＥＵインデックスの２２０位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、（１４）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１６）ヘテロダイマータンパク質に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が２０％以上である、（１５）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１７）前記第１ポリペプチドおよび／または前記第２ポリペプチドが、Ｐ２４７Ｉ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ、Ｙ３００Ｆ、Ｐ３９６Ｌ、Ｔ３９３Ａ、Ｈ４３３Ｐ、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２９８Ａ、Ａ３３０Ｌ、Ｉ３３２Ｅ、Ｅ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｌ２３５Ｅ、Ｐ２３８Ａ、Ｎ２９７Ａ、Ｋ３２２Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｋ３２６Ａ、Ｓ２６７Ｅ、Ｈ２６８Ｆ、Ｓ３２４Ｔ、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｋ３２６Ｗ、Ｋ３２６Ｙ、Ｅ３３３Ａ、Ｅ３３３Ｓ、Ａ３３９Ｔ、Ａ３３９Ｄ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｙ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２

２Ｉから選ばれる少なくとも一つのアミノ酸残基置換を含むポリペプチドである、（１５）または（１６）に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１８）前記第１ポリペプチドおよび／または前記第２ポリペプチドが、少なくとも１つの結合タンパク質がＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端および／またはＣ末端に結合したポリペプチドである、（１）～（１７）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（１９）前記結合タンパク質が、抗体可変領域、ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｉｎｇｌｅ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｏｍａｉｎ（ＶＨＨ）、リガンドタンパク質および受容体タンパク質から選ばれるいずれか１つのタンパク質である、（１８）に記載にヘテロダイマータンパク質。

（２０）（ｉ）前記第１ポリペプチドが、イムノグロブリンＶＨがＣＨのＮ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、イムノグロブリンＶＬがＣＬ－ＦｃのＮ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および（ｉｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＬがＣＨのＮ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＨがＣＬ－ＦｃのＮ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、（１）～（１９）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（２１）（ｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＨがＣＨのＣ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＬがＣＬ－ＦｃのＣ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および（ｉｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＬがＣＨのＣ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＨがＣＬ－ＦｃのＣ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、（１）～（２０）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（２２）一価抗体、二価抗体、三価抗体および四価抗体から選ばれる１つの抗体である、（１）～（２１）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

（２３）（１）～（２２）のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質をコードするＤＮＡ。

（２４）（２３）に記載のＤＮＡを含むタンパク質発現ベクターを含むヘテロダイマータンパク質の発現細胞。

（２５）（２４）に記載のヘテロダイマータンパク質の発現細胞を培養し、該培養上清からヘテロダイマータンパク質を精製する工程を含む、ヘテロダイマータンパク質の製造方法。

発明の効果

[0021] 本発明のヘテロダイマータンパク質は、イムノグロブリン重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖定常領域（ＣＬ）とＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなり、かつＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されていることにより、ヘテロダイマータンパク質を生産する際に生じる多量体量、半量体量、並びに多量体／半量体の生成を抑制し、効率的かつ安定に生産することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図１は、ＩｇＧ抗体の模式図を示す。

[図2A]図２Ａは、本発明のヘテロダイマータンパク質の構造の模式図を示す。

[図2B]図２Ｂは、本発明のヘテロダイマー足場タンパク質構造（ＨＳＰ）を元に作製され得る典型的な一価から四価抗体構造の模式図を示す。

[図3A]図３Ａは、ＩｇＧ１型一価抗体を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位（表１）、数字はＥＵインデックスで定義された番号を示す。

[図3B]図３Ｂは、ＩｇＧ４型一価抗体のＨ鎖定常領域のアミノ酸配列（ＩｇＧ１－ＣＨ、ＩｇＧ４－ＣＨ）を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位（表１）、数字はＥＵインデックスで定義された番号を示す。

[図4A]図４Ａは、ＩｇＧ１型一価抗体を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位（表２）、数字はＥＵインデックスで定義された番号を示す。

[図4B]図４Ｂは、ＩｇＧ４型一価抗体のＣＬ－Ｆｃのアミノ酸配列（ＩｇＧ１－Ｌ、ＩｇＧ４－Ｌ）を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位（表２）、数字はＥＵインデックスで定義された番号を示す。

[図5]図５は、各種一価抗体の構造を示す。

[図6]図６は、バイスペシフィック抗体の第２ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[図7]図７は、バイスペシフィック抗体の構造を示す。

[図8A]図８Ａ（ａ）および（ｂ）は、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－１　ＤＦおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦの、非還元条件でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析の結果を示す。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析には、プロテインＡ精製における各ｐＨで溶出された溶出画分１～３を用いた。図中の矢印は多量体のバンドを示す。

[図8B]図８Ｂは、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＤＦの、非還元条件でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析の結果を示す。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析には、プロテインＡ精製におけるｐＨ３．０でまとめて溶出した精製タンパク質を用いた。図中の矢印は半量体のバンドを示す。

[図9]図９は、陽イオン交換クロマトグラフィーによる抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦの分析結果を示す。図中のピーク（１）～（１０）は分取した画分を示す。

[図10]図１０は、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分取された抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦサンプル（図９）のウェスタンブロット解析の結果を示す。Ｌ鎖の検出には抗ｋａｐｐａ鎖抗体を、Ｈ鎖の検出には抗Ｈｉｓタグ抗体を、ＩｇＧの検出には抗ヒトＩｇＧ

抗体を用いた。ピーク（２）、（４）、（５）、（６）、（７）および（１０）は検出限界以下であった。

[図11]図１１は、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２ＤＦのプロテインＡ精製において、ｐＨ３．５で溶出された画分の１つであるフラクションＸおよびｐＨ５．０で溶出されたフラクションＹ、およびプロテインＡまたはプロテインＧで精製した４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦの、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、Ｌ鎖特異的ウェスタンブロットおよびＨ鎖特異的ウェスタンブロットの結果を示す。４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦのフラクションＸとＹは、表５に示した通りＨＬ体を主成分とする溶出画分とＬＬ体を主成分とする溶出画分である。４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦのプロテインＧ精製品とプロテインＡ精製品は、同時に取得した発現細胞培養上清からプロテインＧまたはプロテインＡで精製を行い、まとめて溶出したサンプルである。

[図12]図１２は、ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡによるＩｇＧ４型一価抗体のＨＬヘテロダイマーの量を示す。実験はＮ＝３で行った。縦軸に、ＨＬヘテロダイマー結合活性、横軸にＨＬヘテロダイマーの濃度（μｇ／ｍＬ）を示す。

[図13A]図１３Ａは、ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡによる各プロテインＡ精製フラクション中のＩｇＧ４型一価抗体ＨＬヘテロダイマーの量を示す。実験はＮ＝３で行った。縦軸に、ＨＬヘテロダイマー結合活性、横軸にＨＬヘテロダイマーの濃度（μｇ／ｍＬ）を示す。

[図13B]図１３Ｂは、ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡによる各プロテインＡ精製フラクション中のＩｇＧ４型一価抗体ＨＬヘテロダイマーの量を示す。実験はＮ＝３で行った。縦軸に、ＨＬヘテロダイマー結合活性、横軸にＨＬヘテロダイマーの濃度（μｇ／ｍＬ）を示す。

[図14A]図１４Ａは、抗ＨＥＲ２ヒト化抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎの結合アッセイ下での、各種一価抗体の競合結合阻害をフローサイトメーターで評価した結果であり、ＨＥＲ２陽性ヒト乳癌細胞株ＳＫ－ＢＲ－３に対する結合活性を示す。図中の相対蛍光強度は、（サンプルの平均蛍光強度）／（ｈＩｇＧ

１＿Ａｌｘの平均蛍光強度）により算出した。実験はＮ＝２で行った。図はいずれも、縦軸にｒｅｌａｔｉｖｅ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＲＦＩ）、横軸に競合反応させたＩｇＧ１抗体および一価抗体の濃度（ｎＭ）を示す。

[図14B]図１４Ｂは、抗ＣＤ２０ヒト化抗体ＧＡ１０１の結合アッセイ下での、各種一価抗体の競合結合阻害をフローサイトメーターで評価した結果であり、ＣＤ２０陽性ヒトリンパ腫細胞株Ｒａｊｉに対する結合活性を示す。図中の相対蛍光強度は、（サンプルの平均蛍光強度）／（ｈＩｇＧ１＿Ａｌｘの平均蛍光強度）により算出した。実験はＮ＝２で行った。図はいずれも、縦軸にｒｅｌａｔｉｖｅ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＲＦＩ）、横軸に競合反応させたＩｇＧ１抗体および一価抗体の濃度（ｎＭ）を示す。

[図15A]図１５Ａ（ａ）および（ｂ）は、ＩｇＧ１型およびＩｇＧ４型　抗ＨＥＲ２一価抗体のヒト乳癌細胞株ＳＫ－ＢＲ－３に対する抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１型一価抗体４Ｄ５ｍｖＧ１－１ＤＦのａｎｔｉｂｏｄｙ　ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（ＡＤＣＣ）活性を示す。４Ｄ５／ｍｖＧ１－１　ＤＦは、ＨＬヘテロダイマー含量が最も高かったフラクション１（図１３）を用いた。実験には、別々のドナーから取得したＰＢＭＣを用いた。実験はＮ＝３で行った。縦軸にＡＤＣＣ活性を、横軸に抗体濃度（ｎＭ）を示す。

[図15B]図１５Ｂ（ａ）および（ｂ）は、ＩｇＧ１型およびＩｇＧ４型　抗ＨＥＲ２一価抗体のヒト乳癌細胞株ＢＴ－２０に対する抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体のＡＤＣＣ活性を示す。実験には、別々のドナーから取得したＰＢＭＣを用いた。実験はＮ＝３で行った。縦軸にＡＤＣＣ活性を、横軸に抗体濃度（ｎＭ）を示す。

[図16]図１６（ａ）～（ｃ）は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体のバーキットリンパ腫細胞株ＲａｊｉおよびＳＴ－４８６、並びに慢性Ｂ細胞白血病細胞株ＭＥＣ－１に対するＡＤＣＣ活性を示す。縦軸にＡＤＤＣ活性（％）

、横軸に抗体濃度（ｎＭ）を示した。

[図17]図１７は、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－４Ｆ、抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体ｈＬＬ１／ｍｖＧ４－４　Ｆ、ＨＥＲ２－ＣＤ７４バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＦおよびＣＤ７４－ＣＤ２０バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－２Ｆ２／ｍｖＧ４－４　Ｆの非還元および還元条件におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析結果を示す。

[図18]図１８（ａ）および（ｂ）は、ＥＬＩＳＡ法によるＨＥＲ２－ＣＤ７４バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆのリコンビナント ＨＥＲ２タンパク質およびリコンビナントＣＤ７４タンパク質に対する結合活性を示す。縦軸に抗原結合活性（ＯＤ４１５－４９０）。横軸にバイスペシフィック抗体濃度（ｎＭ）を示す。各抗原に対するポジティブコントロールＩｇＧ１抗体として、抗ＨＥＲ２ヒト化抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎおよび抗ＣＤ７４　抗体ｈＬＬ１抗体を用いた。

[図19]図１９は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１のバーキットリンパ腫細胞株ＳＴ－４８６に対する補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ活性）を示す。縦軸にＣＤＣ活性（％）、横軸に各一価抗体、ＩｇＧ１抗体のモル濃度（ｎＭ）を示す。

[図20]図２０（ａ）は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１のバーキットリンパ腫細胞株Ｒａｊｉに対する結合量を示す。図２０（ｂ）は、補体因子Ｃ１ｑ結合量を示す。いずれも縦軸にＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＲＦＩ）値、横軸に各一価抗体、ＩｇＧ１抗体のモル濃度（ｎＭ）を示す。

[図21]図２１（ａ）は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１のバーキットリンパ腫細胞株ＳＴ－４８６に対する結合量を示す。図２１（ｂ）は補体

因子Ｃ１ｑ結合量を示す。いずれも縦軸にＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎｃｅ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＲＦＩ）値、横軸に各一価抗体、ＩｇＧ１抗体のモル濃度（ｎＭ）を示す。

[図22A]図２２Ａは、高ＣＤＣ活性型定常領域を含むヘテロダイマータンパク質のＨ鎖定常領域ドメインのアミノ酸配列を示す。アミノ酸番号はＫａｂａｔらによって定義されたＥＵインデックスで表し、●はＩｇＧ１型から高ＣＤＣ活性型へのアミノ酸置換部位を、★はヘテロダイマータンパク質のアミノ酸置換部位を表わしている。

[図22B]図２２Ｂは、高ＣＤＣ活性型定常領域を含むヘテロダイマータンパク質のＣＬ－Ｆｃ鎖のアミノ酸配列を示す。アミノ酸番号はＫａｂａｔらによって定義されたＥＵインデックスで表し、●はＩｇＧ１型から高ＣＤＣ活性型へのアミノ酸置換部位を、★はヘテロダイマータンパク質のアミノ酸置換部位を表わしている。

[図23]図２３は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍの精製タンパク質を用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す。ＤＴＴ－は、非還元状態、ＤＴＴ＋は還元状態を示す。

[図24]図２４（ａ）および（ｂ）は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍのバーキットリンパ腫細胞株Ｒａｊｉまたは慢性Ｂ細胞白血病細胞ＭＥＣ－１に対するＣＤＣ活性を示す。縦軸にＣＤＣ活性（％）、横軸に各一価抗体、ＩｇＧ１抗体のモル濃度（ｎＭ）を示す。

[図25]図２５（ａ）および（ｂ）は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍのバーキットリンパ腫細胞株Ｒａｊｉまたは慢性Ｂ細胞白血病細胞ＭＥＣ－１に対するＡＤＣＣ活性を示す。縦軸にＡＤＣＣ活性（％）、横軸に各一価抗体、ＩｇＧ１抗体のモル濃度（ｎＭ）を示す。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、イムノグロブリン重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖定常領域（ＣＬ）とＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質、該タンパク質の精製方法、該タンパク質の製造方法、該タンパク質をコードするＤＮＡおよびベクターに関する。

[0024] １．ヘテロダイマータンパク質の構造

本発明のヘテロダイマータンパク質としては、イムノグロブリンＣＨを含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリンＣＬと抗体Ｆｃとを融合させたＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ通常のＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0025] 以下、特に断りの無い限りアミノ酸番号は、Ｋａｂａｔら［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］によるＥＵインデックス（以下、単にＥＵインデックスと記す）に基づいた番号を示す。また、番号の前がアミノ酸残基置換前、番号の後ろが置換後のアミノ酸残基を示す。

[0026] 本発明において、ＣＬとＣＨのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基としては、通常、抗体のＨ鎖とＬ鎖とが分子間ジスルフィド結合を形成するために必要とされるＣｙｓ残基のことを示す。

[0027] 従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、第１ポリペプチドに含まれるＣＨおよび／または第２ポリペプチドに含まれるＣＬ－Ｆｃに含まれるＣｙｓ残基であって、かつＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されている。該Ｃｙｓ残基が欠損または置換されていることで、不要な多重合体の生成を減少させることができる。

[0028] Ｌ鎖中のＣＬとＣＨ１とのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基としては、例えば、ヒトκ鎖およびλ鎖のＥＵインデックス２１４位のＣｙｓ残基が挙げられる。

[0029] また、Ｈ鎖中のＣＬとＣＨ１とのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基としては、例えば、ヒトＩｇＧ１では２２０位のＣｙｓ残基、ＩｇＧ４抗体では１３１位のＣｙｓ残基が挙げられる。

[0030] 更にアミノ酸残基の欠損または置換することもできるので、上述ＣＬに含まれるＣｙｓ残基の置換または欠損と合わせて、ＣＨ１ドメインまたはヒンジドメインのＣｙｓ残基を置換または欠損することもできる。

[0031] 従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、第１ポリペプチドに含まれるＣＨと第２ポリペプチドに含まれるＣＬ－ＦｃのＣＨとの間がヒンジドメインのみでジスルフィド結合されている。

[0032] また本発明のヘテロダイマータンパク質としては、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬとＦｃとが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0033] 本発明において、ＣＨ結合体および／またはＦｃ結合タンパク質への結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドとは、第２ポリペプチドに含まれるＣＬ－Ｆｃのアミノ酸配列に付加、欠失および／または置換を行うことにより、ＣＨ結合体および／またはＦｃ結合体に対する結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドをいう。

[0034] ＣＨ結合体とは、抗体Ｈ鎖定常領域に結合するものであればタンパク質、化学物質、樹脂など特異的に結合するものであればいかなるものでもよく、例えば、Ｆｃ結合タンパク質、抗体Ｈ鎖定常領域（ＣＨ）に結合する抗体などが挙げられる。

[0035] Ｆｃ結合タンパク質として具体的には、例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ Ａｕｒｅｕｓ由来Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ、ｈｅｍｏｌｙｔｉｃ Ｓｔ

ｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ由来Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ、Ｆｃ受容体、該サブクラス（ＦｃγＲＩ、，ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＩＡ、ＩＩＩＢ）および上述タンパク質の結合部分断片などが挙げられる。

[0036] ＣＨに結合する抗体としては、ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインから選ばれる少なくとも１つに結合する抗体であればいずれの抗体でもよく、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が挙げられる。

[0037] 本発明のヘテロダイマーを構成する第２ポリペプチドにはＣＨ１ドメインが含まれておらず、第１ポリペプチドにはＣＨ１ドメインが含まれている。従って、ＣＨ結合体として抗ＣＨ１抗体を用いることにより、本発明のヘテロダイマータンパク質を精製することもできる。

[0038] 本発明において、ＣＨ結合体への結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドとは、ＣＨ結合体に対するアフィニティが低下することで、実質的に結合活性が低下または欠損することをいう。結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドとは、ＣＨ結合体への結合活性を有する第２ポリペプチドにアミノ酸残基付加、欠損または置換を行うことで、アミノ酸残基の付加、欠失または置換を行っていない元の第２ポリペプチドと比べてＣＨ結合体への結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドである。ＣＨ結合体への結合活性は、後述記載のｂｉｎｄｉｎｇ　ＥＬＩＳＡ、ｓｕｒｆａｃｅ　ｐｌａｓｍｏｎ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ法（ＳＰＲ）等の測定系を使用することで確認することができる。

[0039] 従って本発明のヘテロダイマータンパク質に含まれるＣＨを含む第１ポリペプチドは、上述ＣＨ結合体に特異的に結合しＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドはＣＨ結合体への結合活性が低下または欠損しているため、第１ポリペプチドと第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質のみがＣＨ結合体に結合し、特異的に分離・精製することができる。

[0040] ここで、本発明のヘテロダイマータンパク質を細胞で発現させた場合、ＣＨを含む第１ポリペプチドのホモダイマーは細胞外へ分泌されず、またＣＬ

ーＦｃを含む第２ポリペプチドのモノマーおよびホモダイマーは、細胞外へ分泌されるが、いずれもＣＨ結合体に対する結合活性が低下または欠損していることから、ＣＨ結合体との特異的結合活性に基づいた精製を行えば、第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質を特異的に分離、精製することが可能である。

[0041] ＣＨ結合体を使用せずに本発明のヘテロダイマータンパク質を特異的に発現、分離、精製する方法としては、本発明の第１ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に適当なタグを融合させた融合タンパク質を用いることもできる。

[0042] タグとして具体的には、例えば、ヒスチジンタグ（以下、Ｈｉｓタグとも略記される）、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、ヘマグルチニン（ＨＡ）タグおよびグルタチオンーＳ トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグなどが挙げられる。上述の方法も本発明のヘテロダイマータンパク質の分離、精製と組み合わせて応用することができる。

[0043] 本発明においてＣＨ結合体への結合活性が低下または欠損した第２ポリペプチドは、第２ポリペプチドに含まれるＣＬーＦｃのアミノ酸配列に付加、欠失および置換を行うことで作製される。

[0044] 例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａに対する結合活性を低下または欠損させたＣＬーＦｃとしては、ＥＵインデックス２５３位、３１０位、４３３位、４３５位、および４３６位から選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が欠損または置換されたＣＬーＦｃ、好ましくはＥＵインデックス４３５位のアミノ酸残基が置換されたＣＬーＦｃ、ＥＵインデックス４３５位および４３６位のアミノ酸残基が置換されたＣＬーＦｃ、より好ましくは４３５位のＨｉｓがＡｒｇに置換されかつ４３６位のＴｙｒがＰｈｅに置換されたＣＬーＦｃ、４３５位のＨｉｓがＡｒｇに置換されたＣＬーＦｃが挙げられる。

[0045] 他のＣＨ結合タンパク質に関しても、該結合タンパク質が結合するＣＨのアミノ酸配列に付加、欠失または置換を行うことで、ＣＨ結合タンパク質に対する結合活性を低下させることができる。例えば、プロテインＧが結合するＦｃ中の結合部位、抗Ｆｃ抗体が結合するエピトープおよび抗ヒンジドメ

イン抗体が結合するエピトープなど、本発明のヘテロダイマータンパク質のＣＨ上に存在するエピトープに含まれる少なくとも１つのアミノ酸残基を置換および／または欠損させることで、各ＣＨ結合タンパク質または抗体への結合活性が低下した第２ポリペプチドを作製することができる。

[0046] 抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても用いることができ、各抗体によって特定されたエピトープが明らかであればいずれの抗体のエピトープに含まれるアミノ酸残基を置換することもできる。

[0047] また本発明のヘテロダイマータンパク質としては、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬとＦｃとが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであり、かつＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0048] 本発明のヘテロダイマータンパク質としては、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬとＦｃとが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであり、かつＣＨとＣＬ－Ｆｃとの間がヒンジドメインのみでジスルフィド結合されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0049] 本発明のヘテロダイマータンパク質として具体的には、ＣＨを含む第１ポリペプチドと、ＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、第２ポリペプチドが、ＥＵインデックスで示される（ｉ）２１４位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたポリペプチド、（ｉｉ）２２０位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたポリペプチド、（ｉｉｉ）２１４位のアミノ酸残基がＳｅｒへ置換されたポリペプチド、（ｉｖ）２２０位のアミノ酸残基がＳｅｒへ置換されたポリペプチド、（ｖ）４３５位のアミノ酸残基がＡｒｇに置換されたポリペプチド、（ｖｉ）２１４位および４３５位のアミノ酸残基がＳｅｒおよびＡｒｇへ置換されたポリペプチ

ド、（ｖｉｉ）２２０位および４３５位のアミノ酸残基がＳｅｒおよびＡｒｇへ置換されたポリペプチド並びに（ｖｉｉｉ）２１４位、４３５位および４３６位のアミノ酸残基がＳｅｒ、ＡｒｇおよびＰｈｅへ置換されたポリペプチドのグループから選ばれるいずれか１つのポリペプチドを含むヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0050] また、本発明のヘテロダイマータンパク質としては、ＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端側およびＣ末端側から選ばれる少なくとも１つに結合ドメインが結合した第１ポリペプチド並びに第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下または欠損したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0051] 本発明において結合ドメインとは、他の分子に結合活性を有するタンパク質であればいずれのタンパク質であってもよく、具体的には抗体断片、抗体可変領域（以下、Ｖと略記することもある）、ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ－ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ Ｆｖ（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチド、ｓｉｎｇｌｅ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ（ＶＨＨ）、リガンドタンパク質および受容体タンパク質等が挙げられる。

[0052] 本発明のヘテロダイマータンパク質の第１ポリペプチドに含まれるＣＨは、抗体の定常領域であるＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインからなり、いずれのアイソタイプでもよいが、好ましくはＩｇＧアイソタイプが挙げられる。

[0053] ＩｇＧサブクラスとしては、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４のいずれのサブクラスであってもよい。更に、第１ポリペプチドには、各イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインまたは一部アミノ酸配列が付加、欠失または置換されたヒンジドメインが含まれていてもよい。好ましくはＦｃと同じアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインおよび該アミノ酸残基置換されたヒンジドメインなどが挙げられる。また、ヒンジドメインは本発明のヘテロダイマータンパク質を生産する上で適宜、長くすること

も短くすることもできる。

[0054] 本発明において第１ポリペプチドに含まれるＣＨとしては、ヘテロダイマータンパク質が効率的かつ安定に生成されるためのＣＨであればいずれのアミノ酸配列を有するＣＨでもよく、好ましくはアミノ酸配列に付加、欠失および置換を含むＣＨが挙げられる。

[0055] 具体的には、ＥＵインデックスの１３１番目がＳ、１３３番目がＫ、２２０番目がＳ、２２８番目がＰおよび４０９番目がＫになるアミノ酸残基置換から選られる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むＣＨが挙げられる。

[0056] アミノ酸残基置換の数は、１～１５個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～数個、最も好ましくは１～５個のアミノ酸残基置換が挙げられる。ＩｇＧ１サブクラスの場合は、ヒンジドメインのＣ２２０Ｓの置換を含むＣＨが挙げられる。

[0057] ＥＵインデックスの２２０位のアミノ酸残基は、ＩｇＧ１においてＬ鎖とのジスルフィド結合に関与することが知られており、本アミノ酸残基置換または欠損は、ＣＬ－ヒンジドメインのジスルフィド結合を欠損させることができる。

[0058] ＩｇＧ４サブクラスの場合は、ＣＨ１ドメインのＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３Ｋ、ヒンジドメインのＳ２２８Ｐ、ＣＨ３ドメインのＲ４０９Ｋ、Ｒ４０９Ｔ、Ｒ４０９ＭおよびＲ４０９Ｌから選らばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換を含むＣＨ、好ましくはＣ１３１ＳおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換を含むＣＨ、より好ましくはＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３ＫおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換を含むＣＨ並びにＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３Ｋ、Ｓ２２８ＰおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換を含むＣＨが挙げられる。

[0059] ＥＵインデックスの４０９位のアミノ酸残基は、抗体Ｆｃ領域のＣＨ３－ＣＨ３ドメイン間の安定的な相互作用に関与していることが知られていることから、Ｒ４０９Ｋ、Ｒ４０９Ｔ、Ｒ４０９ＭおよびＲ４０９Ｌのアミノ酸残基改変はＦｃ－Ｆｃ相互作用の安定性の増加効果、Ｆａｂ－ａｒｍ　ｅｘｃｈａｎｇｅの抑制効果、低ｐＨ下における凝集体抑制効果が得られる。

[0060] また、ヘテロダイマータンパク質に含まれるＣＨ３－ＣＨ３のヘテロダイマー形成能を増加させる目的で、Ｋ４０９Ｄ／Ｋ３９２ＤおよびＤ３９９Ｋ／Ｅ３５６Ｋのアミノ酸残基改変（国際公開第２００９／０８９００４号）またはイムノグロブリンサブクラスを利用したＳＥＥＤ技術（国際公開第２００７／１１０２０５号）も本発明のヘテロダイマーに組合わせることができる。

[0061] ＥＵインデックスの２２８位のＳｅｒ残基は、ヒンジドメイン間のジスルフィド結合の不安定性に関与していることが知られており、Ｓ２２８Ｐのアミノ酸残基改変はヒンジドメインの安定化に関与する。

[0062] 本発明のヘテロダイマータンパク質の第２ポリペプチドに含まれるＣＬは、κ鎖およびλ鎖いずれでもよい。また、第２ポリペプチドに含まれるＦｃはヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインからなり、いずれのアイソタイプでもよいが、好ましくはＩｇＧアイソタイプが挙げられ、ＩｇＧサブクラスとしては、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４のいずれのサブクラスであってもよい。

[0063] 更に、第２ポリペプチドには、各イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインまたは一部アミノ酸配列が付加、欠失または置換されたヒンジドメインが含まれていてもよく、好ましくはＦｃと同じアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインおよび該アミノ酸残基置換されたヒンジドメインなどが挙げられる。また、ヒンジドメインは本発明のヘテロダイマータンパク質を生産する上で適宜、長くすることも短くすることもできる。

[0064] 本発明において第２ポリペプチドに含まれるＣＬ－Ｆｃとしては、ヘテロダイマータンパク質が効率的かつ安定に生成されるためのＣＬ－Ｆｃであればいずれのアミノ酸配列を有するＣＬ－Ｆｃでもよく、好ましくはアミノ酸配列に付加、欠失および置換を含むＣＬ－Ｆｃが挙げられる。

具体的には、ＥＵインデックスの２１４番目がＳ、２２０番目がＳ、２２８番目がＰ、４０９番目がＫ、４３５番目がＲおよび４３６番目がＦになるアミノ酸残基置換から選られる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むＣＬ

－Ｆｃが挙げられる。

[0065] アミノ酸残基置換の数は、１～１５個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～数個、最も好ましくは１～５個のアミノ酸残基置換が挙げられる。

[0066] ＩｇＧ１ サブクラスの場合は、Ｃ２１４Ｓ、Ｃ２２０Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換含むＣＬ－Ｆｃ、ＥＵインデックス２２０位のＣ２２０Ｓのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、ＥＵインデックス２１６－２２０のＥＰＫＳＣの欠損を含むＣＬ－Ｆｃ、好ましくはＣ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、Ｃ２１４Ｓ、Ｃ２２０ＳおよびＨ４３５Ｒのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、より好ましくはＣ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、Ｃ２１４Ｓ、Ｃ２２０Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃが挙げられる。

[0067] ＩｇＧ４サブクラスの場合は、Ｃ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆから選ばれるいずれか１つのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、好ましくはＣ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、Ｃ２１４Ｓ、Ｒ４０９ＫおよびＨ４３５Ｒのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、より好ましくはＣ２１４Ｓ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃ、最も好ましくはＣ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換を含むＣＬ－Ｆｃが挙げられる。

[0068] 本発明においてモノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次構造）が均一である。

[0069] エピトープとしては、例えば、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖、アミノ基、カル

ボキシル基、リン酸、硫酸など修飾残基が結合したアミノ酸配列および該修飾残基が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。立体構造は、天然に存在するタンパク質が有する３次元立体構造であり、細胞内または細胞膜上に発現しているタンパク質が構成する立体構造をいう。

[0070] 本発明において抗体分子はイムノグロブリン（以下、ＩｇＧと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４およびＩｇＭのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を総称してＩｇＧともいう。

[0071] 抗体分子は重鎖（ｈｅａｖｙ　ｃｈａｉｎ、以下Ｈ鎖と記す）および軽鎖（ｌｉｇｈｔ　ｃｈａｉｎ、以下Ｌ鎖と記す）と呼ばれるポリペプチドより構成される。

[0072] また、Ｈ鎖はＮ末端側よりＨ鎖可変領域（ＶＨとも表記される）、Ｈ鎖定常領域（ＣＨとも表記される）、Ｌ鎖はＮ末端側よりＬ鎖可変領域（ＶＬとも表記される）、Ｌ鎖定常領域（ＣＬとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。ＣＨは各サブクラスごとに、α、δ、ε、γおよびμ鎖がそれぞれ知られている。ＣＬは、λおよびκが知られている。

[0073] ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、本発明におけるＦｃおよびＦｃ領域とは、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインから成るＨ鎖定常領域の部分配列および部分構造を指す。

[0074] ＣＨはさらに、Ｎ末端側よりＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの各ドメインにより構成される。本発明におけるＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインおよびＦｃ領域は、ＥＵインデックス［Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ　Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］により、Ｎ末端からのアミノ酸残基の番号

で特定することができる。

[0075] 具体的には、ＣＨ１はＥＵインデックス１１８～２１５番のアミノ酸配列、ヒンジはＥＵインデックス２１６～２３０番のアミノ酸配列、ＣＨ２はＥＵインデックス２３１～３４０番のアミノ酸配列、ＣＨ３はＥＵインデックス３４１～４４７番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0076] ＣＬ－ＦｃはＮ末端側よりＣＬドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの各ドメインにより構成される。本発明におけるＣＬ－Ｆｃは、Ｋａｂａｔらの定義［Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］により、Ｎ末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。

[0077] 具体的には、ＣＬ－ＦｃのＣＬはＫａｂａｔらにより定義されたＬ鎖１０８～２１４番目のアミノ酸配列、ＣＬ－ＦｃのＦｃは、ヒンジはＥＵインデックス２１６～２３０番のアミノ酸配列、ＣＨ２はＥＵインデックス２３１～３４０番のアミノ酸配列、ＣＨ３はＥＵインデックス３４１～４４７番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0078] 本発明において抗体としては、ハイブリドーマから取得されるモノクローナル抗体の他に、遺伝子組換え技術により作製された遺伝子組換え抗体も含まれる。遺伝子組換え抗体としては、ヒト抗体定常領域を非ヒト抗体可変領域に結合させたキメラ抗体、非ヒト抗体可変領域のＨ鎖およびＬ鎖の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ、以下、ＣＤＲと略記する）をヒト抗体可変領域のフレームワーク領域（以下、ＦＲと略記する）に挿入することで作製されるヒト化抗体（または、ＣＤＲ移植抗体）、ヒト抗体産生動物など用いて作製されるヒト抗体が包含される。

[0079] キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体

のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0080] ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの対応するＣＤＲに移植した抗体をいう。ＶＨおよびＶＬのＣＤＲ以外の領域はフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）と称される。

[0081] ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＨのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡと、非ヒト動物抗体のＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＬのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0082] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリー、不死化ヒト末梢血リンパ球のクローニングまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

[0083] ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス（Ｔｏｍｉｚｕｋａ Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９７，７２２－７，２０００）に所望の抗原を免疫することにより、取得することが出来る。また、ヒト由来のＢ細胞から抗体遺伝子を増幅したｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる（Ｗｉｎｔｅｒ Ｇ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：４３３－５５．１９９４）。

[0084] さらに、ＥＢウイルスを用いてヒトＢ細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得する

ことができる（Ｒｏｓｅｎ　Ａ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２６７，５２－５４．１９７７）。

[0085] ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、ＥＢウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

[0086] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、ＦａｂまたはｓｃＦｖ等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0087] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。

[0088] ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

[0089] 本発明のヘテロダイマータンパク質に結合させるＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のＣＤＲを、ヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体のアミノ酸配列並びにヒト抗体由来のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列のいずれでもよい。

[0090] 具体的には、ハイブリドーマまたは抗体産生細胞が産生する非ヒト動物抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列などが挙げ

られる。

[0091] 本発明のヘテロダイマータンパク質におけるＣＬのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のＣκまたはＣλのアミノ酸配列が好ましい。

[0092] 本発明のヘテロダイマータンパク質におけるＣＨとしては、イムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはヒトＩｇＧクラスに属するサブクラス、γ１（ＩｇＧ１）、γ２（ＩｇＧ２）、γ４（ＩｇＧ４）のいずれも用いることができる。

[0093] 本発明において抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖ、複数のＣＤＲを含むペプチド、好ましくは抗体の６個のＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。

[0094] Ｆａｂは、ＩｇＧ抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４位のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末端側約半分とＬ鎖全体がジスルフィド結合（Ｓ－Ｓ結合）で結合した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0095] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２３４位のアミノ酸残基で切断される）、Ｆａｂがヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0096] Ｆａｂ’は、上記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を切断した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0097] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを４個のＧｌｙおよび１個のＳｅｒ残基からなるリンカー（Ｇ４Ｓ）を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリンカー（Ｐ）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬないしはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0098] Ｄｉａｂｏｄｙは、抗原結合特異性の同じまたは異なるｓｃＦｖが２量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する２価の抗原結合活性または異なる

抗原に対する２特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0099] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のＳ－Ｓ結合を介して結合させたものをいう。

[0100] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含んで構成される。複数のＣＤＲを含むペプチドは、ＣＤＲ同士を直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

[0101] 本発明のヘテロダイマータンパク質のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0102] 本発明のヘテロダイマータンパク質としては、第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドによって形成される２つの抗体可変領域が、異なる２つのエピトープに結合するヘテロダイマータンパク質であってもよいし、２つの抗体可変領域が、同じエピトープにそれぞれ結合するヘテロダイマータンパク質であっても、いずれでもよい。

[0103] さらに、上述のＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＣ末端の少なくともいずれか１つに更に結合タンパク質が結合し、２つ以上のエピトープに結合するヘテロダイマータンパク質も本発明に包含される。

[0104] ２．ヘテロダイマータンパク質の活性の制御

（１）エフェクター活性の制御

本発明のヘテロダイマーは、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインからなるＦｃ領域を有するため、ヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域に依存したエフェクター活性を付与することもできる。本発明のヘテロダイマーのエフェクター活性は、種々の方法により制御することができる。

[0105] エフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる抗体依存

性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＡＤＣＣ活性）、補体依存性傷害活性（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＣＤＣ活性）、またはマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＡＤＰ活性）などが知られている。本発明においてＡＤＣＣ活性およびＣＤＣ活性は、公知の測定方法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］を用いて測定することができる。

[0106] ＡＤＣＣ活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のＦｃ領域を介して免疫細胞のＦｃ受容体と結合することで免疫細胞（ナチュラルキラー細胞など）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

[0107] Ｆｃ受容体（以下、ＦｃＲと記すこともある）とは、抗体のＦｃ領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘導する。

[0108] ＦｃＲは抗体のサブクラスに対応しており、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＭはそれぞれＦｃγＲ、ＦｃεＲ、ＦｃαＲ、ＦｃμＲに特異的に結合する。更にＦｃγＲには、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）のサブタイプが存在し、ぞれぞれＦｃγＲＩＡ、ＦｃγＲＩＢ、ＦｃγＲＩＣ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＢ、ＦｃγＲＩＩＣ、ＦｃγＲＩＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＩＢのアイソフォームが存在する。これらの異なるＦｃγＲは異なる細胞上に存在している［Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）］。

[0109] ヒトにおいては、ＦｃγＲＩＩＩＢは好中球に特異的に発現しており、ＦｃγＲＩＩＩＡは、単球、Ｎａｔｕｒａｌ Ｋｉｌｌｅｒ細胞（ＮＫ細胞）および一部のＴ細胞に発現している。ＦｃγＲＩＩＩＡを介した抗体の結合は、ＮＫ細胞依存的なＡＤＣＣ活性を誘導する。

[0110] ＣＤＣ活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード（補体活性化経路）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走、活性化を誘導することができる。

[0111] ＣＤＣ活性のカスケードは、抗体のＦｃ領域との結合ドメインを有するＣ１ｑが、Ｆｃ領域に結合し、２つのセリンプロテアーゼであるＣ１ｒおよびＣ１ｓと結合することでＣ１複合体を形成することで開始する。

[0112] 本発明のヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を制御する方法としては以下のような方法が挙げられる。

[0113] 例えば、本発明のヘテロダイマータンパク質のＦｃとして、ＩｇＧ１サブクラスのＦｃのアミノ酸配列を用いて、ＥＵインデックス２９７位のＡｓｎに結合するＮ結合複合型糖鎖（以下、単にコンプレックス糖鎖と略記する場合もある）の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα－１，６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）、または抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を置換することで、ヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を制御することができる。

[0114] １）糖鎖改変によるエフェクター活性の制御

ヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域に結合しているコンプレックス糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンに付加するフコースの含量を制御することで、ヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を増加または低下させることができる。

[0115] ヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域に結合しているＮ結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子（ＦＵＴ８）が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質を取得することができる。フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質は高いＡＤ

ＣＣ活性を有する。

[0116] 一方、ヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域に結合しているＮ結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いてヘテロダイマータンパク質を発現させることで、フコースが結合しているヘテロダイマータンパク質を取得できる。フコースが結合しているヘテロダイマータンパク質は、フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質よりも低いＡＤＣＣ活性を有する。

[0117] 本発明のヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域には、ＥＵインデックス２９７位のＡｓｎ残基にＮ結合型糖鎖が結合するが、それ以外のＦｃ領域のＡｓｎ残基には糖鎖は結合することは知られていない。従って、通常、ヘテロダイマータンパク質１分子あたり２本のＮ－グリコシド結合糖鎖が結合している。

[0118] Ｎ結合型糖鎖としてはハイマンノース型、コンプレックス型およびハイブリッド型が知られており、いずれのＮ結合型糖鎖でもフコースが結合していない糖鎖であれば、フコースが結合している糖鎖と比べて高いＡＤＣＣ活性を得ることができる。

[0119] 本発明のヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域に結合するコンプレックス糖鎖としては、コア構造（トリマンノシルコア構造）の非還元末端側のマンノース（Ｍａｎ）に、１つ以上のＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）またはガラクトース－Ｎ－アセチルグルコサミン（以下、Ｇａｌ－ＧｌｃＮＡｃと表記する）がα１－２結合またはα１－４結合している糖鎖が挙げられる。

[0120] 更にＧａｌ－ＧｌｃＮＡｃの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのＮ－アセチルグルコサミン（以下、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃと記す）などを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖を挙げることができる。

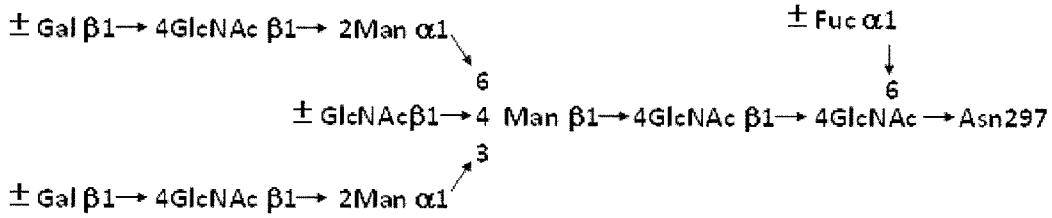
[0121] 本発明において、コアフコース（ｃｏｒｅ－ｆｕｃｏｓｅ）またはα１，

６－フコースとは、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミン（以下、ＧｌｃＮＡｃと記す場合もある）の６位とフコース（以下、Ｆｕｃと記す場合もある）の１位がα結合した糖鎖構造をいう。また、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していないことを、単にフコースが無いまたはコアフコースが無い糖鎖という。

[0122] また、本発明において、コア構造またはトリマンノシルコア構造（ｔｒｉ－ｍａｎｎｏｓｙｌ ｃｏｒｅ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）とは、Ｍａｎα１－６（Ｍａｎα１－３）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃ構造をいう。

[0123] 本発明のヘテロダイマータンパク質に結合している糖鎖として、２本鎖Ｎ－グリコシド結合コンプレックス糖鎖（バイアンテナリーコンプレックス糖鎖ともいう）は、下記化学式で示される。

[0124] [化1]



[0125] 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質分子の２９７位のＡｓｎにコンプレックス型糖鎖が結合したＦｃ領域を有するヘテロダイマータンパク質分子であって、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子から構成されていてもよい。

[0126] すなわち、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物とは、単一または複数の異なる糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物

を意味する。具体的には、ヘテロダイマータンパク質に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が２０％以上であるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

[0127] コアフコースが無い糖鎖の割合としては、ヘテロダイマータンパク質のＡＤＣＣ活性が増加すれば、いずれの割合のヘテロダイマータンパク質組成物も含まれるが、好ましくは２０％以上、より好ましくは５１％－１００％、更に好ましくは８０％－１００％、特に好ましくは９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、最も好ましくは１００％の割合が挙げられる。

[0128] コアフコースが無い糖鎖の割合が５０％とは、ヘテロダイマータンパク質分子の第１および第２ポリペプチドに結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の片方の糖鎖にフコースが結合していない分子が１００％含まれるヘテロダイマータンパク質組成物、またはヘテロダイマータンパク質分子の第１および第２ポリペプチドに結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合していない分子が５０％含まれかつヘテロダイマータンパク質分子の第１および第２ポリペプチドに結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合している分子が５０％含まれるヘテロダイマータンパク質組成物いずれも含まれる。

[0129] 本発明において、フコースが無い糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していなければ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

[0130] 本発明において、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない（コアフコースが無い）とは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していないヘテロダイマータンパク質体組成物とは、具体的には、後述に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度のヘテロダイマータンパク質組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の検出限界以下であること

をいう。全ての糖鎖にコアフコースが無いヘテロダイマータンパク質組成物は、最も高いＡＤＣＣ活性を有する。

[0131] Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖が結合したＦｃ領域を有するヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖を有するヘテロダイマータンパク質分子の割合は、ヘテロダイマータンパク質分子からヒドラジン分解または酵素消化などの公知の方法［生物化学実験法２３ー糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（１９８９）］を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識または同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。

[0132] また、コンプレックス糖鎖が結合したＦｃを含むヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖が結合したヘテロダイマータンパク質分子の割合は、遊離させた糖鎖をＨＰＡＥＤ－ＰＡＤ法（Ｊ．Ｌｉｑ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．，６，１５７７、１９８３）によって分析することで決定することができる。

[0133] ２）アミノ酸残基置換によるエフェクター活性の制御

本発明のヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマータンパク質を構成するＦｃの抗体サブクラスの変換またはＦｃのアミノ酸残基を置換することでＡＤＣＣ活性、ＡＤＣＰ活性およびＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。

[0134] 例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書および米国特許第７，３１７，０９１号明細書に記載のアミノ酸残基置換を行うことで、ヘテロダイマータンパク質のＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を増加させることも低下させることもできる。

[0135] ＡＤＣＣ活性を増強させる具体的なアミノ酸残基置換としては、Ｐ２４７Ｉ、Ａ３３９Ｄ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ、Ｐ３９６Ｌ、Ｔ３

９３Ａ、Ｈ４３３Ｐ、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２９８Ａ、Ａ３３０Ｌ、Ｉ３３２Ｅ、Ｅ３３３ＡおよびＫ３３４Ａなどが挙げられる。一方、ＡＤＣＣ活性を減少させる具体的なアミノ酸置残基置換としては、Ｌ２３５Ｅ、Ｐ２３８Ａ、Ｎ２９７Ａ、Ｋ３２２ＡおよびＰ３３１Ｓなどが挙げられる。

[0136] ＣＤＣ活性を増加させる具体的なアミノ酸残基置換としては、Ｋ３２６Ａ、Ｓ２６７Ｅ、Ｈ２６８Ｆ、Ｓ３２４Ｔ、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ｋ３２６Ｗ、Ｋ３２６Ｙ、Ｅ３３３Ａ、Ｅ３３３Ｓ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｙ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換が挙げられる。

[0137] いずれのアミノ酸残基置換を２つ以上組み合わせてＣＤＣ活性を増加させることもでき、目的に応じて置換するアミノ酸残基を増やすことができる。ＣＤＣ活性を増加させるアミノ酸残基置換として好ましくは、Ｎ２７６Ｋ、Ａ３３９Ｔ、Ｔ３９４ＦおよびＴ３９４Ｙから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基置換、Ｎ２７６ＫおよびＡ３３９Ｔのアミノ酸残基置換、並びにＫ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｙ３００Ｆ、Ａ３３９Ｔ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉのアミノ酸残基置などが挙げられる。一方、ＣＤＣ活性を減少させる具体的なアミノ酸残基置換としては、Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ａ、Ｋ３２２Ａ、Ｐ３２９ＡおよびＰ３３１Ｓなどが挙げられる。

[0138] またＴ２５０Ｑ、Ｍ４２８Ｌ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅなどのアミノ酸変異をヒトＩｇＧ１サブクラスのＦｃに導入することにより血中半減期を延長することができる。またＮ２９７位にアミノ酸変異を導入することによりＮ結合型糖鎖を除去したＦｃまたはヒトＩｇＧ２あるいはＩｇＧ４サブクラスのＦｃ、ＩｇＧ２とＩｇＧ４のキメラＦｃなどを用いることにより、ＡＤＣＣ活性、ＡＤＣＰ活性、ＣＤＣ活性などの細胞傷害活性を低下させることができる。

[0139] またヒトＩｇＧ１にＧ２３６Ｄ、Ｌ３２８Ｆ、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２６７Ｅな

どのアミノ酸変異を導入することにより、抑制性Ｆｃ受容体であるＦｃγＲＩＩｂへの結合活性を上昇させることができる。

[0140] 本発明のヘテロダイマータンパク質としては、上述のエフェクター活性が増加または低下されたヘテロダイマータンパク質いずれのものも包含される。

[0141] 本発明のＩｇＧ１型ヘテロダイマータンパク質として具体的には、ＩｇＧ１抗体のＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ１のＦｃとＣＬを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質であって、かつ以下（１）～（９）いずれか１つであるＩｇＧ１型ヘテロダイマータンパク質などが挙げられる。

（１）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｈ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（２）第１ポリペプチドはアミノ酸置換が無く、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（３）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（４）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２２０Ｓ、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（５）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換並びにＥＵインデックス２１６－２２０のＥＰＫＳＣの欠損を含むヘテロダイマータンパク質

（６）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（７）該第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓの置換を含み、該第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換並び

にＥＵインデックス２１６－２２０のＥＰＫＳＣの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

（８）該第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０Ｓ、Ｋ３２２ＡおよびＰ３３１Ｓの置換を含み、該第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｋ３２２Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換並びにＥＵインデックス２１６－２２０のＥＰＫＳＣの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

（９）該第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ２２０ＳおよびＩ３３２Ｅの置換を含み、該第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｉ３３２Ｅ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換並びにＥＵインデックス２１６－２２０のＥＰＫＳＣの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

[0142] また、本発明のＩｇＧ４型ヘテロダイマータンパク質として具体的には、ＩｇＧ４抗体のＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ４のＦｃとＣＬを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質であって、かつ以下（１）～（１０）のいずれか１つであるＩｇＧ４型ヘテロダイマータンパク質などが挙げられる。

（１）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（２）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（３）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１ＳおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（４）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓ、Ｓ２２８ＰおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（５）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５ＥおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質。

（６）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１ＳおよびＲ１３３Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（７）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１ＳおよびＲ１３３Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（８）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３ＫおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（９）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３Ｋ、Ｓ２２８ＰおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質

（１０）第１ポリペプチドはＥＵインデックスＣ１３１Ｓ、Ｒ１３３Ｋ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５ＥおよびＲ４０９Ｋの置換を含み、第２ポリペプチドは、Ｃ２１４Ｓ、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を含むヘテロダイマータンパク質。

[0143] （２）ヘテロダイマータンパク質の結合活性の制御

本発明のヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマー分子を構成するＣＨおよびＣＬ－Ｆｃ（以下、ヘテロダイマー足場構造タンパク質、ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ　ｓｃａｆｆｏｌｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ；ＨＳＰと記す場合がある）のそれぞれのポリペプチドのＮ末端およびＣ末端に分子特異的な結合タンパク質を結合させることで、一価～四価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質を作製することができる。

[0144] 従って、本発明のヘテロダイマータンパク質としては、ＣＨおよびＣＬ－ＦｃからなるＨＳＰを含むヘテロダイマータンパク質、ＨＳＰに少なくとも１つの結合タンパク質が結合したヘテロダイマータンパク質が挙げられる（図２Ａおよび図２Ｂ）。

[0145] 本発明の一価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、一価抗体、ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ　ａｎｔｉｂｏｄｙ、またはｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｙと記す場合もある）としては、ＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端にＶＨおよびＶＬをそれぞれ結合させた、第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドからなる一価抗体、ＣＨのＮ末端にｓｃＦｖを結合させた第１ポリペプチドとＣＬ－Ｆｃの第２ポリペプチドからなる一価抗体などが挙げられる。

[0146] 本発明の２価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、バイスペシフィック抗体または２価抗体と記す場合もある）としては、ＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端にそれぞれ、第１ｓｃＦｖおよび第２ｓｃＦｖを結合させた第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体、ＣＨのＮ末端にＶＨを結合させ、Ｃ末端にｓｃＦｖを結合させた第１ポリペプチドおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端にＶＬを結合させた第２ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体などが挙げられる（図２Ｂ）。また、上述一価抗体のＮ末端側にｓｃＦｖを結合させた２価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質も挙げられる。

[0147] 本発明の３価または４価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、３価抗体または４価抗体と記す場合もある）としては、ＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端およびＣ末端に、３から４個のｓｃＦｖを結合結合させた３価抗体または４価抗体などが挙げられる。また、上述一価抗体のＮ末端側に第１ｓｃＦｖ、第２ｓｃＦｖを結合させた３価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質も挙げられる。

[0148] 本発明の一価抗体は、１つのエピトープに結合することから、抗原のクロスリンケージ等の影響を引き起こすことが無く、抗原架橋に基く不要な活性

を引き起こすことが無い。

[0149] 以下に、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物の製造方法を具体的に説明する。

[0150] ３．ヘテロダイマータンパク質組成物の製造方法

本発明のヘテロダイマータンパク質の製造方法は、以下（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含む製造方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドをコードするＤＮＡ含むベクターおよびＣＨ結合体への結合活性が低下したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドをコードするＤＮＡを含むベクターを細胞へ導入する工程。

（ｉｉ）該細胞を培養し、培養上清を回収する工程。

（ｉｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させて精製する工程。

[0151] より具体的には、例えば、上述（ｉ）のヘテロダイマータンパク質を製造させるための生産細胞を作製する工程において、第１ポリペプチドにＥＵインデックスＣ１３１Ｓの置換、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４Ｓの置換、Ｃ２２０Ｓの置換、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換から選ばれるいずれか１つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに応じて適宜行うことが挙げられる。

[0152] より具体的には、例えば、第１ポリペプチドのＥＵインデックスＣ１３１Ｓの置換および第２ポリペプチドにＥＵインデックスＨ４３５Ｒの置換、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換、ＥＵインデックスＣ２２０ＳおよびＨ４３５Ｒの置換、またはＥＵインデックスＣ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を加える工程などが挙げられる。

[0153] また、本発明のヘテロダイマータンパク質の製造方法は、以下（ｉ）～（ｖ）の工程を含む製造方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第２ポリペプチドのＣＨ結合体

への結合活性を低下または欠損させる工程。

（ｉｉ）ヘテロダイマータンパク質の、ＣＨとＣＬとのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換させる工程。

（ｉｉｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドをコードするＤＮＡ含むベクターおよびＣＨ結合体への結合活性が低下したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドをコードするＤＮＡを含むベクターを細胞へ導入する工程。

（ｉｖ）該細胞を培養し、培養上清を回収する工程。

（ｖ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させ精製する工程。

[0154] 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，１９９３、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９６等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

[0155] （１）本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現ベクターの構築

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現ベクターとは、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子の第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターである。

[0156] ヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子の第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0157] 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータン

パク質分子を構成する第１ポリペプチドをコードする遺伝子は、抗体Ｈ鎖定常領域（ＣＨ）のＮ末端またはＣ末端に、所望の結合タンパク質のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列を作製することで作製することができる。

[0158] 同様にして、第２ポリペプチドをコードする遺伝子は、抗体Ｌ鎖定常領域（ＣＬ）とＦｃを融合させたＣＬ－ＦｃのＮ末端またはＣ末端に、所望の結合タンパク質のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列を作製することで、作製することができる。

[0159] また、合成ＤＮＡを用いて全ＤＮＡを合成することもでき、ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ（ＰＣＲ法）による合成も可能である（モレキュラー・クローニング第２版）。さらに、これらの手法を複数組み合わせることにより、ヘテロダイマータンパク質をコードする遺伝子を作製することもできる。

[0160] 本発明のヘテロダイマータンパク質として、具体的に一価の結合ドメインを有するＩｇＧ４型一価抗体を作製する場合は、ヒトＩｇＧ４抗体のＣＨのアミノ酸配列に、Ｃ１３１Ｓ／Ｒ１３３Ｋ／Ｓ２２８Ｐ／Ｌ２３５Ｅ／Ｒ４０９Ｋのアミノ酸置換を加えたアミノ酸配列を設計し、該ＩｇＧ４－ＣＨアミノ酸配列のＮ末端にＶＨのアミノ酸配列を連結した第１ポリペプチドのアミノ酸配列を作成する。

[0161] 一方、ヒトＣＬκのアミノ酸配列とヒトＩｇＧ４抗体のヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインのアミノ酸配列を連結したＩｇＧ４－ＣＬ－Ｆｃに、Ｃ２１４Ｓ／Ｓ２２８Ｐ／Ｌ２３５Ｅ／Ｒ４０９Ｋ／Ｈ４３５Ｒ／Ｙ４３６Ｆのアミノ酸置換を加えたアミノ酸配列を設計し、該アミノ酸配列のＮ末端にＶＬのアミノ酸配列を連結した第２ポリペプチドのアミノ酸配列を作成する。作成した第１ポリペプチドおよび第２ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列を作製し、動物細胞発現用ベクターに挿入し、本発明の一価抗体発現ベクターを作製することができる。

[0162] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐｃＤ

ＮＡＩ、ｐＣＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７［日本国特開平３－２２９７９号公報；Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］、ｐＡＳ３－３（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８［Ｎａｔｕｒｅ，３２９，８４０（１９８７）］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＮＡ３．１（インビトロジェン社製）、ｐＲＥＰ４（インビトロジェン社製）、ｐＡＧＥ１０３［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＡＧＥ２１０、ｐＭＥ１８ＳＦＬ３、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）、Ｎ５ＫＧ１ｖａｌ（米国特許第６，００１，３５８号明細書）およびＴｏｌ２トランスポゾンベクター（国際公開第２０１０／１４３６９８号）などが挙げられる。

[0163] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ（ＩＥ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター、またはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーターあるいはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0164] 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターは、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができる。

[0165] （２）抗体の可変領域をコードするｃＤＮＡの取得

任意の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは以下のようにして取得することができる。

[0166] 任意の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として用い、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージ或いはプラス

ミド等のベクターに挿入してｃＤＮＡライブラリーを作製する。

[0167] 前記ライブラリーより、既存の抗体の定常領域または可変領域をコードするＤＮＡをプローブとして用い、ＶＨをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよびＬ鎖可変領域をコードするｃＤＮＡを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の抗体のＶＨおよびＶＬの全塩基配列を決定し、塩基配列よりＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定する。

[0168] 任意の非ヒト動物抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、抗体が結合する抗原を非ヒト動物に免疫し、周知の方法［モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，１９９３、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９６］に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製する。次いでシングルセルクローニングしたハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

[0169] 非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスターまたはウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

[0170] ハイブリドーマ細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、例えば、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１５４，３（１９８７）］、ＲＮｅａｓｙ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）、また全ＲＮＡ

からｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法［モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９］等が挙げられる。

[0171] また、例えば、ハイブリドーマ細胞からｍＲＮＡを調製するキットとしては、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、Ｑｕｉｃｋ Ｐｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）等が挙げられる。

[0172] ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリー作製法としては、常法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ ＭｏｌｅｃｕｌａｒＢｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １－３４］、または市販のキット、例えば、Ｓｕｐｅｒ Ｓｃｒｉｐｔ（登録商標）Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）またはＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いる方法などが挙げられる。

[0173] ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターは、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

[0174] 例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，５８，１９９２）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１７，９４９４，１９８９）、λＺＡＰ ＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｉ，４９，１９８５）、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥ

ｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３　１８Ｕ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐｃＤ２（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３，２８０，１９８３）およびｐＵＣ１８（Ｇｅｎｅ，３３，１０３，１９８５）等を用いることができる。

[0175] ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌としては該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。

[0176] 例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ　ＭＲＦ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，８１，１９９２）、Ｃ６００（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，３９，４４０，１９５４）、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２２，７７８，１９８３）、ＮＭ５２２　ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６，１，１９８３）、Ｋ８０２（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６，１１８，１９６６）およびＪＭ１０５（Ｇｅｎｅ，３８，２７５，１９８５）等が用いられる。

[0177] ｃＤＮＡライブラリーからの非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡクローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ　ＮｅｗＹｏｒｋ，１９８９）により選択することができる。

[0178] また、プライマーを調製し、ｃＤＮＡ或いはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＰＣＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　１－３４）によりＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

[0179] 上記方法により選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断後、ｐ

Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、Ｓａｎｇｅｒらのジデオキシ法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，７４，５４６３，１９７７）等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７７ ＤＮＡシークエンサー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該ｃＤＮＡの塩基配列を決定することができる。

[0180] 決定した塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌＩｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬを完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

[0181] さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードするＤＮＡの塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

[0182] アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）を考慮して該可変領域をコードするＤＮＡの塩基配列を設計し、設計したＤＮＡの塩基配列に基づき、１００～１５０塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ法を行うか、完全長のＤＮＡを合成することで、ＤＮＡを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に上述と同様にしてＤＮＡを得ることができる。

[0183] （３）抗体の可変領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関

しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

[0184] （４）ヒト化抗体の可変領域をコードするｃＤＮＡの構築

ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築することができる。まず、目的の非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを移植するヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のものであれば、いかなるものでも用いることができる。

[0185] 例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ等のデータベースに登録されているヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）等が挙げられる。

[0186] その中でも、十分な活性を有するヒト化抗体を作製するためには、目的の非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも６０％以上）を有するアミノ酸配列を選択することが好ましい。

[0187] 次に、選択したヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列に目的の非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植し、ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ

ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）を考慮してＤＮＡの塩基配列に変換し、ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列を設計する。設計したＤＮＡの塩基配列を完全合成する。

[0188] また、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上述３（１）で構築した本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。ＰＣＲ後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、上述３（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列を有するプラスミドを取得する。

[0189] （５）ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト動物抗体に比べて低下してしまうことが知られている（ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，９，２６６，１９９１）。

[0190] この原因としては、元の非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬでは、ＣＤＲのみならず、ＦＲのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がＣＤＲの移植に伴い、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。

[0191] この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基またはＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元の非ヒト動物抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている（ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，９，２６

６，１９９１）。

[0192] ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにＸ線結晶解析（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１１２，５３５，１９７７）或いはコンピューターモデリング（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，１５０１，１９９４）等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。

[0193] これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来た。しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されていない。現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

[0194] ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸残基の改変は、改変用合成ＤＮＡを用いて３（４）に記載のＰＣＲ法を行うことにより、達成できる。ＰＣＲ後の増幅産物について３（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0195] （６）ヘテロダイマータンパク質の発現

上述３（１）のヘテロダイマータンパク質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより一過性または安定的にヘテロダイマータンパク質を生産する形質転換株を得ることができる。

[0196] 本発明のヘテロダイマータンパク質は、ＣＨ含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつＣＬとＣＨ１のジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質であり、該発現ベクターを導入した宿主細胞では、ヘテロダイマータンパク質の多重合体量が顕著に減少する。従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマー構造を効率的に形成する分子である。

[0197] また、本発明は、ＣＨ含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、ＣＬとＣＨ１のジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換することにより、ヘテロダイマータンパク質の多重合体を減少させる方法も含む。

[0198] （６－ａ）ヘテロダイマータンパク質の一過性発現

（３）および（６）で得られるヘテロダイマータンパク質発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いてヘテロダイマータンパク質の一過性発現を行い、作製した多種類のヘテロダイマータンパク質の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0199] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、ヘテロダイマータンパク質を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばＣＯＳ－７細胞［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）番号：ＣＲＬ１６５１］を用いる（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，２８３，１９９１）。

[0200] ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入には、ＤＥＡＥ－デキストラン法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，１９９１）、またはリポフェクション法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３，１９８７）などを用いる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヘテロダイマータンパク質の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを用いて測定する。

[0201] （６－ｂ）ヘテロダイマータンパク質の安定発現

（１）で得られたヘテロダイマータンパク質発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヘテロダイマータンパク質を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

[0202] 宿主細胞への発現ベクターの導入には、宿主細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３，１９９０）、リン酸カルシウム法（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８４，７４１３，１９８７）、インジェクション法［マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル］、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本国特許第２６０６８５６号明細書、日本国特許第２５１７８１３号明細書）、ＤＥＡＥ－デキストラン法［バイオマニュアルシリーズ４－遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編（１９９４）］、ウイルスベクター法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）等を挙げることができる。

[0203] ヘテロダイマータンパク質発現ベクターを導入する宿主細胞には、ヘテロダイマータンパク質を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。ヒト白血病細胞ナマルバ（Ｎａｍａｌｗａ）細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるＣＨＯ細胞、ＨＢＴ５６３７（日本国特開昭６３－２９９号公報）、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等を挙げることができる。

[0204] 具体的には、例えば、ＰＥＲ．Ｃ６、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｔ ＃ １１６１９）、Ｌｅｃ１３細胞、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ

１６６２、またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳ０、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８１）、マウスＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８０）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（Ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｒａｔｅ　Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ、以下、ｄｈｆｒと表記する）が欠損したＣＨＯ細胞（ＣＨＯ／ＤＧ４４）［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）］、シリアンハムスター細胞ＢＨＫ、ＨＢＴ５６３細胞、上述細胞株の亜株細胞および上述細胞株を無血清培養下で馴化した細胞、非接着条件下の培養条件で馴化した細胞などを用いることができる。

[0205] 本発明においてヘテロダイマータンパク質の生産に用いる細胞としては、ＦｃにおけるＥＵインデックス２９７のＡｓｎに結合する糖鎖のコアフコース量を低下または欠損させる細胞を用いることもできる。具体的には、ＧＤＰ－Ｌ－フコースの合成またはゴルジ体への輸送に関与する酵素またはコアフコースの結合に関与する酵素が低下または欠損した細胞を選択するか、または種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

[0206] 具体的には、コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素活性を減少または欠損させる方法、またはコアフコース切断酵素活性を増加させる方法など、コアフコースを制御した細胞を作製することができる。

[0207] コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素としては、ＧＤＰ－Ｌ－フコースの合成あるいは輸送に関与する酵素またはＮ－グリコシド結合複合型糖鎖のコアフコースの結合に関与する酵素が挙げられる。

[0208] ＧＤＰ－Ｌ－フコースの合成またはゴルジ体への輸送に関与する酵素としては、具体的には、ＧＤＰ－マンノース　４，６－デヒドラターゼ（以下、ＧＭＤと表記する）、ＧＤＰ－４－ケト－６－デオキシ－Ｄ－マンノース－３，５－エピメラーゼ（以下、Ｆｘと表記する）、ＧＤＰ－ベーター－Ｌ－フコース－ピロホスフォリラーゼ（ＧＦＰＰ）、フコキナーゼ、ＧＤＰ－Ｌ－フコーストランスポーターなどが挙げられる。

[0209] コアフコースの結合に関与する酵素としてはα１，６－フコシルトランスフェラーゼ（以下、ＦＵＴ８と表記する）などが挙げられる。

[0210] 本発明のヘテロダイマータンパク質を生産する細胞としては、上述の１つの酵素活性を低下または欠損させてもよいし、複数の酵素活性を組み合わせて低下または欠損させてもいずれでもよい。

[0211] 上述の酵素活性を低下または欠損させる方法としては、

（ａ）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法；

（ｂ）酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

（ｃ）酵素についての突然変異を導入する手法；

（ｄ）酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法；

（ｅ）Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

などが挙げられる。

[0212] レクチンとしては、レンズマメレクチンＬＣＡ（ＬｅｎｓＣｕｌｉｎａｒｉｓ由来のＬｅｎｔｉｌ　Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）エンドウマメレクチンＰＳＡ（Ｐｉｓｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ由来のＰｅａ　Ｌｅｃｔｉｎ）、ソラマメレクチンＶＦＡ（Ｖｉｃｉａｆａｂａ由来のＡｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ヒイロチャワンタケレクチンＡＡＬ（Ａｌｅｕｒｉａａｕｒａｎｔｉａ由来のＬｅｃｔｉｎ）などのα１，６フコースに結合するレクチンが挙げられる。

[0213] 具体的な細胞としては、例えば、ＦＵＴ８遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第２０００／０６１７３９号）、レクチン耐性を獲得したＬｅｃ１３（Ｓｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１２，５５，１９８６）、ＧＤＰ－フコーストランスポーター遺伝子が欠損した細胞（国際公開第２００３／０８５１０２号）、ＧＤＰ－ｍａｎｎｏｓｅ　４，６－ｄｅｈｙｄｒａｔａｓｅ（ＧＭＤ）遺伝子が欠損した細胞（国際公開第２００２／３１１４０号）、ＷＧＡレクチン耐性細胞お

よびＬＣＡレクチン耐性細胞（国際公開第２００２／３１１４０号）などを用いることもできる。

[0214] 上述の方法以外に、Ｎ結合型糖鎖の合成系に関する酵素であるｍａｎｎｏｓｉｄａｓｅ Ｉ，ｍａｎｎｏｓｉｄａｓｅ ＩＩなどの酵素を阻害することにより、ｈｉｇｈ ｍａｎｎｏｓｅ型のＮ結合型糖鎖が結合し、コアフコース量が減少したヘテロダイマータンパク質組成物を発現させることもできる。

[0215] また、Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ）を過剰発現させた宿主細胞を用いることで、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃが結合したコンプレックスおよびハイブリッド糖鎖が結合し、かつコアフコース量が減少したテロダイマータンパク質組成物を生産することもできる。

[0216] 発現ベクターの導入後、ヘテロダイマータンパク質を安定に発現する形質転換株は、Ｇ４１８硫酸塩（以下、Ｇ４１８と表記する）、シクロヘキシミド（以下、ＣＨＸと略記する）、メトトレキセート（以下、ＭＴＸと略記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平２－２５７８９１号公報）。

[0217] 動物細胞培養用培地には、ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０１培地、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２、ＥＸ－ＣＥＬＬ３２５培地（ＪＲＨ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にウシ胎児血清（以下、ＦＢＳと略記する）などの各種添加物を添加した培地などを用いることができる。

[0218] 得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヘテロダイマータンパク質を発現蓄積させる。培養上清中のヘテロダイマータンパク質の発現量および抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法などにより測定できる。また、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系（日本国特開平２－２５７８９１号公報）などを利用して、形質転換株の産生するヘテロダイマータンパク質の発現量を向上させる

ことができる。

[0219] 以上、動物細胞を宿主としたヘテロダイマータンパク質組成物の発現方法を示したが、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても、公知技術に基いて動物細胞と同様の方法によりヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

[0220] 酵母を宿主細胞とする場合は、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ａｌｌｕｖｉｕｓ等を挙げることができる。

[0221] 組換えベクターの導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法（Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１９４，１８２，１９９０）、スフェロプラスト法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），８４，１９２９，１９７８）、酢酸リチウム法（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ，１５３，１６３，１９８３）、（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），７５，１９２９，１９７８）に記載の方法等を挙げることができる。

[0222] 昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーＢａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９２）、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６，４７，１９８８等に記載された方法によって、ヘテロダイマータンパク質を発現することができる。

[0223] したがって、宿主細胞がヘテロダイマータンパク質分子を発現する能力を有する場合には、以下に示す宿主細胞にヘテロダイマータンパク質遺伝子を

導入した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とするヘテロダイマータンパク質組成物を精製することにより、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

[0224] さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造することもできる。

[0225] 形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、ヘテロダイマータンパク質組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、該ヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

[0226] 動物個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ），６３，６３９Ｓ，１９９６；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ，６３，６２７Ｓ，１９９６；Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９，８３０，１９９１］に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とするヘテロダイマータンパク質組成物を生産させる方法が挙げられる。

[0227] 動物個体の場合は、例えば、ヘテロダイマータンパク質分子をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、ヘテロダイマータンパク質組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中よりヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、ヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

[0228] 前記動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（日本国特開昭６３－３０９１９２号公報）または卵等を挙げることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロ

モーターおよびホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

[0229] 植物個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造する方法としては、例えばヘテロダイマータンパク質分子をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック植物を公知の方法［組織培養，２０（１９９４）；組織培養，２１（１９９５）；Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５，４５（１９９７）］に準じて栽培し、ヘテロダイマータンパク質組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、ヘテロダイマータンパク質組成物を生産する方法が挙げられる。

[0230] （７）ヘテロダイマータンパク質の精製

ヘテロダイマータンパク質発現ベクターを導入した宿主細胞を培養した場合、２本の第２ポリペプチドからなるホモダイマータンパク質と、第１ポリペプチドと第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質を産生する。本発明のヘテロダイマータンパク質は、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下または欠損したポリペプチドであるため、ＣＨ結合体に結合する第１ポリペプチドを含むヘテロダイマータンパク質のみが、特異的に分離、精製される。

[0231] 従って本発明で用いる精製方法としては、ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程とヘテロダイマータンパク質を溶出する工程を含む。すなわち本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法は、以下（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含む精製方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第２ポリペプチドのＣＨ結合体への結合活性を低下または欠損させる工程。

（ｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

（ｉｉｉ）ヘテロダイマータンパク質を溶出する工程。

[0232] より具体的には、例えば、上述（ｉ）のヘテロダイマータンパク質を製造

させるための生産細胞を作製する工程において、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４Ｓの置換、Ｃ２２０Ｓの置換、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換から選ばれるいずれか１つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに応じて適宜行うことが挙げられる。

[0233] より具体的には、例えば、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４ＳおよびＨ４３５Ｒの置換、ＥＵインデックスＣ２２０ＳおよびＨ４３５Ｒの置換またはＥＵインデックスＣ２１４Ｓ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を加える工程などが挙げられる。

[0234] また、本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法は、以下（ｉ）～（ｉｖ）の工程を含む精製方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第２ポリペプチドのＣＨ結合体への結合活性を低下または欠損させる工程。

（ｉｉ）ヘテロダイマータンパク質の、ＣＨとＣＬとのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換させる工程。

（ｉｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

（ｉｖ）ヘテロダイマータンパク質を溶出する工程。

[0235] 更に本発明では、上述の製造工程（ｉ）において、ＣＨとＣＬとのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換させることにより、本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成および／または多量体形成を低下させることもできる。

[0236] 本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法は、以下（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含むヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＦＬを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、ＥＵインデックスＲ４０９Ｋの置換を導入する工程。

（ｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

（ｉｉｉ）ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

[0237] 本発明は、以下（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含むヘテロダイマータンパク質の多量体形成を低下させる方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＦＬを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、ＣＨとＣＬとのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換させる工程。

（ｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

（ｉｉｉ）ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

[0238] 本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成および多量体形成を低下させる方法は、以下（ｉ）～（ｉｖ）の工程を含むヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法が挙げられる。

（ｉ）ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＦＬを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、ＣＨとＣＬとのジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基を欠損または置換させる工程。

（ｉｉ）ＥＵインデックスＲ４０９Ｋの置換を導入する工程。

（ｉｉｉ）ＣＨ結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

（ｉｖ）ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

[0239] より具体的には、例えば、上述（ｉ）または（ｉｉ）のヘテロダイマータンパク質を製造させるための生産細胞を作製する工程において、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４Ｓの置換、Ｃ２２０Ｓの置換、Ｒ４０９Ｋの置換およびＨ４３５Ｒの置換から選ばれるいずれか１つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに応じて適宜行うことが挙げられる。

[0240] より具体的には、例えば、第２ポリペプチドにＥＵインデックスＣ２１４Ｓ、Ｒ４０９ＫおよびＨ４３５Ｒの置換、ＥＵインデックスＣ２２０Ｓ、Ｒ４０９ＫおよびＨ４３５Ｒの置換またはＥＵインデックスＣ２１４Ｓ、Ｒ４０９Ｋ、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆの置換を加える工程などが挙げられる

。

[0241] 本発明のヘテロダイマータンパク質は以下のようにして精製することができる。ヘテロダイマータンパク質分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造されたヘテロダイマータンパク質組成物は、例えばヘテロダイマータンパク質分組成物が、細胞内に可溶性タンパク質として発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

[0242] 前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ ＨＰＡ－７５［三菱化学（株）製］等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティクロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

[0243] 本発明においては、アフィニティクロマトグラフィとして、ＣＨ結合体を用いたアフィニティクロマトグラフィが用いられる（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８）。

[0244] また、ヘテロダイマータンパク質組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿

画分としてヘテロダイマータンパク質組成物の不溶体を回収する。回収したヘテロダイマータンパク質組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ヘテロダイマータンパク質組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

[0245] ヘテロダイマータンパク質組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ヘテロダイマータンパク質組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

[0246] ＣＨ結合体またはＦｃ結合体として具体的には、ＣＨまたはＦｃに結合するものであればタンパク質、樹脂などいかなるものであってもよく、例えば、Ｆｃ結合タンパク質、抗体Ｈ鎖定常領域（ＣＨ）に結合する抗体などが挙げられる。

[0247] Ｆｃ結合タンパク質として、具体的には、例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ Ａｕｒｅｕｓ由来Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ、ｈｅｍｏｌｙｔｉｃ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ由来Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ、Ｆｃ受容体および該サブクラス（ＦｃγＲＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＩＡ、ＩＩＩＢ）並びにこれらの結合部分断片などが挙げられる。

[0248] ＣＨに結合する抗体としては、例えば、ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインまたはＣＨ３ドメインに結合する抗体が挙げられる。

[0249] 本発明においてＣＨ結合体としてより好ましくは、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ、抗ＣＨ１抗体および該結合部分断片が挙げられる。

[0250] 本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法として、具体的には、例えば、上述３（６）で作製した形質転換細胞株を用いて培養した培養上清を、Ｐｒｏｔｅｉｎ ＡカラムまたはＰｒｏｔｅｉｎ Ｇカラムのロードした後、該カラムをリン酸バッファー（ｐｈｏｓｐｈａｓｅ ｂｕｆｆｅｒ ｓａ

ｌｉｎｅ，以下ＰＢＳと略記する）を用いて洗浄する。

[0251] その後、低ｐＨ（ｐＨ２．０－６．０）のクエン酸バッファー等でカラムからヘテロダイマータンパク質を溶出させ、溶出液をアルカリ性のＴｒｉｓバッファー等で中和する。中和された溶出液は十分量のＰＢＳ等で透析を行い、精製されたヘテロダイマータンパク質を取得することができる。

[0252] 精製したヘテロダイマータンパク質分子の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法［Ｎａｔｕｒｅ，２２７，６８０（１９７０）］、またはウェスタンブロッティング法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］など用いて測定することができる。

[0253] ４．ヘテロダイマータンパク質組成物の活性評価

精製したヘテロダイマータンパク質組成物のタンパク量、ＦｃＲ結合活性、Ｃ１ｑ結合活性、抗原結合活性、またはＡＤＣＣ活性若しくはＣＤＣ活性等の細胞傷害活性を測定する方法としては、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ２ｎｄ Ｅｉｄｉｔｉｏｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏａｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，１９９３、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９６等に記載の公知の方法が挙げられる。

[0254] 具体的な例としては、ヘテロダイマータンパク質組成物の、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はＥＬＩＳＡ法および蛍光抗体

法（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３６，３７３，１９９３）等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、ＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性等を測定することにより、評価することができる［Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，３６，３７３，１９９３、米国特許出願公開第２００４／０２５９１５０号明細書］。

［0255］　本発明のヘテロダイマータンパク質組成物がＦｃＲへの結合活性を有することは、遺伝子組み換えＦｃγＲＩＩＩＡタンパク質または遺伝子組換え胎児ＦｃＲ（ｎｅｏｎａｔａｌ　Ｆｃ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ，ＦｃＲｎ）タンパク質を作製して、結合活性を測定することで確認することができる（米国特許出願公開２００４／０２５９１５０号明細書）。

［0256］　ＡＤＣＣ活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、ヘテロダイマータンパク質およびエフェクター細胞を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性等を測定する方法など挙げられる。

［0257］　ＣＤＣ活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、ヘテロダイマータンパク質および補体成分を含む血清等の生体試料を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性を測定する方法など挙げられる。

［0258］５．ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させたヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、ＩｇＧ分子に結合している糖鎖はガラクトース（Ｇａｌ）、マンノース（Ｍａｎ）若しくはフコース（Ｆｕｃ）などの中性糖、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）などのアミノ糖またはシアル酸（Ｓｉａｌ）などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

[0259] （１）中性糖・アミノ糖組成分析

ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

[0260] 具体的な方法として、例えば、Ｄｉｏｎｅｘ社製糖組成分析装置を用いる方法が挙げられる。ＢｉｏＬＣはＨＰＡＥＣ－ＰＡＤ（ｈｉｇｈ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ａｎｉｏｎ－ｅｘｃｈａｎｇｅ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－ｐｕｌｓｅｄ ａｍｐｅｒｏｍｅｔｒｉｃ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）法（Ｊ．Ｌｉｑ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．，６，１５７７，１９８３）によって糖組成を分析する装置である。

[0261] また、２－アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法［Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，５５（１），２８３－２８４，１９９１］に従って酸加水分解した試料を２－アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、ＨＰＬＣ分析して組成比を算出することができる。

[0262] （２）糖鎖構造解析

ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の構造解析は、２次元糖鎖マップ法［Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１７１，７３，１９８８、生物化学実験法２３－糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（１９８９年）］により行うことができる。２次元糖鎖マップ法は、例えば、Ｘ軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Ｙ軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

[0263] 具体的には、ヘテロダイマータンパク質をヒドラジン分解して、ヘテロダイマータンパク質から糖鎖を遊離し、２－アミノピリジン（以下、ＰＡと略記する）による糖鎖の蛍光標識（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，９５，１９７，１９８４）を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のＰＡ化試薬などと分離し

、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、２次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（ＴａＫａＲａ社製）、文献（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１７１，７３，１９８８）とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

[0264] さらに各糖鎖のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳなどの質量分析を行い、２次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

[0265] ヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域のいずれの部分に糖鎖が結合しているのかは、還元アルキル化処理したヘテロダイマータンパク質をトリプシン、ペプシン、Ｌｙｓ－Ｃ、Ａｓｐ－Ｎなどのエンドプロテアーゼで処理したものを、逆相クロマトグラフィー（ＬＣ）で分離した後に、質量分析計（ＭＳ）などで分析することにより確認できる。

[0266] 即ち、目的とするヘテロダイマータンパク質のＦｃ領域のアミノ酸配列に基き、プロテアーゼ処理により生成しうるペプチドの分子量および糖鎖が結合したペプチドの分子量と、ＭＳの分析値が一致するか否かにより、実際に糖鎖が結合しているか否かを確かめることができる。

[0267] ６．ヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の識別方法

ヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質Ｆｃの２９７位のＡｓｎに結合する糖鎖構造が異なったヘテロダイマータンパク質分子から構成されている。本発明のヘテロダイマータンパク質組成物のＦｃに結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、コアフコースの無い糖鎖の割合が２０％以上であるヘテロダイマータンパク質組成物は、高いＡＤＣＣ活性を示す。このようなヘテロダイマータンパク質組成物は、上記５．に記載のヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

[0268] レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いたヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の識別は、文献［モノクローナル・アンティボディズ：プリン

シプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，（１９９５）；酵素免疫測定法，第３版，医学書院（１９８７）；改訂版，酵素抗体法，学際企画（１９８５）］等に記載のウエスタン染色、ＲＩＡ（Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＶＩＡ（Ｖｉｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＥＩＡ（Ｅｎｚｙｍｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＦＩＡ（Ｆｌｕｏｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＭＩＡ（Ｍｅｔａｌｌｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

[0269] ヘテロダイマータンパク質組成物含まれるヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料であるヘテロダイマータンパク質組成物を反応させる。次に、標識したレクチンとヘテロダイマータンパク質分子の複合体の量を測定する。

[0270] ヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、ＷＧＡ（Ｔ．ｖｕｌｇａｒｉｓ由来のｗｈｅａｔ－ｇｅｒｍ ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＣｏｎＡ（Ｃ．ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ由来のｃｏｎｃａｎａｖａｌｉｎ Ａ）、ＲＩＣ（Ｒ．ｃｏｍｍｕｎｉｓ由来の毒素）、Ｌ－ＰＨＡ（Ｐ．ｖｕｌｇａｒｉｓ由来のｌｅｕｋｏａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＬＣＡ（Ｌ．ｃｕｌｉｎａｒｉｓ由来のｌｅｎｔｉｌ ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＰＳＡ（Ｐ．ｓａｔｉｖｕｍ由来のＰｅａ ｌｅｃｔｉｎ）、ＡＡＬ（Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＡＣＬ（Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ ｃａｕｄａｔｕｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＢＰＬ（Ｂａｕｈｉｎｉａ ｐｕｒｐｕｒｅａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＤＳＬ（Ｄａｔｕｒａ ｓｔｒａｍｏｎｉｕｍ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＤＢＡ（Ｄｏｌｉｃｈｏｓ ｂｉｆｌｏｒｕｓ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＥＢＬ（Ｅｌｄｅｒｂｅｒｒｙ Ｂａｌｋ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＥＣＬ（Ｅｒｙｔｈｒｉｎａ ｃｒｉｓｔａｇａｌｌｉ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＥＥＬ（Ｅｕｏｎｙｍｕｓ ｅｕｒｏｐａｅｕｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＧＮＬ（Ｇａｌａｎｔｈｕｓ ｎｉｖａｌｉｓ

Ｌｅｃｔｉｎ）、ＧＳＬ（Ｇｒｉｆｆｏｎｉａ ｓｉｍｐｌｉｃｉｆｏｌｉａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＨＰＡ（Ｈｅｌｉｘ ｐｏｍａｔｉａ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＨＨＬ（Ｈｉｐｐｅａｓｔｒｕｍ Ｈｙｂｒｉｄ Ｌｅｃｔｉｎ）、Ｊａｃａｌｉｎ、ＬＴＬ（Ｌｏｔｕｓ ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＬＥＬ（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＭＡＬ（Ｍａａｃｋｉａ ａｍｕｒｅｎｓｉｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＭＰＬ（Ｍａｃｌｕｒａ ｐｏｍｉｆｅｒａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＮＰＬ（Ｎａｒｃｉｓｓｕｓ ｐｓｅｕｄｏｎａｒｃｉｓｓｕｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＰＮＡ（Ｐｅａｎｕｔ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、Ｅ－ＰＨＡ（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ Ｅｒｙｔｈｒｏａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＰＴＬ（Ｐｓｏｐｈｏｃａｒｐｕｓ ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＲＣＡ（Ｒｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＳＴＬ（Ｓｏｌａｎｕｍ ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＳＪＡ（Ｓｏｐｈｏｒａ ｊａｐｏｎｉｃａ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＳＢＡ（Ｓｏｙｂｅａｎ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＵＥＡ（Ｕｌｅｘ ｅｕｒｏｐａｅｕｓ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＶＶＬ（Ｖｉｃｉａ ｖｉｌｌｏｓａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ＷＦＡ（Ｗｉｓｔｅｒｉａ ｆｌｏｒｉｂｕｎｄａ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）が挙げられる。

[0271] コアフコースを特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、具体的には、例えば、レンズマメレクチンＬＣＡ（Ｌｅｎｓ Ｃｕｌｉｎａｒｉｓ由来のＬｅｎｔｉｌ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）エンドウマメレクチンＰＳＡ（Ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ由来のＰｅａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ソラマメレクチンＶＦＡ（Ｖｉｃｉａ ｆａｂａ由来のＡｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）およびヒイロチャワンタケレクチンＡＡＬ（Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ由来のＬｅｃｔｉｎ）を挙げることができる。

[0272] ７．本発明のヘテロダイマータンパク質組成物の使用

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質分子を構成するＣＨおよびＣＬ－Ｆｃ（ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ ｓｃａｆ

ｆｏｌｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ；ＨＳＰ）のＮ末端およびＣ末端に分子特異的な結合タンパク質を結合させることで、一価から四価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質を作製することができる。

[0273] 従って、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、標的とする抗原に合わせた分子形体を用いることができるため、ヘテロダイマータンパク質医薬品になる。

[0274] 例えば、本発明のヘテロダイマータンパク質が一価の結合ドメインを有する一価抗体の場合には、標的のエピトープに対して１：１で結合するため、抗原のクロスリンケージをすること無く、抗原を活性化また抗原の活性を阻害することができる。

[0275] また本発明のヘテロダイマータンパク質が２価の結合活性を有する２価抗体（バイスペシフィック抗体ともいう）の場合には、２個のエピトープに結合することで、２抗原のクロスリンケージを引き起こしたり、別々の細胞上に発現する２抗原に結合することで、細胞－細胞のクロスリンケージを引き起こすことができる。

[0276] また、本発明のヘテロダイマータンパク質が、細胞－細胞間のクロスリンケージする場合は、標的細胞上の抗原と、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球および肥満細胞などの細胞表面上の抗原をクロスリンケージすることにより、標的細胞付近へ種々の免疫担当細胞を集積、活性化させることができる。

[0277] 本発明のヘテロダイマータンパク質が結合する抗原としては、いずれの抗原であってもよく、好ましくは癌、免疫疾患、アレルギー疾患または循環器疾患等に関する抗原分子が挙げられる。例えば、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子および該受容体並びにＣＤ抗原などが挙げられる。

[0278] サイトカインあるいは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、ＩＮＦと記す）－α、ＩＮＦ－β、ＩＮＦ－γ、インターロイキン（以下、ＩＬと記す）－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４　、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－

１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）および該受容体などが挙げられる。

[0279] ケモカインとしては、例えば、ＳＬＣ、ＥＬＣ、Ｉ－３０９、ＴＡＲＣ、ＭＤＣ、ＭＩＰ－３α、ＣＴＡＣＫおよび該ケモカインの受容体が挙げられる。

[0280] 増殖因子としては、例えば、Ｅｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ（ＥＧＦ）、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＶＥＧＦ）、ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＦＧＦ）、ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＨＧＦ）、ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＰＤＧＦ）、ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＩＧＦ）、ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ（ＥＰＯ）、ＴＧＦβ、Ｉｅｐｈｒｉｎ、ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ、Ｆｒｉｚｚｌｅｄ ｌｉｇａｎｄ、ＳＤＦ－１および該受容体などが挙げられる。

[0281] Ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（以下、ＣＤと記載する）抗原としては、例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ７、ＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ２８、ＣＤ３２、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５２、ＣＤ６４、ＣＤ５３、ＣＤ５６、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９８、ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ（ＨＬＡ）－Ｃｌａｓｓ ＩＩおよびＨＬＡ－Ｉなど挙げられる。

[0282] 更に、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原

としては、例えば、ガングリオシドGM1、GM2、GD2、GD3、Ｌｅｗｉｓ Ｘ、Ｌｅｗｉｓ Ｙ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド、Ｂ７ファミリー分子（例えば、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ２７４、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、またはＢ７－Ｈ４）、Ｂ７ファミリー分子のリガンド（例えば、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、またはＢＴＬＡ）、ＯＸ－４０、ＯＸ－４０リガンド、ＣＤ１３７、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）受容体ファミリー分子（例えば、ＤＲ３、ＤＲ４、ＤＲ５、ＴＮＦＲ１、またはＴＮＦＲ２）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＴＲＡＩＬ）ファミリー分子、ＴＲＡＩＬファミリー分子の受容体ファミリー（例えば、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、またはＴＲＡＩＬ－Ｒ４）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ ｋａｐｐａ Ｂ ｌｉｇａｎｄ（ＲＡＮＫ）、ＲＡＮＫリガンド、ＣＤ２５、葉酸受容体、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、サイトカイン［例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＴＧＦ）β、またはＴＮＦαなど］、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン（例えば、ＳＬＣ、ＥＬＣ、Ｉ－３０９、ＴＡＲＣ、ＭＤＣ、またはＣＴＡＣＫなど）、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0283] 一価抗体の適した標的分子として二量体化または凝集などで活性化される抗原が挙げられる。そのような性質を有する分子として、例えば、酵素連結型受容体および細胞接着分子などが挙げられる。酵素連結型受容体には受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ会合型受容体、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸環化酵素が含まれる。

[0284] 受容体チロシンキナーゼとしては、例えば、ＥＧＦ受容体、インスリン受容体、ＩＧＦ－１受容体、ＮＧＦ受容体、ＰＤＧＦ受容体、Ｍ－ＣＳＦ受容体、ＦＧＦ受容体、ＶＥＧＦ受容体およびＥｐｈ受容体などが挙げられる。

チロシンキナーゼ会合型受容体としては、例えば、サイトカイン受容体およびＦｃ受容体などが挙げられる。また、細胞接着分子としては、例えば、カドヘリンおよびインテグリンなどが挙げられる。

[0285] 具体的には、例えば、ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ １（ＩＬ－１Ｒ１）、ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｃｅｓｓｏｒｙ ｐｒｏｔｅｉｎ（ＩＬ－１ＲＡＰ）、ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ｃ－Ｍｅｔ）、ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ １ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＲＯＮ）、ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＰＤＧＦＲ）、ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ ａｄｈｅｓｉｏｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅ－ｌｉｋｅ（ＪＡＭＬ）、ｎｅｃｔｉｎ－ｌｉｋｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ５（Ｎｅｃｌ－５）、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ １（ＴＮＦ－Ｒ１）、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ２（ＴＮＦ－Ｒ２）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ １（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ２（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、ｄｅａｔｈ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ３（ＤＲ３）、ｄｅａｔｈ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ６（ＤＲ６）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ＮＦ－ｋＢ（ＲＡＮＫ）、ｎｅｒｖｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＮＧＦＲ）、ｌｙｍｐｈｏｔｏｘｉｎ－ｂｅｔａ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＬＴβＲ）、ＯＸ４０（ＴＮＦＲＳＦ４）、Ｆａｓ（ＴＮＦＲＳＦ６）、４－１ＢＢ（ＴＮＦＲＳＦ９）、Ｆｎ１４（ＴＮＦＲＳＦ１２Ａ）、ＴＡＣＩ（ＴＮＦＲＳＦ１３Ｂ）、ＢＡＦＦ－Ｒ（ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ）、ＨＶＥＭ（ＴＮＦＲＳＦ１４）、ＢＣＭＡ（ＴＮＦＲＳＦ１７）、ＧＩＴＲ（ＴＮＦＲＳＦ１８）、ＴＲＯＹ（ＴＮＦＲＳＦ１９）、ｅｃｔｏｄｙｓｐｌａｓｉｎ Ａ１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＤＡＲ）、ｅｃｔｏｄｙｓｐｌａｓｉｎ Ａ２ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＸＥＤＡ

Ｒ）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｉｎ ｌｙｍｐｈｏｉｄ ｔｉｓｓｕｅｓ（ＲＥＬＴ）、ＣＤ３、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＦｃαＲＩ、ＦｃγＲＩＩＩおよびＦｃεＲＩ、などが挙げられる。

[0286] 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つまたはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

[0287] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましい。例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与を挙げることができ、ヘテロダイマータンパク質製剤の場合、好ましくは静脈内投与を挙げることができる。

[0288] 投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等が挙げられる。

[0289] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。

[0290] 乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコール等のグリコール類、ごま油若しくはオリーブ油、大豆油等の油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

[0291] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトール等の賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、またはグリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

[0292] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤、噴霧剤等が挙げられる。

[0293] 注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液または両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、ヘテロダイマータンパク質組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

[0294] 座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

[0295] また、噴霧剤は該ヘテロダイマータンパク質組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該ヘテロダイマータンパク質組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

[0296] 担体として、具体的には、乳糖、グリセリン等が例示される。該ヘテロダイマータンパク質組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0297] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇである。

[0298] また、ヘテロダイマータンパク質組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、ＣＤＣ活性測定法、ＡＤＣＣ活性測定法等が挙げられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等が挙げられる。

実施例

[0299] ［実施例１］ヘテロダイマータンパク質発現ベクターの作製

（１）Ｈ鎖定常領域へのアミノ酸改変の導入

ヒトＩｇＧ１ＣＨ（Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０００；３７：１０３５）およびヒトＩｇＧ４ＣＨ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２００５；３０６：１５１）のアミノ酸配列（配列番号２、４）（ＤＮＡの塩基配列：配列番号１、３）のＣ末端にヒスチジン６残基（以下、Ｈｉｓタグと

記す）を結合させたアミノ酸配列ＩｇＧ１－ＣＨおよびＩｇＧ４－ＣＨ（図３Ａ、図３Ｂ）をデザインし（配列番号６、８）、アミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列を作製した（配列番号５、７）。該ＤＮＡの塩基配列の５’末端および３’末端に制限酵素ＡｐａＩと制限酵素ＢａｍＨＩの認識配列を挿入しＩｇＧ１－ＣＨおよびＩｇＧ４－ＣＨのＤＮＡ断片を作製した。

[0300] 作製したＩｇＧ１－ＣＨ断片、ＩｇＧ４－ＣＨ断片およびプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ－（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を制限酵素ＡｐａＩおよび制限酵素ＢａｍＨＩで酵素処理を行った後、それぞれライゲーション反応を行ない、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ－ベクターに各断片を挿入して、ＩｇＧ１－ＣＨベクターおよびＩｇＧ４－ＣＨベクターを作製した。

[0301] アミノ酸残基置換を含むＣＨは、それぞれ作製したＩｇＧ１－ＣＨおよびＩｇＧ４－ＣＨベクターを鋳型として、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）ＩＩ ＸＬ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用いて表１に示すアミノ酸残基置換を含むＩｇＧ１－ＣＨベクターおよびアミノ酸残基置換を含むＩｇＧ４－ＣＨベクターを作製した。ＩｇＧ１においてヒンジドメインに存在する２２０位のＣｙｓ残基は、Ｌ鎖中のＣｙｓ残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られているため、Ｓｅｒに置換することでジスルフィド結合の除去を行った。

[0302] 一方、ＩｇＧ４においてはＣＨ１ドメインに存在する１３１位のＣｙｓ残基は、Ｌ鎖中のＣｙｓ残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られている。ＩｇＧ１の１３１位および１３３位はＳｅｒ残基およびＬｙｓであることから、ジスルフィド結合の除去と抗原性を低下させるために、ＣＨ１－ＣＬ間のジスルフィド結合に関与するＣｙｓ残基を含む部分配列Ｃ１３１／Ｒ１３３を、ＩｇＧ１型の配列にするためにＣ１３１Ｓ／Ｒ１３３Ｋのアミノ酸残基置換をＩｇＧ４型一価抗体へ加えた。

[0303] また、ＩｇＧ４においてヒンジドメインに存在する２２８位のＳｅｒ残基

とＣＨ３ドメインに存在する４０９位のＡｒｇ残基は、ＩｇＧ４特有のＦａｂ－ａｒｍ　ｅｘｃｈａｎｇｅに関与することが知られている。ＩｇＧ１においては２２８位はＰｒｏ、４０９位はＬｙｓであるため、Ｆａｂ－ａｒｍ　ｅｘｃｈａｎｇｅを抑制するために、Ｓ２２８ＰおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換をＩｇＧ４型一価抗体のＨ鎖に加えた。また、ＩｇＧ４におけるＬ２３５Ｅアミノ酸残基置換はエフェクター活性を低下させることができる。

[0304] 以下、特に断りの無い場合は、アミノ酸配列は、Ｋａｂａｔ　らによるＥＵインデックス［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ　Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］に基いて１文字で表記した。また、置換する前のアミノ酸残基を数字の前に、置換した後のアミノ酸残基を数字の後に記載した。各ＩｇＧ　Ｈ鎖のＤＮＡの塩基配列を、それぞれ配列番号９、１１、１３、１５、１７および１９に示す。

[0305] [表1]

［表１］CHに導入したアミノ酸置換

配列名	DNA 配列番号	ﾀﾝﾊﾟｸ質 配列番号	ｻﾌﾞｸﾗｽ	CH1	ﾋﾝｼﾞ	CH2	CH3
1H0	9	10	IgG1	-	-	-	-
1H1	11	12	IgG1	-	C220S	-	-
4H0	13	14	IgG4	-	-	-	-
4H1	15	16	IgG4	C131S/R133K	-	-	-
4H2	17	18	IgG4	C131S/R133K	S228P	-	R409K
4H3	19	20	IgG4	C131S/R133K	S228P	L235E	R409K

[0306] （２）ヒトκ鎖定常領域（ＣＬ）とＩｇＧ抗体Ｆｃが融合した人工定常領域へのアミノ酸改変の導入

ヒトκ鎖定常領域（配列番号５７、５８）のＣ末端に、ヒトＩｇＧ１またはヒトＩｇＧ４の定常領域のヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの順に結合させたＣＬ－Ｆｃのアミノ酸配列をデザインし（以下、ＩｇＧ１－Ｌ、ＩｇＧ４－Ｌと記す）（配列番号２２、配列番号２６）（図４Ａ、図４Ｂ）、該アミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列（配列番号

２１、配列番号２５）を作製した。以下、ＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドをＬ鎖と記載する場合がある。

[0307] 尚、ＩｇＧ１－Ｌにおいては、ヒンジドメインのＮ末端から５アミノ酸残基に当たるＥＵインデックス２１６位から２２０位のアミノ酸残基ＥＰＫＳＣを削除したヒンジドメインを用いた（図４Ａ）。先に記載したように、ＩｇＧ１のヒンジドメイン中には、Ｌ鎖との分子間ジスルフィド結合に関与するＣｙｓ残基が存在するため、これを除去するためにＥＰＫＳＣを削除した。

[0308] 次に、ＣＬ－Ｆｃの３’末端に、ｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクター（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２００５；３０６：１５１）に含まれるＬ軽鎖の３’－ｕｎｔｒａｎｓｌａｔｅｄ ｒｅｇｉｏｎ（ＵＴＲ）および制限酵素ＫｐｎＩの認識配列を結合させ、更に５’末端に、制限酵素ＢｓｉＷＩの認識配列を結合させた遺伝子配列を作製した。

[0309] 作製したＢｓｉＷＩ－ＫｐｎＩ遺伝子断片をＴａｒｇｅｔ ＣｌｏｎｅＰｌｕｓ－キット（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて、キットに添付されたｐＴＡ２ベクター（ＴＯＹＯＢＯ社製）でクローニングを行い、ＩｇＧ１－Ｌベクターおよびｐ１ｇＧ４－Ｌベクターを作製した。

[0310] ヒトκ鎖の２１４位のＣｙｓ残基は、Ｈ鎖中のＣｙｓ残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られているため、Ｓｅｒに置換することでジスルフィド結合の除去を行った。また、ＩｇＧ１およびＩｇＧ４のＣＨ３ドメインに存在する４３５位のＨｉｓ残基および４３６位のＴｙｒ残基は抗体のプロテインＡ結合に関与していることが知られている。

[0311] プロテインＡ結合活性が無いＩｇＧ３の４３５位および４３６位はＡｒｇおよびＰｈｅであるため、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換をＬ鎖に導入することによって、一価抗体ＣＬ－Ｆｃ鎖のプロテインＡ結合活性が低下する。

[0312] ＩｇＧ１－ＬベクターおよびＩｇＧ４－Ｌベクターを鋳型として、表２に記載のアミノ酸置換を含むＣＬ－ＦｃをＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）

ＩＩＸＬ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用いて作製した。各ＣＬ－ＦｃのＤＮＡの塩基配列を、それぞれ配列番号２１、２３、２５、２７、２９、３１および３３に示す。

[0313] [表2]

[表2] CL-Fcに導入したｱﾐﾉ酸置換

配列名	DNA 配列番号	ﾀﾝﾊﾟｸ質 配列番号	ｻﾌﾞｸﾗｽ	CH1	ﾋﾝｼﾞ	CH2	CH3
1L0	21	22	IgG1	-	欠失 (216-220)	-	-
1L1	23	24	IgG1	C214S	欠失 (216-220)	-	H435R/Y436F
4L0	25	26	IgG4	-	-	-	-
4L1	27	28	IgG4	C214S	-	-	-
4L2	29	30	IgG4	C214S	-	-	H435R/Y436F
4L3	31	32	IgG4	C214S	S228P	-	R409K/H435R/Y436F
4L4	33	34	IgG4	C214S	S228P	L235E	R409K/H435R/Y436F

[0314] （３）一価抗体発現ベクターの作製

上述、実施例１（１）および（２）において作製したＣＨおよびＣＬ－Ｆｃに、ＩｇＧ抗体のＨ鎖可変領域（ＶＨ）およびＬ鎖可変領域（ＶＬ）を結合させた、一価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、一価抗体と略記する）を以下のようにして作製した。以下、第１ポリペプチドをＨ鎖、第２ポリペプチドをＬ鎖と記載する場合がある。

[0315] ＣＨおよびＣＬ－Ｆｃに結合させる結合タンパク質は、抗ＣＤ２０抗体ヒト化Ｂ－Ｌｙ１（Ｂ－ＨＨ２とＢ－ＫＶ１、以降ＧＡ１０１と記載）（日本国特許第２０１０－８１９４０号明細書）および抗ＨＥＲ２抗体ｈｕｍＡｂ４Ｄ５－８（以降４Ｄ５とも記載）（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，１９９２；８９：４２８５）の可変領域を用いた。ＤＮＡの塩基配列およびアミノ酸配列は、ＧＡ１０１－ＶＨ（配列番号３５、３６）、ＧＡ１０１－ＶＬ（配列番号３７、３８）、４Ｄ５－ＶＨ（配列番号３９、４０）および４Ｄ５－ＶＬ（配列番号４１、４２）を用いた。

[0316] ＧＡ１０１抗体および４Ｄ５抗体のＶＨのアミノ酸配列をコードするＤＮ

Ａの塩基配列の５’末端に、制限酵素ＮｏｔＩの認識配列、また３’末端に制限酵素ＡｐａＩの認識配列を結合したＤＮＡの塩基配列を作製し、ｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクター（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２００５；３０６：１５１）のＮｏｔＩ－ＡｐａＩサイトに挿入した。

[0317] この結果、抗ＣＤ２０ヒト化抗体ＶＨを含む発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ＧＡ１０１－ＶＨおよび抗ＨＥＲ２ヒト化抗体ＶＨを含む発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／４Ｄ５－ＶＨを作製した。

[0318] 次に、ＧＡ１０１抗体および４Ｄ５抗体のＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列の５’末端に、制限酵素ＢｓｉＷＩの認識配列、また３’末端に制限酵素ＫｐｎＩの認識配列を結合したＤＮＡの塩基配列を作製し、それぞれｐＫＡＮＴＥＸ９３／ＧＡ１０１－ＶＨベクターまたはｐＫＡＮＴＥＸ９３／４Ｄ５－ＶＨベクターのＮｏｔＩ－ＡｐａＩサイトに挿入した。

[0319] この結果、抗ＣＤ２０ヒト化抗体ＧＡ１０１発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ＧＡ１０１および抗ＨＥＲ２ヒト化抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｈｕｍＡｂ４Ｄ５－８を取得した。

[0320] 抗ＣＤ２０ヒト化抗体ＧＡ１０１発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ＧＡ１０１および抗ＨＥＲ２ヒト化抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｈｕｍＡｂ４Ｄ５－８のＡｐａＩ－ＢａｍＨＩサイトに含まれるＣＨを、上述実施例１（１）で作製した各種ＩｇＧ１－ＣＨまたはＩｇＧ４－ＣＨと置換した。

[0321] 次に、該発現ベクターのＢｓｉＷＩ－ＫｐｎＩサイトに含まれるＣＬを、上述実施例１（２）で作製したＣＬにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを融合した各種ＣＬ－Ｆｃに置換した。

[0322] その結果、ＶＨ－ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＶＬ－ＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなる、各種一価抗体発現ベクターを作製した（表３）。また、各種一価抗体分子の構造を図５に示す。

[0323]

[表3]

［表３］　各種一価抗体の可変領域・CH・CL-Fcの組合せ一覧

可変領域	CH	CL-Fc	発現ﾍﾞｸﾀｰ
humAb4D5-8	1H0	1L0	pKANTEX93/mvG1-1
GA101	1H1	1L1	pKANTEX93/mvG1-2
humAb4D5-8	4H0	4L0	pKANTEX93/mvG4-1
humAb4D5-8	4H1	4L1	pKANTEX93/mvG4-2
humAb4D5-8	4H1	4L2	pKANTEX93/mvG4-3
humAb4D5-8	4H2	4L3	pKANTEX93/mvG4-4
humAb4D5-8	4H3	4L4	pKANTEX93/mvG4-5

[0324] ［実施例２］バイスペシフィックヘテロダイマータンパク質発現ベクターの作製

２価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、バイスペシフィック抗体と記す）を作製するために、ＣＨのＮ末端にＶＨが結合した第１ポリペプチド、並びにＣＬ－ＦｃのＮ末端にＶＬが結合しかつＣ末端にｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ（ｓｃＦｖ）型可変領域が結合した第２ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体をデザインした（図６、図７）。

[0325] 該バイスペシフィック抗体は、ＶＨ－ＶＬからなる結合ドメインがＣＤ７４特異的に結合し、第２ポリペプチドのＣ末端に連結したｓｃＦｖがＨｅｒ２またはＣＤ２０に特異的に結合する２価結合活性を有する。バイスペシフィック抗体は以下のようにして作製した。

[0326] （１）抗ＣＤ７４抗体発現ベクターの作製

抗ＣＤ７４抗体は、公知の抗ＣＤ７４ヒト化抗体　ｈＬＬ１（米国特許第７，３１２，３１８号明細書）を用いた（配列番号４３－４６）。抗ＣＤ７４ヒト化抗体ｈＬＬ１のＶＨおよびＶＬの、５’末端および３’末端に、上述実施例１（３）と同様にして制限酵素認識配列を結合させ、ｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターに挿入することで、抗ＣＤ７４ヒト化抗体発現ベクターｐＫ

ＡＮＴＥＸ９３／ｈＬＬ１を作製した。

[0327] （２）抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体発現ベクターの作製

実施例２（１）と同様に、抗ＣＤ７４ヒト化抗体ｈＬＬ１抗体のＶＨおよびＶＬのＤＮＡ断片を調製し、実施例１（３）で作製したｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＧ４－４ベクターのＮｏｔＩ－ＡｐａＩサイトおよびＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩサイト挿入を行った。その結果、抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／Ｇ４－４／ｈＬＬ１を作製した。

[0328] （３）ＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体およびＣＤ７４－ＣＤ２０バイスペシフィック抗体発現ベクターの作製

上述実施例２（２）において作製した抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体の第２ポリペプチドのＣ末端に、抗ＨＥＲ２ｓｃＦｖまたは抗ＣＤ２０　ｓｃＦｖを融合させたＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体およびＣＤ７４－ＣＤ２０バイスペシフィック抗体を作製するために、ＣＬ－ＦｃとｓｃＦｖ　とを［Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ］×３、１５アミノ酸残基からなるリンカー（以下、ＧＳリンカーと記す）（配列番号４７、４８）で連結し、ＣＬ－Ｆｃ－ｌｉｎｋｅｒ－ＶＨ－ｌｉｎｋｅｒ－ＶＬ（図６、図７）をデザインした。また各ｓｃＦｖを以下のように作製した。

[0329] 抗ＨＥＲ２抗体は、上述実施例１（３）に記載の抗ＨＥＲ２ヒト化抗体４Ｄ５－８のＶＨおよびＶＬの配列を使用し、抗ＣＤ２０抗体は、抗ＣＤ２０抗体２Ｆ２（米国特許出願公開第２００４／０１６７３１９号明細書）のＶＨおよびＶＬの配列（配列番号４９－５２）を使用した。

[0330] 抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／Ｇ４－４／ｈＬＬ１のＣＬ－Ｆｃの終止コドンを欠損させ、続けて、ＧＳリンカーをコードするＤＮＡの塩基配列、ＶＨをコードするＤＮＡ、［Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ］×３、１５アミノ酸残基からなるリンカーをコードするＤＮＡおよびＶＬをコードするＤＮＡを結合させたＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－２Ｆ２ｓｃＦｖおよびＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－４Ｄ５ｓｃＦｖのＤＮＡの塩基配列を設計した（配列番号５３－５６）。

[0331] 次に、抗ＨＥＲ２　４Ｄ５－８ｓｃＦｖまたは抗ＣＤ２０　２Ｆ２ｓｃＦｖを、それぞれ抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／Ｇ４－４／ｈＬＬ１挿入して、ｐＫＡＮＴＥＸ９３／Ｇ４－４／ｈＬＬ１－４Ｄ５－８ｓｃＦｖおよびｐＫＡＮＴＥＸ９３／Ｇ４－４／ｈＬＬ１－２Ｆ２ｓｃＦｖを作製した。

[0332] ［実施例３］ヘテロダイマータンパク質の生産

（１）ヘテロダイマータンパク質の発現

細胞の培養は３７℃の５％CO_2インキュベーターで行った。各種一価抗体およびバイスペシフィック抗体を発現させるために、以下の方法で発現ベクターの導入を行った。

[0333] ４×10^6個のチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞（Ｓｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．，１２，５５５，１９８６）またはα１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子（ＦＵＴ８）をノックアウトしたＣＨＯ／ＤＧ４４細胞（以下、ＣＨＯ／ＦＵＴ８ＫＯ細胞と略記する）（米国特許第６，９４６，２９２号明細書）に、８μｇの各種一価抗体発現ベクターまたはバイスペシフィック抗体発現ベクターを加え、エレクトロポレーション法［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］により遺伝子導入を行った。宿主細胞、発現ベクターおよび生産されるヘテロダイマータンパク質の名称は表４にまとめた。

[0334] ＣＨＯ細胞で作製されたヘテロダイマータンパク質組成物は、Ｆｃに結合するＮ－グリコシド糖鎖の還元末端に含まれるＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合しているが、ＣＨＯ／ＦＵＴ８ＫＯ細胞で作製されたヘテロダイマータンパク質組成物は、該糖鎖にフコースが結合していない。以下、それぞれの細胞で作製したヘテロダイマータンパク質組成物をＦ（ｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ）およびＤＦ（ｄｅｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ）をサンプル名の後ろに付記する。

[0335] 遺伝子導入後、各細胞は、１０％透析牛血清（以下、ｄＦＢＳと略記する）を含むＩＭＤＭ培地（ＧＩＢＣＯ社）［以下、ＩＭＤＭ－（１０）と略記

する］で２日間培養後、培地を０．５ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８硫酸塩（ナカライテスク社）を含むＩＭＤＭ－（１０）［以下、ＩＭＤＭ－（１０Ｇ）と略記する］に交換して培養を続け、Ｇ４１８耐性株を取得した。

[0336] ３×１０^{5}個細胞／ｍＬ　Ｇ４１８耐性株をＩＭＤＭ－（１０Ｇ）に懸濁して３日間培養した後、ＥｘｃｅｌＩ３０２（ＳＡＦＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）に培地を交換して、７～１１日間培養後、培養上清を回収した。

[0337] [表4]

[表4] ベクター・宿主細胞の組合せとサンプル名一覧

発現ﾍﾞｸﾀｰ	宿主細胞	
	CHO/DG44	CHO/FUT8KO
pKANTEX93/humAb4D5-8	-	4D5/IgG1 DF
pKANTEX93/GA101	GA101/IgG1 F	GA101/IgG1 DF
pKANTEX93/mvG1-1	-	4D5/mvG1-1 DF
pKANTEX93/mvG1-2	GA101/mvG1-2 F	GA101/mvG1-2 DF
pKANTEX93/mvG4-1	-	4D5/mvG4-1 DF
pKANTEX93/mvG4-2	-	4D5/mvG4-2 DF
pKANTEX93/mvG4-3	-	4D5/mvG4-3 DF
pKANTEX93/mvG4-4	4D5/mvG4-4 F	4D5/mvG4-4 DF
pKANTEX93/mvG4-5	4D5/mvG4-5 F	-
pKANTEX93/hLL1	hLL1/IgG1 F	
pKANTEX93/G4-4/hLL1	hLL1/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-4D5-8scFv	hLL1-4D5/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-2F2scFv	hLL1-2F2/mvG4-4 F	-

[0338] （２）ヘテロダイマータンパク質の精製

上述実施例３（１）で取得した各種一価抗体、バイスペシフィック抗体の培養上清を、ＰｒｏＳｅｐ－ｖＡ　Ｈｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）担体を充填したカラムに、流速０．５～１．０ｍＬ／ｍｉｎで通過させた。カラムをｏｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒ　ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ）で洗浄後、ｐＨ５．０～ｐＨ３．０の０．１Ｍクエン酸緩衝液を用いてタンパク質を溶出し、２Ｍトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）により直ちに中和した。

[0339] ４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦと４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＤＦはプロテインＧ担体を用いた精製も実施した。ＰｒｏＳｅｐ－Ｇ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社

）担体を充填したカラムに、培養上清を流速０．５～１．０ｍＬ／ｍｉｎで通過させた。カラムをＰＢＳで洗浄後、ｐＨ５．０～ｐＨ２．５の０．１Ｍクエン酸緩衝液を用いてタンパク質を溶出し、２Ｍトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）により直ちに中和した。

[0340] タンパク質濃度が高かった溶出画分を、水酸化ナトリウムでｐＨ６．０に調整した１０ｍＭクエン酸、および１５０ｍＭ塩化ナトリウムを含むバッファー（以下、クエン酸緩衝液と略記する）で透析した。サンプルを回収後、低濃度のサンプルは限外ろ過フィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）によって濃縮を行い、０．２２μｍフィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）による滅菌後に、２８０ｎｍにおける吸光度（$ＯＤ_{280}$）からタンパク質濃度を算出した。

[0341] ｉｎ ｖｉｔｒｏ活性評価には、ゲルろ過クロマトグラフィーでさらに精製したサンプルを用いた。高速液体クロマトグラフィーシステムＡＫＴＡ ｅｘｐｌｏｒｅ １０Ｓ（ＧＥヘルスケア）に、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬカラム（ＧＥヘルスケア）を接続し、クエン酸緩衝液をランニング緩衝液に使用して、サンプルを０．５ｍＬ／ｍｉｎの流速でカラムに通過させた。２５～３０分付近にピークとして検出される画分を回収して各種解析に用いた。

[0342] （３）ヘテロダイマータンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析

プロテインＡで精製した各種一価抗体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析を行った。０ｍＭ ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ（ＤＴＴ）（非還元条件）または１０ｍＭ ＤＴＴ（還元条件）を含有する０．３Ｍトリス塩酸（ｐＨ６．８）、１０％ドデシル硫酸ナトリウムおよび５０％グリセロールを含むバッファー（以下、サンプルバッファーと略記する）で調整したサンプルを、１００℃で５分間処理し、ポリアクリルアミドゲル（ＡＴＴＯカタログ番号Ｅ－Ｔ５２０Ｌ）に１μｇ／レーンで電気泳動を行った。分子量マーカーには、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ｐｌｕｓ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｌｌ ｂｌｕｅ ｓｔａｎｄａｒｄｓ（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）を用い、５μＬ／レーンで添加した。ゲ

ルを回収後、Ｑｕｉｃｋ　ＣＢＢ（ＷＡＫＯ社）を用いて製品手順書に従い染色を行った。

[0343] その結果、一価抗体のＨ鎖およびＬ鎖はいずれも分子量が約５０ｋＤａであることから、非還元条件のＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて多量体と予測される２５０ｋＤａ以上の複数のバンド、２本のポリペプチド鎖からなる単量体と予測される約１００ｋＤａ付近のバンドおよび一本のポリペプチド鎖からなる半量体と予測される約５０ｋＤａ付近のバンドが認められた［図８Ａ（ａ）および（ｂ）、図８Ｂ）。

[0344] 抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－１　ＤＦでは、２５０ｋＤａ以上の多量体と予測されるバンドが多数確認され、複数の多量体が形成されていることが示された。しかしながら、Ｃ１３１Ｓ／Ｒ１３３Ｋ置換を含むＨ鎖およびＣ２１４Ｓ置換を含むＬ鎖からなる４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦでは、多量体は殆ど検出されなかった（図８Ａ）。

[0345] 従って、ＩｇＧ４－ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ４－Ｌを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、ＩｇＧ４－ＣＨとＣκとのジスルフィド結合に関与するＣｙｓ残基を欠損させるＨ鎖Ｃ１３１Ｓ／Ｒ１３３Ｋの置換、Ｌ鎖Ｃ２１４Ｓの置換、並びにＨ鎖Ｃ１３１Ｓ／Ｒ１３３ＫおよびＬ鎖Ｃ２１４Ｓの置換は、分子間ジスルフィド結合によって形成される多量体の形成を抑制できることが示された。

[0346] 同様にＨ鎖Ｃ１３１Ｓ／Ｒ１３３ＫおよびＬ鎖Ｃ２１４Ｓ置換を有する４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆにおいても多量体のバンドは認められなかった。また、４Ｄ５／ｍｖＧ１－１　ＤＦでは多量体が顕著に観察されたが、Ｈ鎖Ｃ２２０ＳおよびＬ鎖Ｃ２１４Ｓ置換を含むＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆでは多量体は検出されなかった。

[0347] 従って、ＩｇＧ１－ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ１－Ｌを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、ＩｇＧ１－

ＣＨとＣκとのジスルフィド結合に関与するＣｙｓ残基を欠損させるＨ鎖Ｃ２２０Ｓの置換、Ｌ鎖Ｃ２１４Ｓの置換、並びにＨ鎖Ｃ２２０Ｓの置換およびＬ鎖Ｃ２１４Ｓ置換により多量体の形成を抑制できることが示された。

[0348] 一方、４Ｄ５／ｍｖＧ４－１　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦでは半量体と予測される約５０ｋＤａ付近のバンドが認められたが、Ｈ鎖およびＬ鎖の両方にＳ２２８Ｐ／Ｒ４０９Ｋ置換を含む４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆでは、半量体のバンドは殆ど認められなかったことから、Ｈ鎖およびＬ鎖におけるＳ２２８Ｐ置換、Ｒ４０９Ｋ置換およびＳ２２８Ｐ／Ｒ４０９Ｋ置換は、半量体の形成を抑制できることが示された（図８Ｂ）。

[0349] 以上の結果から、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質を生産する際に生じる多量体量、半量体量、並びに多量体／半量体が低下した組成物であることが示された。

[0350] ［実施例４］一価抗体の成分分析

（１）陽イオン交換クロマトグラフィーによる成分の分離

上述、実施例３においてプロテインＡカラムを用いたアフィニティ精製を行った抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦの詳細な成分分析を行うために、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦは、ＣＬにＣ２１４ＳとＣＨ１にＣ１３１Ｓ／Ｒ１３３Ｋのアミノ酸残基置換が加えられ、Ｆｃに結合するＮ－グリコシド糖鎖の還元末端に含まれるＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していないＩｇＧ４型一価抗体である。

[0351] Ｈｉｇｈ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　Ｌｉｑｕｉｄ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ（ＨＰＬＣ）分析装置（ＬＣ－１０Ａｖｐシリーズ、島津製作所社）にＷＣＸ－１０（ＤＩＯＮＥＸ社製）カラムを接続し、１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．２のバッファー（以下、Ａバッファーと略記する）を開始バッファーに、１０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウム

、ｐＨ６．２のバッファー（以下、Ｂバッファーと略記する）を溶出バッファーに用いた。

[0352] サンプルを流した後、流速１ｍＬ／ｍｉｎでＡバッファーを流し始め、１分間に１％ずつＢバッファーの比率を増加させ、３０分間分析を行った。その後、Ｂバッファーにランニング緩衝液を変更し、１０分間分析を行った。

[0353] ４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦを陽イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果、図９に示すようにピーク（１）、（２）～（６）および（７）～（１０）の３つのピーク群に分離されたことから、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ精製タンパク質には複数の成分が含まれていることが示された。従って、更にピーク（１）～（１０）を分取して、各ピーク成分の解析を行った。

[0354] （２）ウェスタンブロット解析による成分の同定

上述、実施例３（３）と同様の方法で、非還元条件で１レーンあたり４０ｎｇを添加してＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動を行い、０．１Ｍトリス、０．２Ｍグリシンおよび２０％メタノールを含むトランスファーバッファーに浸した濾紙でＰＶＤＦ膜とゲルを挟み、タンパク質をＰＶＤＦメンブレンにブロッティングした（２．５ｍＡ／ｃｍ^2、４０分間）。その後、１％　ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと略記する）を用いてタンパク質をトランスファーしたＰＶＤＦメンブレンをブロッキングした。

[0355] 検出抗体には、Ｈ鎖検出用として１０００倍希釈したペルオキシダーゼ（以下、ＨＲＰと略記する）標識抗Ｈｉｓタグ抗体（ナカライテスク社、Ｃａｔ．Ｎｏ．０４５４６－３４）、Ｌ鎖検出用として５０００倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトκ鎖抗体（ＳＩＧＭＡ社、カタログ番号Ａ７１６４）、ＩｇＧ検出用として、５０００倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社、Ｃａｔ．Ｎｏ．Ａ１１０ＰＤ）を用いて、室温で１時間反応させた。

[0356] その後、ＰＶＤＦメンブレンは０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと略記する）で洗浄を行い、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎ

ａｌ Ｗｅｓｔ Ｄｕｒａ Ｅｘｔｅｎｄｅｄ Ｄｕｒａｔｉｏｎ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を反応させてイメージアナライザー（富士フイルム社製）で検出した。

[0357] ４Ｄ５／ｍｖＧ４－２ ＤＦの陽イオン交換クロマトグラフィー（図９）で見られたピーク（１）～（１０）のウェスタンブロット解析行った結果（図１０）、ピーク（１）および（３）は、２本のポリペプチド鎖からなる単量体と予測される１００ｋＤａ付近にバンドが検出され、抗ヒトκ鎖抗体および抗ｈＩｇＧ抗体の両方と反応し、抗Ｈｉｓタグ抗体には反応しなかったことから、Ｈｉｓタグを含むＨ鎖は含まれていないＬ鎖のみを成分とするＬ鎖－Ｌ鎖ホモダイマー単量体（以下、ＬＬ体と略記する）であることが示された。

[0358] また、ピーク（８）および（９）は、単量体と予測される１００ｋＤａ付近にバンドが検出され、抗ヒトκ鎖抗体、抗Ｈｉｓタグ抗体および抗ｈＩｇＧ抗体のすべての検出抗体と反応したことから、Ｈｉｓタグを含むＨ鎖とＬ鎖を成分とするＨＬヘテロダイマー単量体（以下、ＨＬ体と略記する）であることが示された（図１０）。

[0359] また、ペルオキシダーゼ標識抗ｈＩｇＧ抗体による検出結果から、ピーク（１）、（３）とピーク（８）、（９）の成分は分子量の異なる成分であり、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離可能であることが示された。また、その他のピーク（２）、（４）～（７）および（１０）のサンプルはウェスタンブロット解析の検出限界以下であったため、その成分を同定することができなかった。

[0360] （３）ヘテロダイマーおよびホモダイマーの混合物からの分離

前項から、プロテインＡで精製した４Ｄ５／ｍｖＧ４－２ ＤＦにおいて、ＨＬ体とＬＬ体が含まれていることが示唆された。続いて、ＨＬ体とＬＬ体の標準品を取得するため、プロテインＡ精製時に溶出ｐＨを変えて得られた各画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果、プロテインＡ精製においてｐＨ３．５で溶出された画分の１つであるフラクションＸは

ピーク（８）および（９）を主成分とし、プロテインＡ精製においてｐＨ５．０で溶出されたフラクションＹはピーク（１）を主成分とすることを同定した。

[0361] 表５に示すように、フラクションＸはＨＬ体含量が７４．９％以上、フラクションＹはＬＬ体含量が９３．８％以上であることが示された。以降の解析では、ＨＬ体を主成分とするサンプルのコントロールにフラクションＸを用い、ＬＬ体を主成分とするサンプルのコントロールにフラクションＹを用いた。なお、表５中の数値は面積比(％)を、「ｎ．ｄ．」は未解析であることを表す。

[0362] [表5]

[表5] mvG4-2 DF各画分の陽ｲｵﾝ交換ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰによる成分分析

ﾋﾟｰｸ番号	成分	mvG4-2 DF	
		ﾌﾗｸｼｮﾝX	ﾌﾗｸｼｮﾝY
(1)	LL	1	88.6
(2)	未同定	*n. d.*	1.5
(3)	LL	*n. d.*	5.2
(4)	未同定	*n. d.*	1.3
(5)	未同定	*n. d.*	2.1
(6)	未同定	5.7	1.3
(7)	未同定	10.3	*n. d.*
(8)	HL	24.2	*n. d.*
(9)	HL	49.9	*n. d.*
(10)	未同定	8.8	*n. d.*
合計(%)	LL	1	93.8
	HL	74.1	*n. d.*
	未同定	24.9	6.2

[0363] （４）ヘテロダイマータンパク質の特異的精製

ＣＨ結合体への結合活性が低下したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドを

含むヘテロダイマータンパク質が、特異的に分離、精製されることを確認するため、プロテインＧおよびプロテインＡを用いた精製を行い、精製タンパク質の比較を行った。

[0364] プロテインＧはヒトＩｇＧの何れのサブクラスも結合することが知られており、プロテインＡ結合活性の無いヒトＩｇＧ３はプロテインＧには結合することができる。従って、プロテインＧを用いた精製では、プロテインＡ結合部位の本実施例のアミノ酸残基置換の有無に関わらず、全ての抗体分子を精製することが出来ると考えられる。

[0365] 本実施例では、プロテインＡへの結合に関与していることが知られているＩｇＧ１のＥＵインデックス４３５位のＨｉｓおよび４３６位のＴｙｒを、プロテインＡ結合活性の無いヒトＩｇＧ３のアミノ酸残基であるＡｒｇおよびＰｈｅへ置換することで、プロテインＡ結合活性が低下したＣＬ－Ｆｃを含むヘテロダイマータンパク質（４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ）を作製して解析を行った。

[0366] 上述の実施例３（３）および実施例４（２）と同様の方法で非還元条件でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析およびウエスタンブロティングを実施した。

[0367] 非還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて長時間の電気泳動を行った結果、主にＨＬ体を含む４Ｄ５／ｍｖＧ４－２のＸフラクションは、主にＬＬ対を含む４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦのＹフラクションと比べて、バンドが高分子側に確認された。従って、高分子量側のバンドがＨＬ体、低分子量側のバンドがＬＬ体であることが示唆された。また、泳動時間を長くすることでＨＬヘテロ単量体およびＬＬホモ単量体を分離可能であることが示された（図１１）。

[0368] 同様に、抗κ鎖抗体を用いたウェスタンブロットの結果でも、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２のＸフラクションのバンドは、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２のＹフラクションのバンドと比べて高分子側に確認された（図１１）。

また、プロテインＧまたはプロテインＡを用いて精製した４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦにおいて、それぞれの精製品をＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い比較を

行った。

[0369] 初めに、各担体を用いた４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦの精製条件を検討した結果、プロテインＧではｐＨ２．５で、プロテインＡではｐＨ３．０で全てのタンパク質が溶出されることを確認した。

[0370] プロテインＧを用いてｐＨ２．５で溶出して得られた４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ（プロテインＧ精製品）では、ＨＬ体とＬＬ体の両方のバンドが観察されたことから、プロテインＧで精製された４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦには、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦと同様にＨＬ体とＬＬ体との両方が含まれていることが明らかになった（図１１、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）。従って、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２にＨ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸残基置換を加えた４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦは、ＨＬおよびＬＬの両分子が発現していることが示された。

[0371] 一方、プロテインＧ精製に用いた培養上清と同じ培養上清から、プロテインＡを用いて、ｐＨ３．０で溶出して得られた４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ（プロテインＡ精製品）のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果では、ＨＬのバンドは観察されたがＬＬのバンドは殆ど観察されず、また抗κ鎖抗体によるウェスタンブロット解析の結果でも、高分子量側のＨＬのバンドのみが確認された（図１１）。

[0372] 従って、４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦを発現する細胞は、培養上清中にＨＬヘテロダイマーおよびＬＬホモダイマーを発現しているが、プロテインＡ用いた精製によって、４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦのＨＬヘテロダイマータンパク質を選択的に精製できることが示された（図１１）。

[0373] 一方、Ｌ鎖にＨ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸置換を加えていない４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦは、ＨＬ体だけでなくＬＬ体もプロテインＡにより精製されることから、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６Ｆのアミノ酸置換をＬ鎖へ加えることによって、プロテインＡ結合活性の無いＬＬ体とプロテインＡ結合活性のあるＨＬ体から、ＨＬ体のみが特異的に精製できるようになった。

[0374] ［実施例５］ヘテロダイマータンパク質の検出ＥＬＩＳＡ

（１）ＩｇＧ４型一価抗体のサンドイッチＥＬＩＳＡ

ＨＬ体を検出するために、ｓａｎｄｗｉｃｈ　ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ　ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）系の構築を検討した。本実施例において作製した一価抗体は図５に示す構造のようにＣＨのＣ末端にＨｉｓタグが結合したＨ鎖とＦｃとＣκ鎖とが融合したＬ鎖からなるヘテロダイマータンパク質であることから、Ｈ鎖特異的に結合する抗体として抗Ｈｉｓタグ抗体を、Ｌ鎖特異的に結合する抗体として抗ヒトκ鎖抗体を用いることができる。

[0375] 抗Ｈｉｓタグ抗体（ＱＩＡＧＥＮ社、Ｃａｔ．Ｎｏ．３４６７０）をＥＬＩＳＡプレートに固相化（２μｇ／ｍＬ、５０μＬ／ウェル、４℃、１６時間）し、ＰＢＳで洗浄した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによってブロッキングを行った（１００μＬ／ウェル、室温、１時間）。

[0376] ブロッキング液を廃棄した後、各種濃度の一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２ＤＦフラクションＸ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦフラクションＹ、プロテインＡを用いて精製した４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４Ｆおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆを反応させた（５０μＬ／ウェル、室温、２時間）。

[0377] 続いて０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと略記する）で洗浄した後、５０００倍希釈したｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ　ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（以下、ＨＲＰと略記する）標識抗ヒトκ鎖抗体（ＳＩＧＭＡ社、Ｃａｔ．Ｎｏ．Ａ７１６４）を反応させた（５０μＬ／ウェル、２時間）。

[0378] 次に、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄した後、ＡＢＴＳ発色基質〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１ｍｍｏＬ／Ｌ　ＡＢＴＳ／０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％　H_2O_2〕を５０μＬ／ウェルを加え、室温１５分間発色反応を行ない、５％　ＳＤＳ水溶液を５０μＬ／ウェル添加して

、発色反応を停止した。プレートリーダーで４９０ｎｍをリファレンスとし、４１５ｎｍの吸光度を測定した。データの解析にはＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いた。実験は繰り返し回数３で行った。

[0379] Ｂｉｎｄｉｎｇ　ＥＬＩＳＡ系の陽性対照として４Ｄ５／ｍｖＧ４－２ＤＦのＨＬヘテロダイマーからなるフラクションＸ、陰性対照として４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦのＬＬホモダイマーからなるフラクションＹを用いた。

[0380] その結果、プロテインＡ精製により取得した４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆは、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦフラクションＸと同等に結合したが、４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦフラクションＹは殆ど結合しなかった（図１２）。

[0381] 従って、ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－３ＤＦ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆは、いずれもＣＨ－Ｈｉｓタグを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるＨＬヘテロダイマータンパク質であることが示された（図１２）。

[0382] また、ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦのＨＬヘテロダイマータンパク質に、更にＬ鎖にＨ４３５ＹおよびＲ４３６Ｆのアミノ酸置換を加えたＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－３　ＤＦ、更にＳ２２８Ｐ／Ｒ４０９Ｋのアミノ酸置換を加えた４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆ、４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆに更にＬ２３５Ｅのアミノ酸置換を加えた４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆは、いずれもプロテインＡを用いた精製によって、ＨＬヘテロダイマーを特異的に精製できることが示された（図１２）。

[0383] 従って、Ｌ鎖にＨ４３５ＹおよびＲ４３６Ｆのアミノ酸置換を加えることでＨＬヘテロダイマー体をプロテインＡによって特異的に精製できる効果は、Ｓ２２８Ｐ／Ｒ４０９ＫおよびＬ２３５Ｅのアミノ酸置換が存在しても変化しないことが示された。

[0384] （２）ＩｇＧ１型一価抗体のサンドイッチＥＬＩＳＡ

上述実施例５（１）と同様な方法に従いＩｇＧ１型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ１－１　ＤＦのプロテインＡ精製フラクションのｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡを行った。

[0385] その結果、プロテインＡ精製における各ｐＨの溶出フラクション１～４は、ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡの反応性が異なっていた。従って各フラクションに含まれるＨＬヘテロダイマー含量が異なることが示された（図１３Ａ）。

[0386] 従って、最もタンパク質含量の多かったフラクション２は、ＨＬ体とＬＬ体の両方を含んでいることが示唆された。また、最も反応性の高かったフラクション１を、以降のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性評価では４Ｄ５／ｍｖＧ１－１　ＤＦとして用いた。

[0387] 一方、Ｈ４３５ＲおよびＹ４３６　Ｆのアミノ酸残基置換を含むＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦでは、ＨＬヘテロダイマーが主成分である４Ｄ５／ｍｖＧ４－２　ＤＦフラクションＸと同等の反応性であった（図１３Ｂ）。

[0388] 従って、プロテインＡを用いて精製されたＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦは、ＨＬヘテロダイマーが特異的に精製されていることが示された（図１３Ｂ）。

[0389] 以上の結果から、ＩｇＧ４型一価抗体だけでなくＩｇＧ１型一価抗体においても、Ｌ鎖のＨ４３５Ｒ／Ｙ４３６Ｆアミノ酸残基置換を含むヘテロダイマータンパク質は、プロテインＡによる特異的精製が可能であることが示された。

[0390] ［実施例６］ヘテロダイマータンパク質の癌細胞への結合活性

ＩｇＧ１型およびＩｇＧ４型一価抗体の癌細胞に対する結合活性は、各ＩｇＧ１抗体の結合阻害実験で確認した。初めに、コントロール抗体として、Ａｌｅｘａ４８８標識キット（インビトロジェン社、Ａ２０１８１）を用いて抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１Ｆ、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．

Ｓ．Ａ．，１９９２；８９：４２８５）およびｈｕｍａｎ　ＩｇＧ１（ミリポア社製、ＡＧ５０２）をＡｌｅｘａ４８８で標識して、ＧＡ１０１＿ＡＩｘ、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ＿ＡＩｘおよびｈＩｇＧ１＿ＡＩｘを作製した。

[0391] ＣＤ２０陽性ヒトリンパ腫細胞株Ｒａｊｉ（ＪＣＲＢ９０１２）およびＨＥＲ２陽性ヒト乳癌細胞株ＳＫ－ＢＲ－３（ＡＴＣＣ：ＨＴＢ－３０）を用いてフローサイトメーターによる解析を行った。実験は繰り返し回数２で行った。１％　ＢＳＡ、０．０２％　ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｄｉａｍｉｎｅ　ｔｅｔｒａｃｅｔａｔｅ（ＥＤＴＡ）、および０．０５％アジ化ナトリウムを含むＰＢＳバッファー（以下、ＦＡＣＳバッファーと略記する）を用いて１×１０^{5}個細胞を懸濁し、該懸濁液に２．０μｇ／ｍＬ　Ａｌｅｘａ標識抗体および同時に２１０ｎＭ～１．６８ｎＭの非標識ＩｇＧ１抗体または各種一価抗体を添加し、４℃、遮光条件下で１．５時間反応させた。

[0392] また、陰性対照としてｈＩｇＧ１＿ＡＩｘ用いた。ＦＡＣＳバッファーで洗浄後、フローサイトメーターＣｙｔｏｍｉｃｓ　ＦＣ　５００　ＭＰＬ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ社）で測定を行った。

[0393] その結果、ネガティブコントロールｈＩｇＧ１抗体は、抗ＨＥＲ２抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ＿ＡＩｘのＳＫ－ＢＲ－３細胞への結合を阻害しなかったが、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１デフコース化抗体４Ｄ５／ＩｇＧ１　ＤＦ、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ１－１　ＤＦ、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆおよび４Ｄ５／ｍｖＧ４－５　Ｆは、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ＿ＡＩｘのＳＫ－ＢＲ－３への結合を抗体濃度依存的に阻害した（図１４Ａ）。

[0394] 従って、抗ＨＥＲ２一価抗体はＨＥＲ２特異的に結合することが示された。即ち、ＣＨおよびＣＬ－Ｆｃからなるｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ　ｓｃａｆｆｏｌｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ（ＨＳＰ）を元に作製されたヘテロダイマータンパク質は、一価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質であることが示された。

[0395] しかし、一価抗体の単位モル濃度あたりの結合阻害効果は、抗ＨＥＲ２ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎおよび４Ｄ５／ＩｇＧ１ＤＦに比べて低かった（図１４Ａ）。

[0396] 一方、ＣＤ２０陽性リンパ腫細胞株Ｒａｊｉにしても同様に、ネガティブコントロールｈＩｇＧ１抗体はＧＡ１０１＿ＡｌｘのＲａｊｉ細胞への結合を阻害しなったが、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１　デフコース化抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　ＤＦ、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２ＤＦは、ＧＡ１０１＿ＡｌｘのＲａｊｉ細胞への結合を抗体濃度依存的に阻害した（図１４Ｂ）。

[0397] 従って、抗ＣＤ２０一価抗体がＣＤ２０特異的に結合することが示された。また、ＨＥＲ２抗体と同様に、一価抗体の単位モル濃度あたりの結合阻害効果は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　ＦおよびＧＡ１０１／ＩｇＧ１　ＤＦと比べて弱かった（図１４Ｂ）。

[0398] ［実施例７］ヘテロダイマータンパク質の抗体依存性細胞傷害活性

（１）抗ＨＥＲ２一価抗体の抗体依存性細胞傷害活性

抗体のＡＤＣＣ活性は、国際公開第２００７／０１１０４１号に記載の方法で測定し、３回繰り返して行った。

[0399] 標的細胞としてＨＥＲ２陽性ヒト乳癌細胞ＳＫ－ＢＲ－３（ＡＴＣＣ：ＨＴＢ－３０）、ヒト乳腺癌ＢＴ－２０（ＡＴＣＣ：ＨＴＢ－１９）、ＣＤ２０陽性ヒトリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＪＣＲＢ９０１２）、バーキットリンパ腫細胞ＳＴ－４８６（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－１６４７）および慢性Ｂ細胞白血病細胞　ＭＥＣ－１（ＤＳＭＺ：ＡＣＣ－４９７）を用い、エフェクター細胞には健常人ドナーより調製した末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を用いた。

[0400] ターゲット細胞に対するエフェクター細胞の比は１：２５で実験を行い、細胞傷害活性（％）は以下の式より算出した。

細胞傷害活性（％）＝１００×（Ｓ－Ａｂ）／（Ｍａｘ－Ｔ）

Ｓ＝サンプル反応ウェル吸光度－培地ウェル吸光度

Ａｂ＝抗体無添加ウェル吸光度－培地ウェル吸光度

Ｔ＝標的ウェル吸光度－培地ウェル吸光度

Ｍａｘ＝１００％反応ウェル吸光度－１００％反応対照ウェル吸光度

[0401] 陰性対照にはｈＩｇＧ１、陽性対照には抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎと抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１デフコース抗体４Ｄ５／ＩｇＧ１　ＤＦを用い、エフェクター細胞は、別々のボランティアドナーから調製されたＰＢＭＣを用いた。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００によって標的細胞を溶解したウェルを、１００％反応ウェルとした。

[0402] その結果、抗ＨＥＲ２一価抗体４Ｄ５／ｍｖＧ１－１ＤＦ（プロテインＡ精製フラクション１）は、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１抗体４Ｄ５／ＩｇＧ１　ＤＦと同等の抗体濃度依存的な高いＡＤＣＣ活性を示した（図１５Ａ）。一方、抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ４型一価抗体ｍｖＧ４－４　ＦおよびｍｖＧ４－５　Ｆは何れもＡＤＣＣ活性を示さなかった（図１５Ｂ）。

[0403] 従って、ＩｇＧ１－ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ１－Ｆｃが融合したＣＬ（ＩｇＧ１－Ｌ）を含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質は、ＡＤＣＣ活性を付与することができ、ＩｇＧ４－ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＩｇＧ４－Ｆｃが融合したＣＬ（ＩｇＧ４－Ｌ）を含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質は、ＡＤＣＣ活性を除くことができることが示された。

[0404] 更に、ＩｇＧ１型一価抗体は、ＩｇＧ１抗体と比べて抗原結合部位が二価から一価へ減少するにもかかわらず、同一条件においてＩｇＧ１抗体と同等の効果を得ることができることから、不要な二価結合活性を低下させかつＡＤＣＣ活性を維持した一価抗体が作製され得ることが示された。

[0405] （２）抗ＣＤ２０一価抗体の抗体依存性細胞傷害活性

上述実施例７（１）と同様にして、陰性対照にはｈＩｇＧ１、陽性対照には抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　Ｆと抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１デフコース抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　ＤＦを用い、全ての実験は健常人ドナー１名から調製したＰＢＭＣを用いて行った。

[0406] その結果、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型デフコース一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦは、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆと比べてＡＤＣＣ活性が顕著に増加した［図１６（ａ）～（ｃ）］。

[0407] ヒトＩｇＧにおいては、コアフコースの除去によりＡＤＣＣ活性が増強されていることが知られているが、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるＩｇＧ１型一価抗体においても同様に、Ｆｃに結合するコアフコースを除去することで、ＡＤＣＣ活性が増加することが示された。即ち、ＣＨを含む第１ポリペプチドおよびＣＨ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質のＡＤＣＣ活性は、Ｆｃに結合するコアフコース含量を変化させることで増加または低下させることができることが示された。

[0408] また、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型デフコース一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦは、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１デフコース抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１ＤＦと比較すると、単位モル濃度あたりで誘導できるＡＤＣＣ活性の有効性（ｐｏｔｅｎｃｙ）は減少したが、最大活性（ｅｆｆｉｃａｃｙ）はほぼ同等であった。即ち、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１抗体と比べて、抗原結合部位が二価から一価へ減少するにもかかわらず、同一条件において一価抗体分子数を増やすことで、ＩｇＧ１抗体と同等の効果を得ることができることを示している。

[0409] ［実施例８］二価ヘテロダイマータンパク質の作製

（１）バイスペシフィック抗体の作製

二価ヘテロダイマータンパク質として、ＣＤ７４抗体Ｈ鎖を含む第１ポリペプチドおよびＣＤ７４抗体ＶＬ－ＦｃのＣ末端に抗ＣＤ２０ｓｃＦｖ抗体または抗ＨＥＲ２ｓｃＦｖ抗体を結合させた第２ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体並びに抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体ｈＬＬ１／ｍｖＧ４－４　Ｆを作製した。

[0410] 実施例２（３）のバイスペシフィック抗体発現ベクターを用いて、実施例

３と同様にしてバイスペシフィック抗体を発現、精製することで、ＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体、ＣＤ７４－ＣＤ２０バイスペシフィック抗体および抗ＣＤ７４　ＩｇＧ４型一価抗体ｈＬＬ１／ｍｖＧ４－４　Ｆを取得した。

[0411] ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果、ｈＬＬ１／ｍｖＧ４－４　Ｆ、ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　ＦおよびｈＬＬ１－２Ｆ２／ｍｖＧ４－４　Ｆ組成物の精製度は高く、交雑物、分解物および会合体などはほとんど含まれていなかった（図１７）。

[0412] （２）ＥＬＩＳＡ法によるリコンビナントヒトＨＥＲ２およびＣＤ７４への結合活性評価

アッセイには９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社）を用いた。２μｇ／ｍＬリコンビナントヒトＨＥＲ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）または２μｇ／ｍＬ　ＣＤ７４（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社）を５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩静置して吸着させた。プレートをＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェル加え、室温で１時間静置して残っている活性基をブロックした。

[0413] その後、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨て、該プレートに一次抗体として各濃度の抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ　Ｆ、抗ＣＤ７４　ＩｇＧ１抗体ｈＬＬ１　ＦまたはＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４　Ｆを５０μＬ／ウェル分注し、１時間室温で静置した。

[0414] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、２次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトκ鎖抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）を５０μＬ／ウェル加えて１時間室温で静置した。該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ発色基質〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１ｍｍｏＬ／Ｌ　ＡＢＴＳ／０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％ H_2O_2〕を５０μＬ／ウェルを添加して発色させた。

[0415] ５％ ｓｏｄｉｕｍ ｄｏｄｅｃｙｌ ｓｕｌｆａｔｅ（ＳＤＳ）溶液を５０μＬ／ウェル添加して反応を止め、サンプル波長４１５ｎｍ、リファレンス波長４９０ｎｍにおける吸光度（ＯＤ４１５－４９０）をプレートリーダー（ＳＰＥＣＴＲＡ Ｍａｘ ３４０ＰＣ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。

[0416] その結果、ＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４ Ｆは、抗ＨＥＲ２ ＩｇＧ１抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ Ｆと同様にＨＥＲ２タンパク質に結合した。また、ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４ Ｆは、抗ＣＤ７４ ＩｇＧ１抗体ｈＬＬ１ Ｆと同様にＣＤ７４タンパク質に結合した［図１８（ａ）～（ｃ）］。

[0417] 従って、ＣＨおよびＣＨ－Ｆｃからなるｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ ｓｃａｆｆｏｌｄ ｐｒｏｔｅｉｎ（ＨＳＰ）を元に作製されたＣＤ７４－ＨＥＲ２バイスペシフィック抗体ｈＬＬ１－４Ｄ５／ｍｖＧ４－４ Ｆは、二価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質であることが示された。

[0418] ［実施例９］ヘテロダイマータンパク質の補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ活性）

実施例３で作製したＨ鎖およびＣＬ－Ｆｃ鎖の２つのポリペプチドからなる一価抗体のＣＤＣ活性を、国際公開第２０１１／１０８５０２号に記載の方法により測定した。実験は繰り返し回数３回で行った。標的細胞としてＣＤ２０陽性バーキットリンパ腫細胞株ＳＴ－４８６（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－１６４７）を用いた。

[0419] ９６ウェル平底プレート（住友ベークライト社）の各ウェルに、１０％ＦＢＳ（ＪＲＨ社）を含むＲＰＭＩ１６４０（和光純薬工業社）を用いて１．０×10^6個／ｍＬに希釈した標的細胞５０μＬ、終濃度の３倍に調整した抗体溶液５０μＬおよび２倍に希釈したヒト補体（ＳＩＧＭＡ社）５０μＬを分注した。陰性対照にはｈＩｇＧ１、陽性対照には抗ＣＤ２０抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１ Ｆと抗ＣＤ２０ デフコース化抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１ ＤＦを用いた。

[0420] また、抗体を含まないウェルを０％反応ウェル、標的細胞を含まないウェルを１００％反応ウェルとして用意した。３７℃（５％ CO_2）で２時間培養後、各反応ウェルにＷＳＴ－１（ＲＯＣＨＥ社）を１５μＬずつ添加し３７℃（５％ CO_2）で３時間培養した。

[0421] 反応終了後、各ウェルのＯＤ４５０を測定し、下式を用いて細胞傷害活性（％）を算出した。

細胞傷害活性（％）＝１００×｛１－（反応ウェル吸光度－１００％反応ウェル吸光度）／（０％反応ウェル吸光度-１００％反応ウェル吸光度）｝

[0422] 抗ＣＤ２０ ＩｇＧ１型一価抗体のモル濃度あたりのＣＤＣ活性を図１９に示す。その結果、抗ＣＤ２０ ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２ Ｆおよび抗ＣＤ２０ ＩｇＧ１型デフコース化一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２ ＤＦは、抗ＣＤ２０抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１ ＦおよびＧＡ１０１／ＩｇＧ１ ＤＦと比べて、ＣＤＣ活性が増加した。

[0423] ［実施例１０］ヘテロダイマータンパク質のＣ１ｑ結合活性

細胞表面上へのＩｇＧ抗体、一価抗体の結合およびＣ１ｑの結合をフローサイトメーターで測定した。標的細胞にはＣＤ２０陽性腫瘍細胞株Ｒａｊｉ（ＪＣＲＢ９０１２）およびＳＴ－４８６（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－１６４７）を用いた。標的細胞をＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社）で４×10^6 個／ｍＬに調製し、更に１／２０希釈マウス血清（ＣＥＤＡＲＬＡＮＥ社）をを加え、室温で５分間静置した。

[0424] この細胞懸濁液を９６ウェルＵ字プレート（ＦＡＬＣＯＮ社）の各ウェルに５０μＬずつ分注し、ＢＳＡ－ＰＢＳで３倍濃度に希釈した抗体溶液（ＧＡ１０１／ＩｇＧ１ Ｆ，ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２ Ｆ，ｈＩｇＧ１）、３倍濃度の精製Ｃ１ｑ（ＳＩＧＭＡ社、Ｃ１７４０）をそれぞれ５０μＬずつ添加した。陰性対象として、バッファーを加えた。

[0425] 各ウェルを懸濁し、氷上で１時間静置後、遠心分離により上清だけを除去した。ＢＳＡ－ＰＢＳを１８０μＬずつ各ウェルに加え、再び遠心分離により上清を除去した。この操作を２回繰り返すことで洗浄を行った。

[0426] その後、１０μｇ／ｍＬ　ＦＩＴＣ標識抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃ抗体（Ａｂｃａｍ社、ａｂ９９７６３）またはＦＩＴＣ標識抗Ｃ１ｑ抗体（Ｄａｋｏ社、Ｆ０２５４）を各ウェルに３０μＬずつ添加し、氷上で３０分間遮光して静置した。その後、上述の洗浄操作を２回繰り返し、１８０μＬのＢＳＡ－ＰＢＳに懸濁して測定サンプルとした。

[0427] フローサイトメーターにより、各測定サンプルのＭｅａｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＭＦＩ）を測定した。陰性対照ウェルのＭＦＩ値に対するサンプルウェルのＭＦＩ値の比を計算してＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（ＲＦＩ）とした。抗体濃度とＲＦＩ値の関係をＲａｊｉ細胞への抗体結合量、Ｃ１ｑ結合量をそれぞれ図２０（ａ）および図２０（ｂ）に、ＳＴ－４８６細胞への抗体結合量およびＣ１ｑ結合量を図２１Ａおよび図２１Ｂにそれぞれ示す。

[0428] Ｒａｊｉ［図２０（ａ）および（ｂ）］およびＳＴ－４８６［図２１（ａ）および（ｂ）］のいずれにおいても、抗ＩｇＧ－Ｆｃ抗体の結合量は、一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＦはＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　Ｆと比べて増加したのに対し［図２０（ａ）および図２１（ａ）］、抗Ｃ１ｑ抗体の結合量はＩｇＧ１抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　Ｆと比べて一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆで増加した［図２０（ｂ）および図２１（ｂ）］。

[0429] 尚、本試験で使用した抗ＩｇＧ－Ｆｃ抗体のＧＡ１０１／ＩｇＧ１　ＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆに対するアフィニティは同等であることを事前に確認している（ｄａｔａ　ｎｏｔ　ｓｈｏｗｎ）。この結果から、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆの抗原結合活性は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　Ｆと比べて低下しているものの、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２ＦのＣ１ｑ結合活性は、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１　Ｆと比べて増加していることが明らかになった。

[0430] ［実施例１１］高ＣＤＣ活性型ヘテロダイマータンパク質の作製

高ＣＤＣ活性型ヘテロダイマータンパク質として、高ＣＤＣ活性型一価抗体を作製するために、高ＣＤＣ活性型Ｆｃ領域（国際公開第２０１１／１０８５０２号）を含む一価抗体発現ベクターを以下のようにして作製した。

[0431] （１）Ｈ鎖ベクターの作製

実施例１に記載のＨ鎖定常領域１Ｈ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を、国際公開第２０１１／１０８５０２号に記載の配列番号３で示される高ＣＤＣ型定常領域のＦｃ領域のアミノ酸配列に置換した。ＩｇＧ１－ＣＨベクター１Ｈ１のＣＨ２およびＣＨ３領域の断片を、制限酵素ＢｍｇＢＩおよびＥｃｏＴ２２Ｉ用いて切り出した。

[0432] 同様にして、高ＣＤＣ活性型Ｆｃ領域を含むｐＫＴＸ９３／１１３Ｆ－Ｎ３９２Ｋベクター（国際公開第２０１１／１０８５０２号）を制限酵素ＢｍｇＢＩおよびＥｃｏＴ２２Ｉを用いて酵素処理し、切り出されたＢｍｇＢＩ－ＥｃｏＴ２２Ｉ断片をＩｇＧ１－ＣＨベクター１Ｈ１に挿入した。その結果、高ＣＤＣ活性型Ｆｃを含む一価抗体Ｈ鎖ベクター（以下、ＨＣＶｃｏｍと略記する）を取得した。

[0433] （２）Ｌ鎖ベクターの作製

（１）と同様の操作により、実施例１に記載のＣＬ－Ｆｃ（１Ｌ１）のＦｃ領域のアミノ酸配列を、国際公開第２０１１／１０８５０２号に記載の配列番号３で示される高ＣＤＣ型定常領域のＦｃ領域のアミノ酸配列に置換して、高ＣＤＣ活性型Ｆｃを含む一価抗体Ｌ鎖ベクター（以下、ＬＣＶｃｏｍと略記する）を取得した。

[0434] （３）高ＣＤＣ活性型一価抗体発現ベクターの作製

上述（１）および（２）より取得されたＨＣＶｃｏｍおよびＬＣＶｃｏｍを、実施例１　表３に記載のｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＧ１－２のＣＨ領域およびＣＬ領域に以下の操作に従って導入した。ＨＣＶｃｏｍのＣＨ１領域の５’末端に存在するＡｐａＩサイトとＣＨ３領域の３’末端に存在するＢａｍＨＩサイトを各制限酵素で切断し、ｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＧ１－２の同サイトに挿入し、続いて、ＬＣＶｃｏｍのＣκ領域の５’末端に存在す

るＢｓｉＷＩサイトとＣＨ３領域の３’末端に存在するＰｍａＣＩサイトを各制限酵素で切断して、同サイトに挿入した。

[0435] その結果、高ＣＤＣ活性型Ｆｃを含む一価抗体発現ベクター（以下、ｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＣｏｍと記載する）を取得した。作製したｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＣｏｍのＨ鎖およびＬ鎖の定常領域アミノ酸配列を図２２Ａおよび図２２Ｂに示す。

[0436] また、高ＣＤＣ活性型の抗ＣＤ２０抗体ＧＡ１０１を作製するために、ＧＡ１０１－ＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列（配列番号３６、３８）をコードするＤＮＡをｐＫＴＸ９３／１１３Ｆ－Ｎ３９２Ｋベクター（国際公開第２０１１／１０８５０２号）の適切な部位に挿入して、抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型二価抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１－Ｃｏｍ発現ベクターを作製した。

[0437] （４）高ＣＤＣ活性型一価抗体の生産

高ＣＤＣ活性型一価抗体および二価抗体の生産は、実施例３に記載の方法と同様にして行い、抗ＣＤ２０一価抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＧ１－２および抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３／ｍｖＣｏｍを、それぞれＣＨＯ／ＦＵＴ８ＫＯ細胞へ導入し、Ｎ結合型糖鎖にα１，６－フコースが結合していない一価抗体、ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦまたは二価抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１－Ｃｏｍ　ＤＦを発現させた。

[0438] 一価抗体の精製は、ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）担体を用いたＰｒｏｔｅｉｎ Ａ精製を実施し、溶出バッファーをｐＨ３．９の０．１Ｍ　クエン酸緩衝液を用いた以外は、実施例２（２）と同様の方法に従って実施した。精製タンパク質を実施例２（３）と同様の方法でＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析を行った。

[0439] その結果、図２３に示す通り一価抗体のＣＬ－Ｆｃ鎖およびＨ鎖は共に分子量が約５０ｋＤａであり、還元条件では５０ｋＤａ付近の単一バンドが、非還元条件ではＨ鎖とＣＬ－Ｆｃ鎖との２本のポリペプチド鎖で構成されたヘテロダイマーと予想される１００ｋＤａ付近の単一バンドが認められた。

従って、均一な一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦおよびＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦが精製された。

[0440] 以上の結果は、ＩｇＧ１およびＩｇＧ４型一価抗体だけでなく、抗体定常領域に複数のアミノ酸残基置換を含む高ＣＤＣ活性型一価抗体もまた、Ｈ４３５Ｒ／Ｙ４３６Ｆアミノ酸残基置換がＣＬ－Ｆｃ鎖へ加えられることで、プロテインＡによるヘテロダイマータンパク質特異的な精製が可能であることが示された。

[0441] 即ち、第１ポリペプチドおよび／または第２ポリペプチドに、複数のアミノ酸残基置換が含まれているヘテロダイマータンパク質が、製造可能であることが明らかになった。

[0442] ［実施例１２］高ＣＤＣ活性型ヘテロダイマータンパク質のＣＤＣ活性

実施例１１で作製したＨ鎖およびＣＬ－Ｆｃ鎖の２つのポリペプチドからなる一価抗体のＣＤＣ活性は、国際公開第２０１１／１０８５０２号に記載の方法により測定した。実験は繰り返し回数３回で行った。標的細胞としてＣＤ２０陽性ヒトリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＪＣＲＢ９０１２）および慢性Ｂ細胞白血病細胞ＭＥＣ－１（ＤＳＭＺ：ＡＣＣ－４９７）を用いた。以下は、実施例９と同様にしてＣＤＣ活性を測定した。

[0443] その結果を図２４（ａ）および（ｂ）に示す。抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦは、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦと比べて高いＣＤＣ活性を示した。また、抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦは、二価の抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型抗体ＧＡ１０１／ＩｇＧ１－Ｃｏｍ　ＤＦと高濃度域において同等のＣＤＣ活性を示すことが明らかになった。

[0444] 従って、Ｈ鎖とＣＬ－Ｆｃからなるヘテロダイマータンパク質である一価抗体においても、二価のＩｇＧ抗体と同様に体定常領域の複数のアミノ酸残基置換によって、一価抗体のＣＤＣ活性が増加すること明らかになった。

[0445] ［実施例１３］ヘテロダイマータンパク質のＡＤＣＣ活性

実施例１１で作製した高ＣＤＣ活性型ヘテロダイマータンパク質である、

抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦのＡＤＣＣ活性の測定を、実施例７（２）と同様にして行った。標的細胞はＣＤ２０陽性ヒトリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＪＣＲＢ９０１２）および慢性Ｂ細胞白血病細胞ＭＥＣ－１（ＤＳＭＺ：ＡＣＣ－４９７）を用いて実施した。

[0446] 陰性対照にはｈＩｇＧ１（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社，ＡＧ－５０２）、陽性対照には抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型デフコース化一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦ、比較対照として抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型フコース化一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　Ｆを用いた。

[0447] その結果を図２５（ａ）および（ｂ）に示す。抗ＣＤ２０高ＣＤＣ活性型デフコース化一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＣｏｍ　ＤＦは、抗ＣＤ２０　ＩｇＧ１型デフコース化一価抗体ＧＡ１０１／ｍｖＧ１－２　ＤＦと同等の高いＡＤＣＣ活性を有していることが示された。

[0448] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、２０１２年１０月５日付けで出願された米国仮出願（６１／７１０，２２１号）に基づいており、その全体が引用により援用される。

配列表フリーテキスト

[0449] 配列番号１：ヒトＩｇＧ１ＣＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号２：ヒトＩｇＧ１ＣＨのアミノ酸配列

配列番号３：ヒトＩｇＧ４ＣＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号４：ヒトＩｇＧ４ＣＨのアミノ酸配列

配列番号５：ヒトＩｇＧ１ＣＨ－ＨｉｓのＤＮＡの塩基配列

配列番号６：ヒトＩｇＧ１ＣＨ－Ｈｉｓのアミノ酸配列

配列番号７：ヒトＩｇＧ４ＣＨ－ＨｉｓのＤＮＡの塩基配列

配列番号８：ヒトＩｇＧ４ＣＨ－Ｈｉｓのアミノ酸配列

配列番号９：１Ｈ０のＤＮＡの塩基配列

配列番号１０：１Ｈ０のアミノ酸配列

配列番号１１：１Ｈ１のＤＮＡの塩基配列

配列番号１２：１Ｈ１のアミノ酸配列

配列番号１３：４Ｈ０のＤＮＡの塩基配列

配列番号１４：４Ｈ０のアミノ酸配列

配列番号１５：４Ｈ１のＤＮＡの塩基配列

配列番号１６：４Ｈ１のアミノ酸配列

配列番号１７：４Ｈ２のＤＮＡの塩基配列

配列番号１８：４Ｈ２のアミノ酸配列

配列番号１９：４Ｈ３のＤＮＡの塩基配列

配列番号２０：４Ｈ３のアミノ酸配列

配列番号２１：１Ｌ０のＤＮＡの塩基配列

配列番号２２：１Ｌ０のアミノ酸配列

配列番号２３：１Ｌ１のＤＮＡの塩基配列

配列番号２４：１Ｌ１のアミノ酸配列

配列番号２５：４Ｌ０のＤＮＡの塩基配列

配列番号２６：４Ｌ０のアミノ酸配列

配列番号２７：４Ｌ１のＤＮＡの塩基配列

配列番号２８：４Ｌ１のアミノ酸配列

配列番号２９：４Ｌ２のＤＮＡの塩基配列

配列番号３０：４Ｌ２のアミノ酸配列

配列番号３１：４Ｌ３のＤＮＡの塩基配列

配列番号３２：４Ｌ３のアミノ酸配列

配列番号３３：４Ｌ４のＤＮＡの塩基配列

配列番号３４：４Ｌ４のアミノ酸配列

配列番号３５：ＧＡ１０１　ＶＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号３６：ＧＡ１０１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号３７：ＧＡ１０１　ＶＬのＤＮＡの塩基配列

配列番号３８：ＧＡ１０１　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号３９：４Ｄ５　ＶＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号４０：４Ｄ５　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号４１：４Ｄ５　ＶＬのＤＮＡの塩基配列

配列番号４２：４Ｄ５　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号４３：ＣＤ７４　ＶＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号４４：ＣＤ７４　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号４５：ＣＤ７４　ＶＬのＤＮＡの塩基配列

配列番号４６：ＣＤ７４　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号４７：ＧＳリンカーのＤＮＡの塩基配列

配列番号４８：ＧＳリンカーのアミノ酸配列

配列番号４９：２Ｆ２　ＶＨのＤＮＡの塩基配列

配列番号５０：２Ｆ２　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号５１：２Ｆ２　ＶＬのＤＮＡの塩基配列

配列番号５２：２Ｆ２　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号５３：ＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－２Ｆ２ｓｃＦｖのＤＮＡの塩基配列

配列番号５４：ＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－２Ｆ２ｓｃＦｖのアミノ酸配列

配列番号５５：ＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－４Ｄ５ｓｃＦｖのＤＮＡの塩基配列

配列番号５６：ＣＤ７４ＶＬ－ＣＬ－Ｆｃ－４Ｄ５ｓｃＦｖのアミノ酸配列

配列番号５７：ヒトＣκのＤＮＡの塩基配列

配列番号５８：ヒトＣκのアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] イムノグロブリン重鎖（以下、Ｈ鎖と略記する）定常領域（以下、ＣＨと略記する）を含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖（以下、Ｌ鎖と略記する）定常領域（以下、ＣＬと略記する）とＦｃ領域とが融合した定常領域配列（以降ＣＬ－Ｆｃと記載する）を含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ、ＩｇＧ抗体においてＬ鎖－Ｈ鎖の分子間ジスルフィド結合に関するＣｙｓ残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質。

[請求項2] イムノグロブリンＣＨを含む第１ポリペプチドおよびイムノグロブリンＣＬとＦｃ領域とが融合したＣＬ－Ｆｃを含む第２ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ、該第２ポリペプチドがＣＨ結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質。

[請求項3] 前記第２ポリペプチドが、ＫａｂａｔらによるＥＵインデックス（以下、ＥＵインデックスと記す）２１４位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、請求項１または２に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項4] 前記第１ポリペプチドがＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドがＣＬドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むポリペプチドである、請求項１～３のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項5] 前記ＣＨ結合体が、抗ＣＨ１ドメイン抗体、抗ヒンジ抗体、抗ＣＨ２ドメイン抗体、抗ＣＨ３ドメイン抗体、Ｆｃ受容体タンパク質、プロテインＡおよびプロテインＧから選ばれるいずれか１つの結合体である、請求項２～４のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項6] イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４

から選ばれるいずれか１つのサブクラスである、請求項１～５のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項7] 前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス４３５位のアミノ酸残基がＡｒｇに置換されたポリペプチドである、請求項１～６のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項8] イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ４である、請求項１～７のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項9] 前記第１ポリペプチドが、ＥＵインデックス１３１位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、請求項８に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項10] 前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス２２８位のアミノ酸残基がＰｒｏに置換されたポリペプチドである、請求項９に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項11] 前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス４０９位のアミノ酸残基がＬｙｓに置換されたポリペプチドである、請求項１０に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項12] 前記第１ポリペプチドおよび前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックス２３５位のアミノ酸残基がＧｌｕに置換されたポリペプチドである、請求項１１に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項13] イムノグロブリンサブクラスがＩｇＧ１である、請求項１～７のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項14] 前記第１ポリペプチドが、ＥＵインデックスの２２０位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、請求項１３に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項15] 前記第２ポリペプチドが、ＥＵインデックスの２１６～２２０位のアミノ酸残基が欠損したヒンジドメインを含むペプチドまたはＥＵインデックスの２２０位のアミノ酸残基がＳｅｒに置換されたポリペプチドである、請求項１４に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項16] ヘテロダイマータンパク質に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が２０％以上である、請求項１５に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項17] 前記第１ポリペプチドおよび／または前記第２ポリペプチドが、Ｐ２４７Ｉ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ、Ｙ３００Ｆ、Ｐ３９６Ｌ、Ｔ３９３Ａ、Ｈ４３３Ｐ、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２９８Ａ、Ａ３３０Ｌ、Ｉ３３２Ｅ、Ｅ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｌ２３５Ｅ、Ｐ２３８Ａ、Ｎ２９７Ａ、Ｋ３２２Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｋ３２６Ａ、Ｓ２６７Ｅ、Ｈ２６８Ｆ、Ｓ３２４Ｔ、Ｋ２７４Ｑ、Ｎ２７６Ｋ、Ｙ２９６Ｆ、Ｋ３２６Ｗ、Ｋ３２６Ｙ、Ｅ３３３Ａ、Ｅ３３３Ｓ、Ａ３３９Ｔ、Ａ３３９Ｄ、Ｄ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｙ、Ｖ３９７ＭおよびＶ４２２Ｉから選ばれる少なくとも一つのアミノ酸残基置換を含むポリペプチドである、請求項１５または１６に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項18] 前記第１ポリペプチドおよび／または前記第２ポリペプチドが、少なくとも１つの結合タンパク質がＣＨおよびＣＬ－ＦｃのＮ末端および／またはＣ末端に結合したポリペプチドである、請求項１～１７のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

[請求項19] 前記結合タンパク質が、抗体可変領域、ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｉｎｇｌｅ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ（ＶＨＨ）、リガンドタンパク質および受容体タンパク質から選ばれるいずれか１つのタンパク質である、請求項１８に記載にヘテロダイマータンパク質。

[請求項20] （ｉ）前記第１ポリペプチドが、イムノグロブリン重鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）がＣＨのＮ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、イムノグロブリン軽鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）がＣＬ－ＦｃのＮ末端に結合したポリペプチドである

ヘテロダイマータンパク質、および（ｉｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＬがＣＨのＮ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＨがＣＬ－ＦｃのＮ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、請求項１～１９のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

［請求項21］ （ｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＨがＣＨのＣ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＬがＣＬ－ＦｃのＣ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および（ｉｉ）前記第１ポリペプチドが、ＶＬがＣＨのＣ末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第２ポリペプチドが、ＶＨがＣＬ－ＦｃのＣ末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、請求項１～２０のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

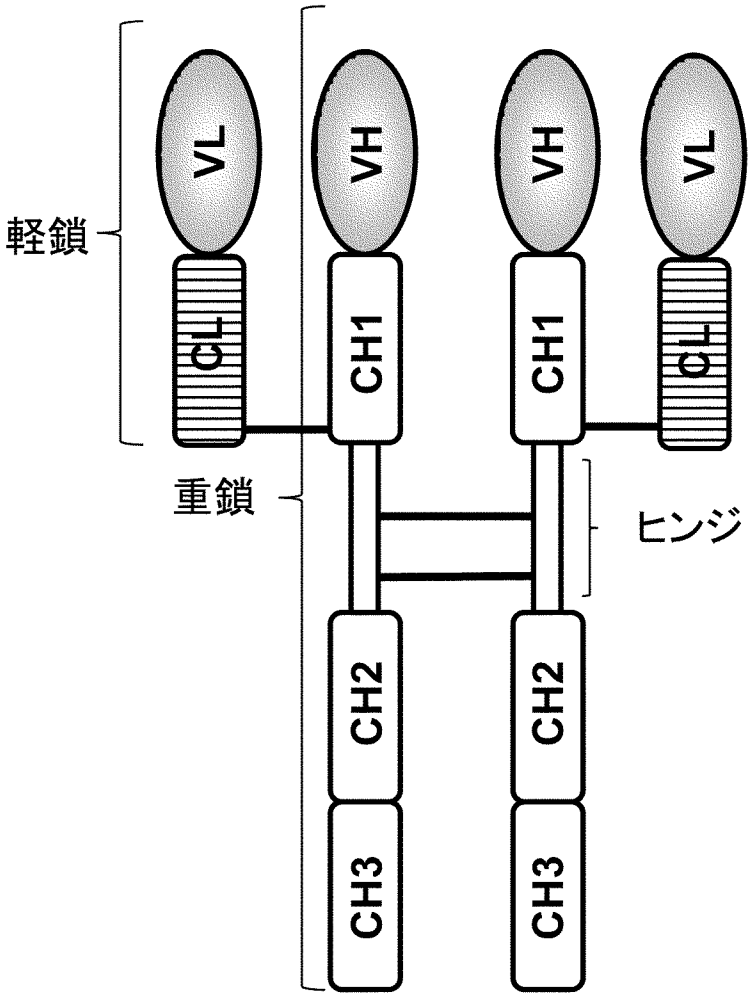
［請求項22］ 一価抗体、二価抗体、三価抗体および四価抗体から選ばれる１つの抗体である請求項１～２１のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質。

［請求項23］ 請求項１～２２のいずれか１項に記載のヘテロダイマータンパク質をコードするＤＮＡ。

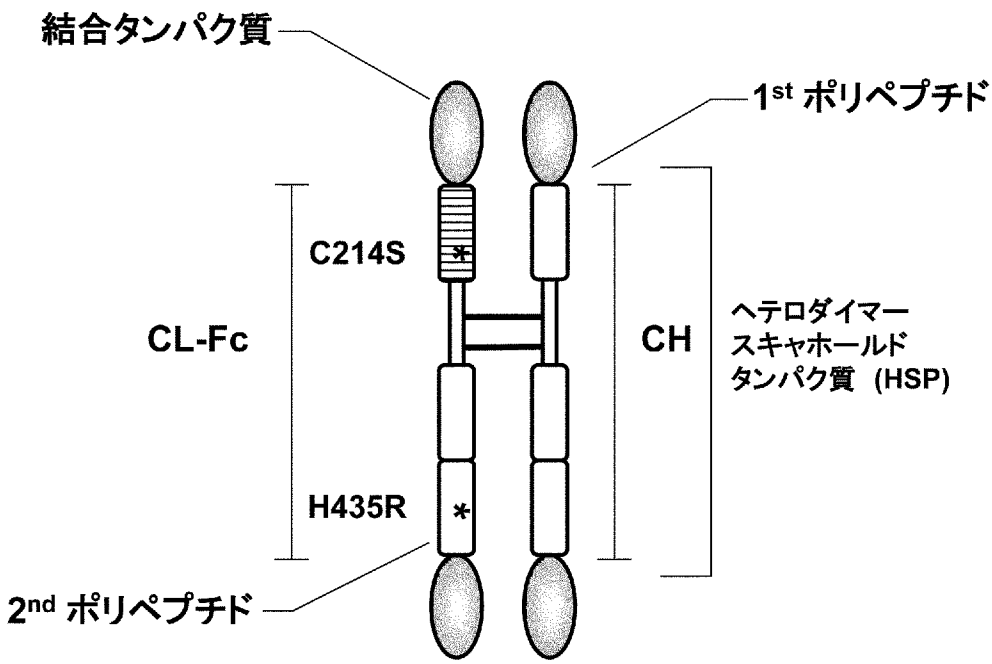
［請求項24］ 請求項２３に記載のＤＮＡを含むタンパク質発現ベクターを含むヘテロダイマータンパク質の発現細胞。

［請求項25］ 請求項２４に記載のヘテロダイマータンパク質の発現細胞を培養し、該培養上清からヘテロダイマータンパク質を精製する工程を含む、ヘテロダイマータンパク質の製造方法。

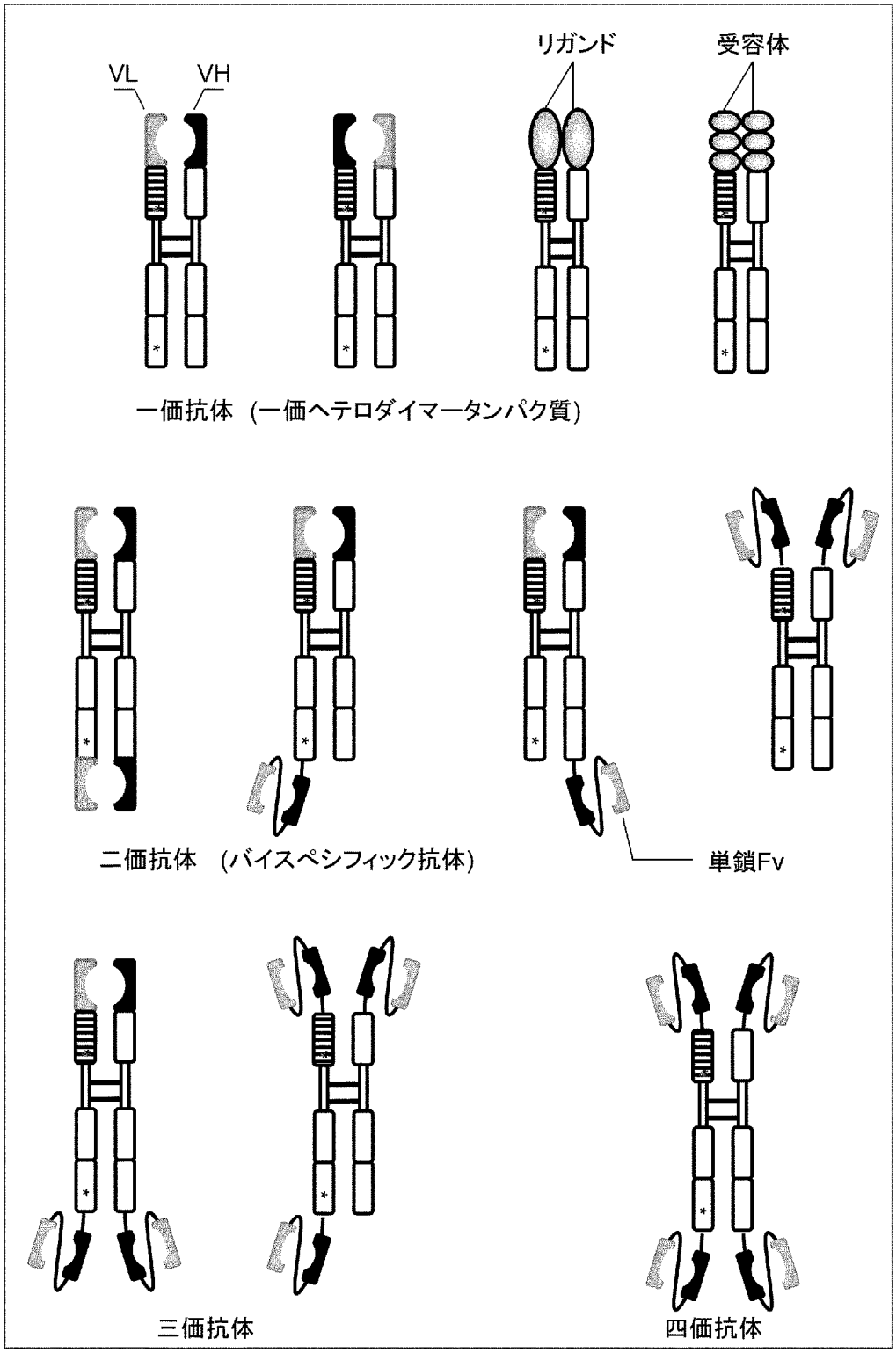
[図1]


軽鎖
重鎖
VL
VH
VH
VL
CL
CH1
CH1
CL
ヒンジ
CH2
CH2
CH3
CH3

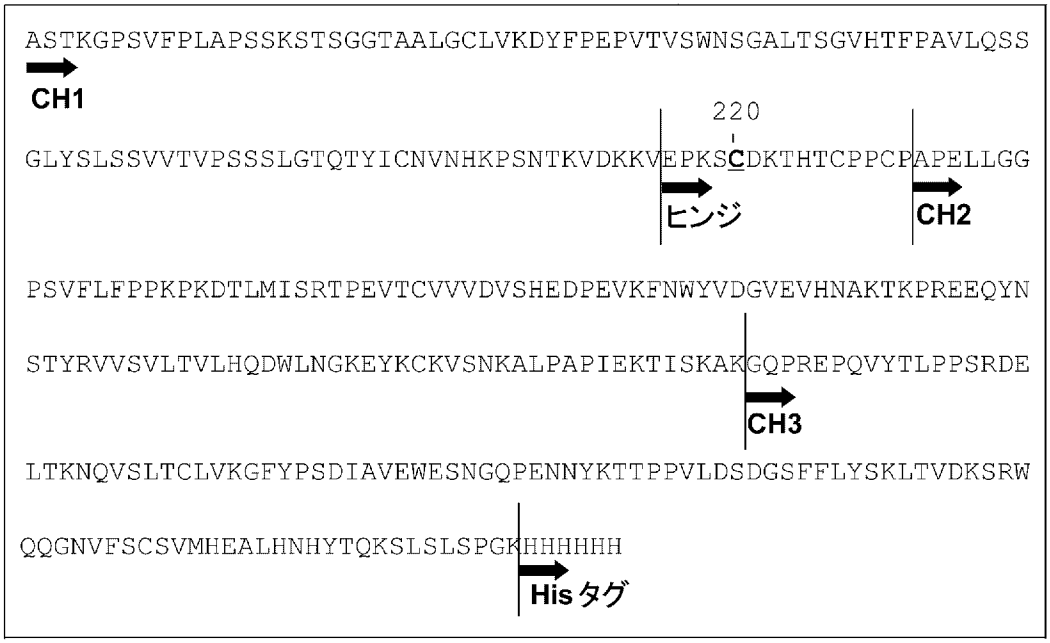
[図2A]


結合タンパク質
1st ポリペプチド
C214S
CL-Fc
CH
ヘテロダイマー
スキャホールド
タンパク質 (HSP)
H435R
2nd ポリペプチド

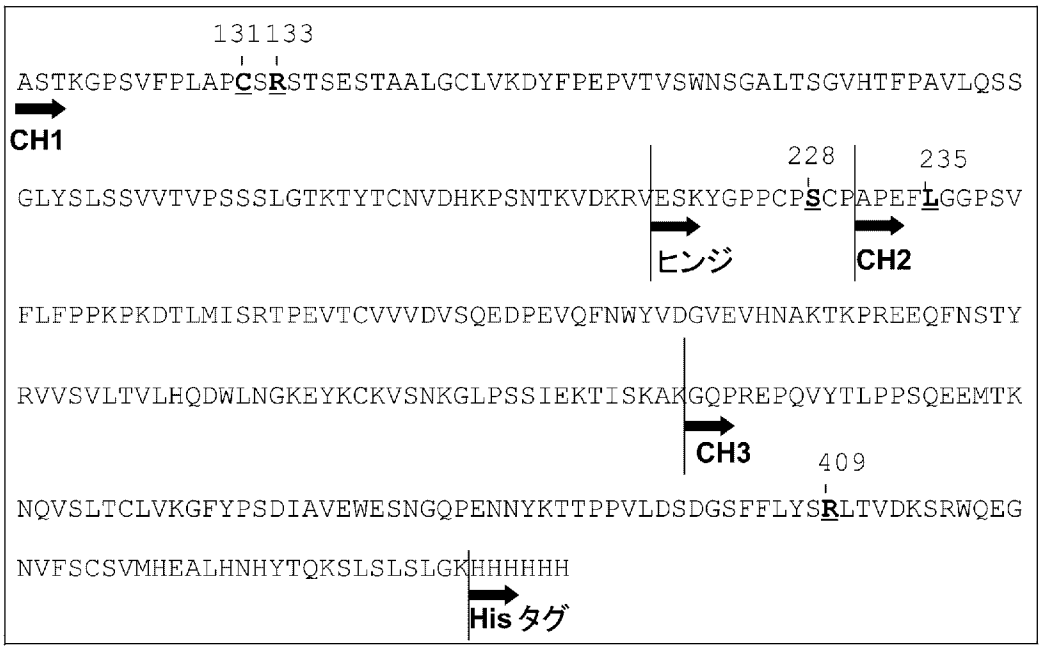
[図2B]


VL
VH
リガンド
受容体
一価抗体 (一価ヘテロダイマータンパク質)
二価抗体 (バイスペシフィック抗体)
単鎖Fv
三価抗体
四価抗体

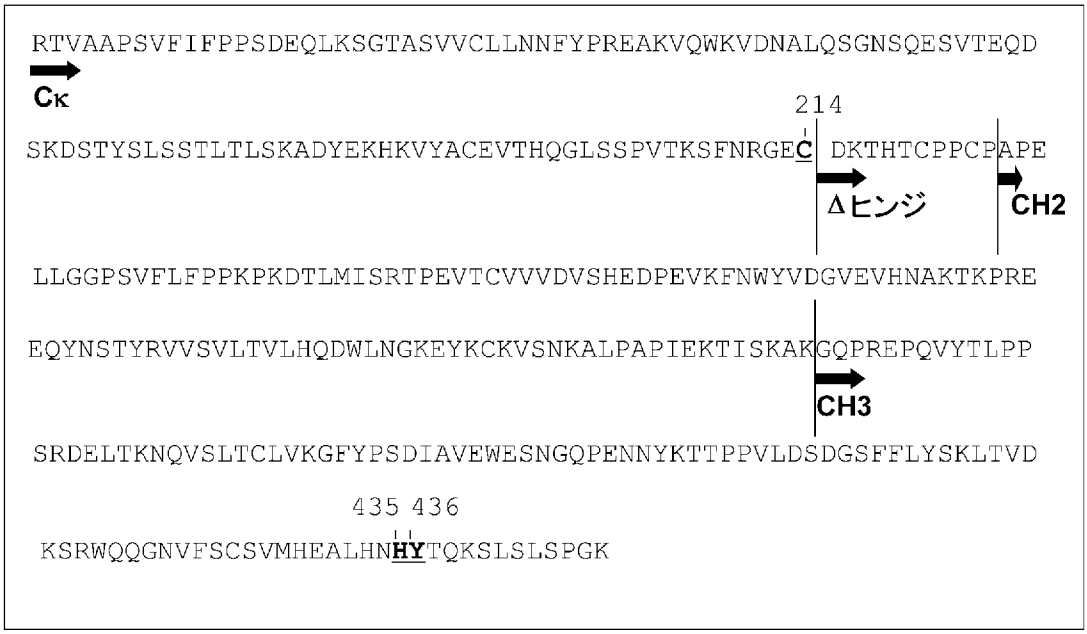
[図3A]


ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
CH1
220
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
ヒンジ
CH2
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
CH3
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH
Hisタグ

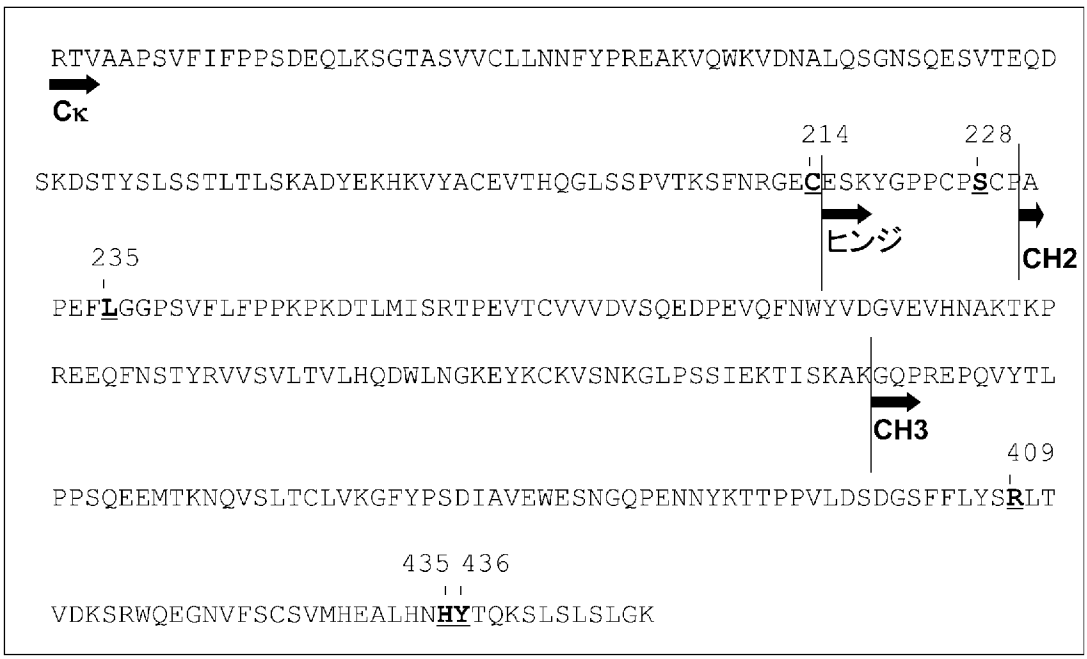
[図3B]


131133
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
CH1
228
235
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
ヒンジ
CH2
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
CH3
409
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKHHHHHH
Hisタグ

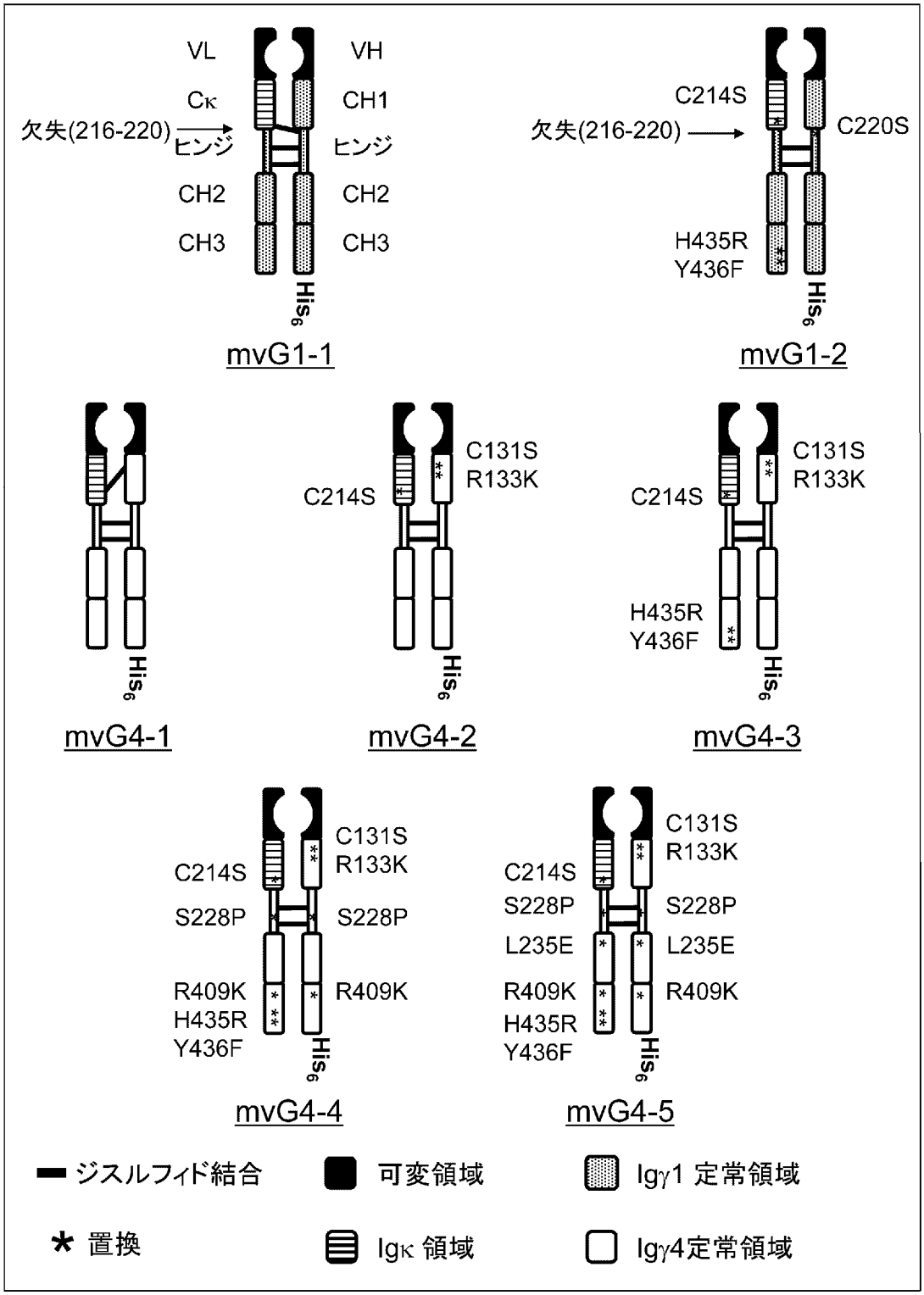
[図4A]


RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Cκ
214
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC DKTHTCPPCPAPE
Δヒンジ
CH2
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CH3
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
435 436
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

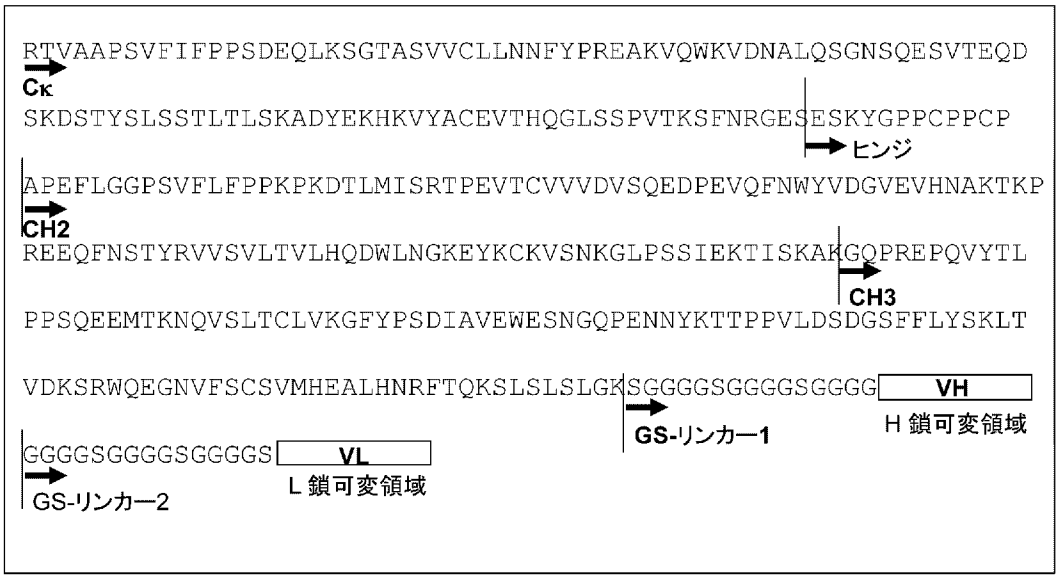
[図4B]


RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Cκ
214
228
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECESKYGPPCPSCPA
ヒンジ
CH2
235
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
CH3
409
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
435 436
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

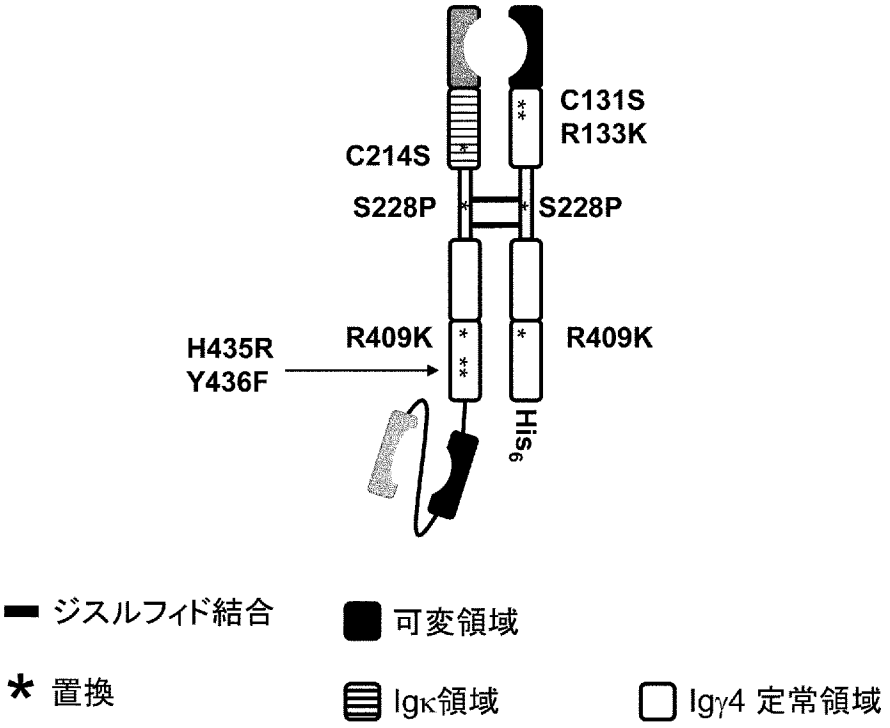
[図5]


VL
VH
Cκ
CH1
欠失(216-220)
ヒンジ
ヒンジ
CH2
CH2
CH3
CH3
His6
mvG1-1
C214S
欠失(216-220)
C220S
H435R
Y436F
His6
mvG1-2
His6
mvG4-1
C214S
C131S
R133K
His6
mvG4-2
C214S
C131S
R133K
H435R
Y436F
His6
mvG4-3
C214S
C131S
R133K
S228P
S228P
R409K
H435R
Y436F
R409K
His6
mvG4-4
C214S
C131S
R133K
S228P
S228P
L235E
L235E
R409K
H435R
Y436F
R409K
His6
mvG4-5
ジスルフィド結合
可変領域
Igγ1 定常領域
* 置換
Igκ 領域
Igγ4定常領域

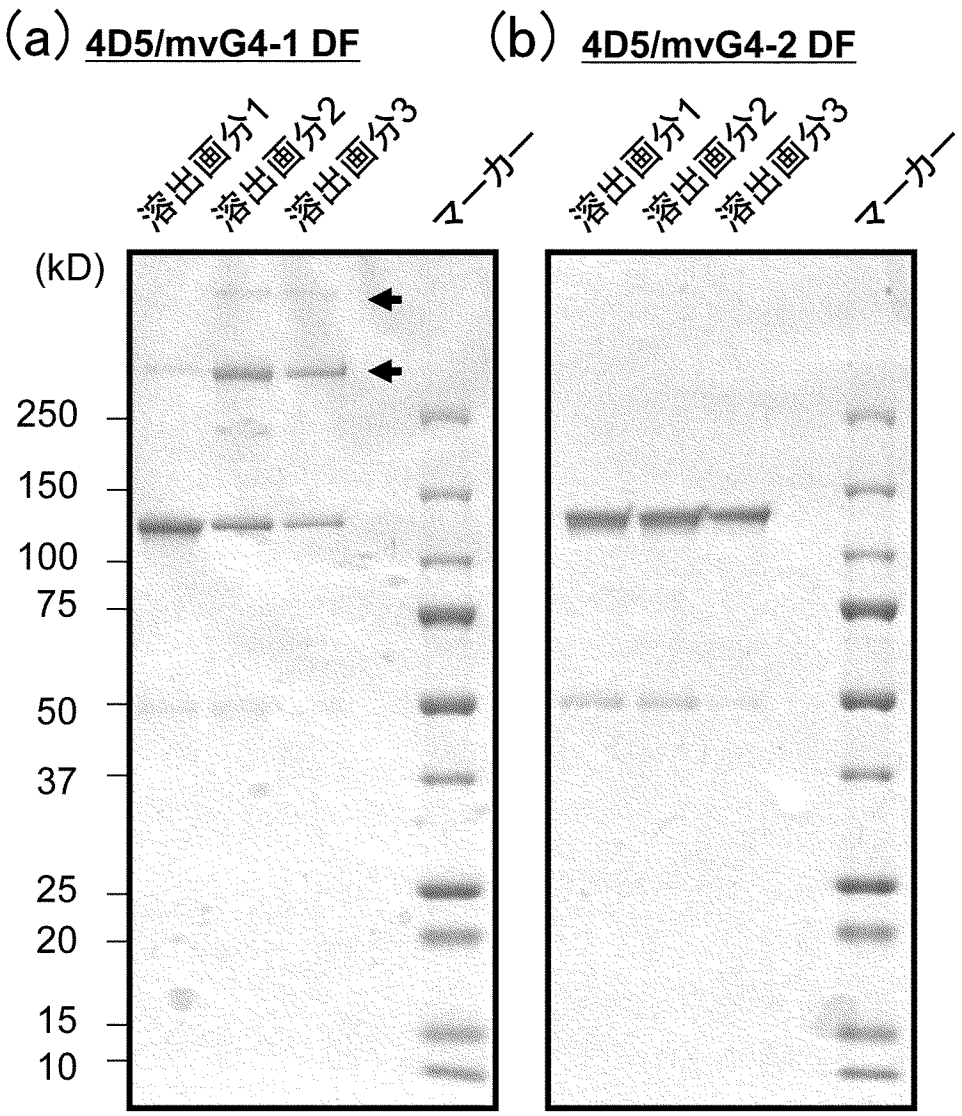
[図6]


RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Cκ
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESESKYGPPCPPCP
ヒンジ
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
CH2
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
CH3
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLGKSGGGGSGGGGSGGGG
VH
H 鎖可変領域
GS-リンカー1
GGGGSGGGGSGGGGS
VL
L 鎖可変領域
GS-リンカー2

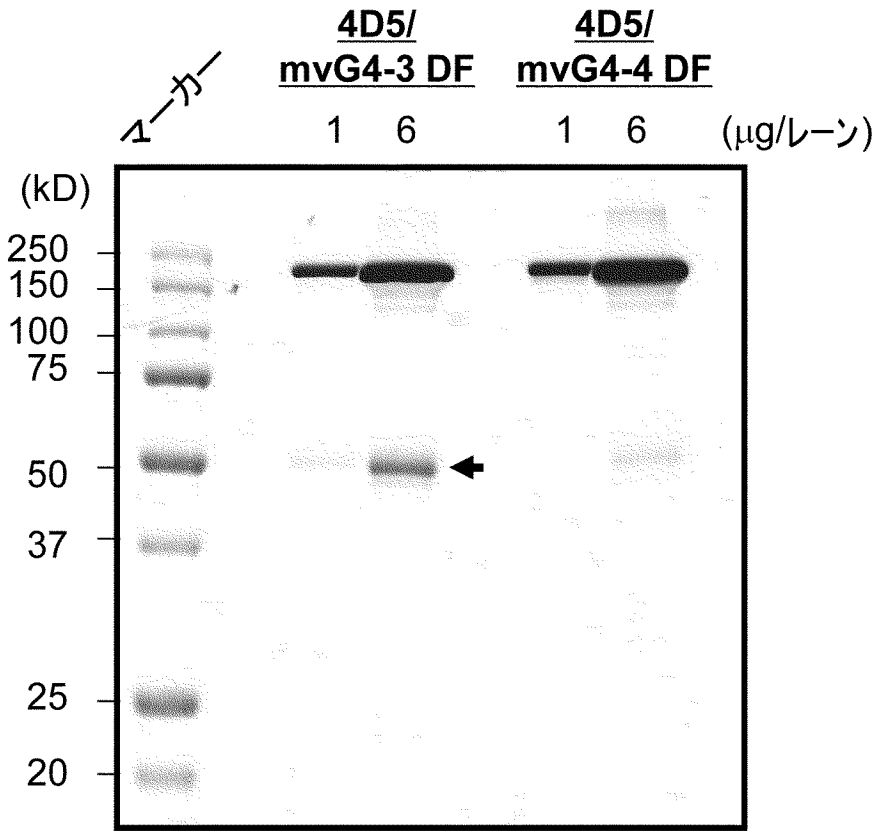
[図7]


C131S
R133K
C214S
S228P
S228P
H435R
Y436F
R409K
R409K
His6
ジスルフィド結合
可変領域
置換
Igκ領域
Igγ4 定常領域

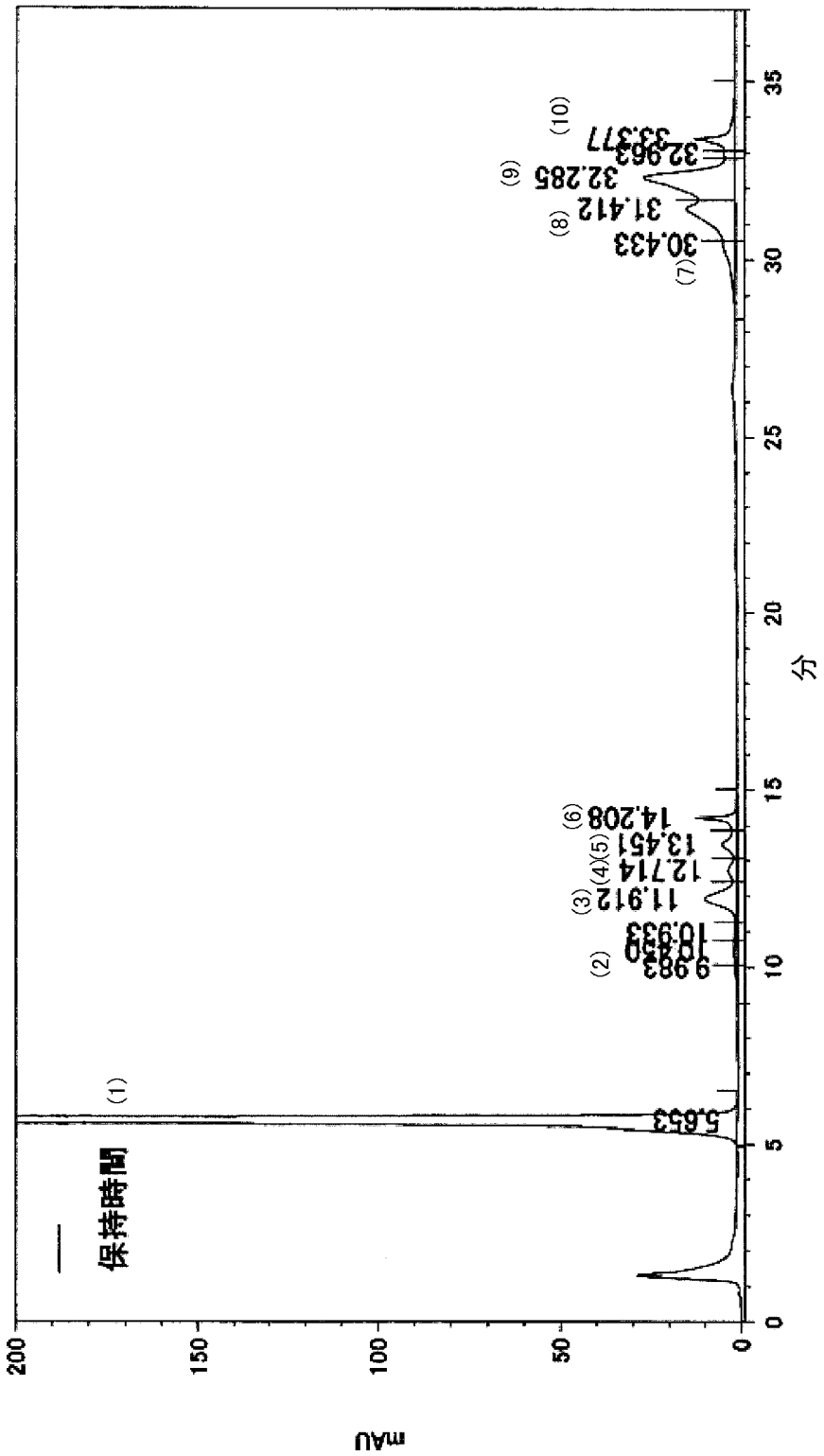
[図8A]


(a) 4D5/mvG4-1 DF
(b) 4D5/mvG4-2 DF
溶出画分1
溶出画分2
溶出画分3
マーカー
溶出画分1
溶出画分2
溶出画分3
マーカー
(kD)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

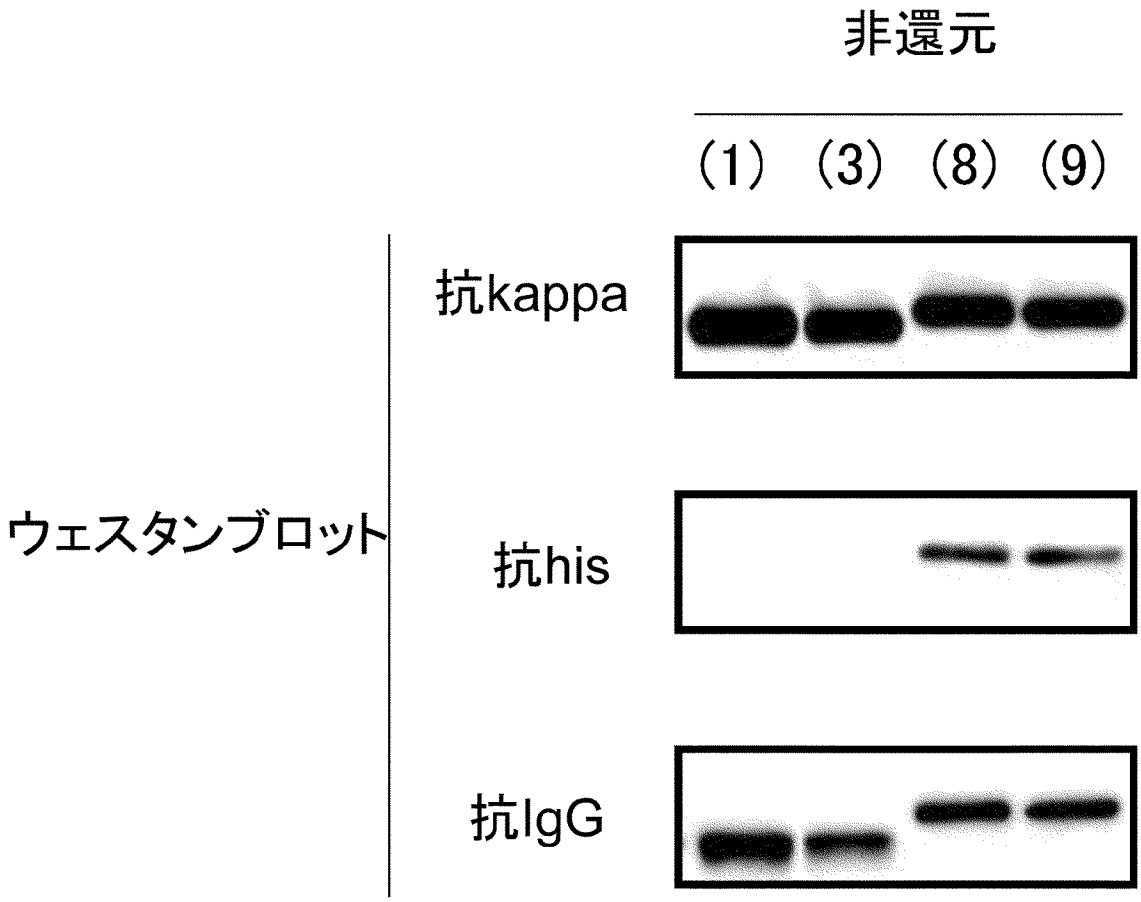
[図8B]


4D5/
mvG4-3 DF
4D5/
mvG4-4 DF
マーカー
1
6
1
6
(μg/レーン)
(kD)
250
150
100
75
50
37
25
20

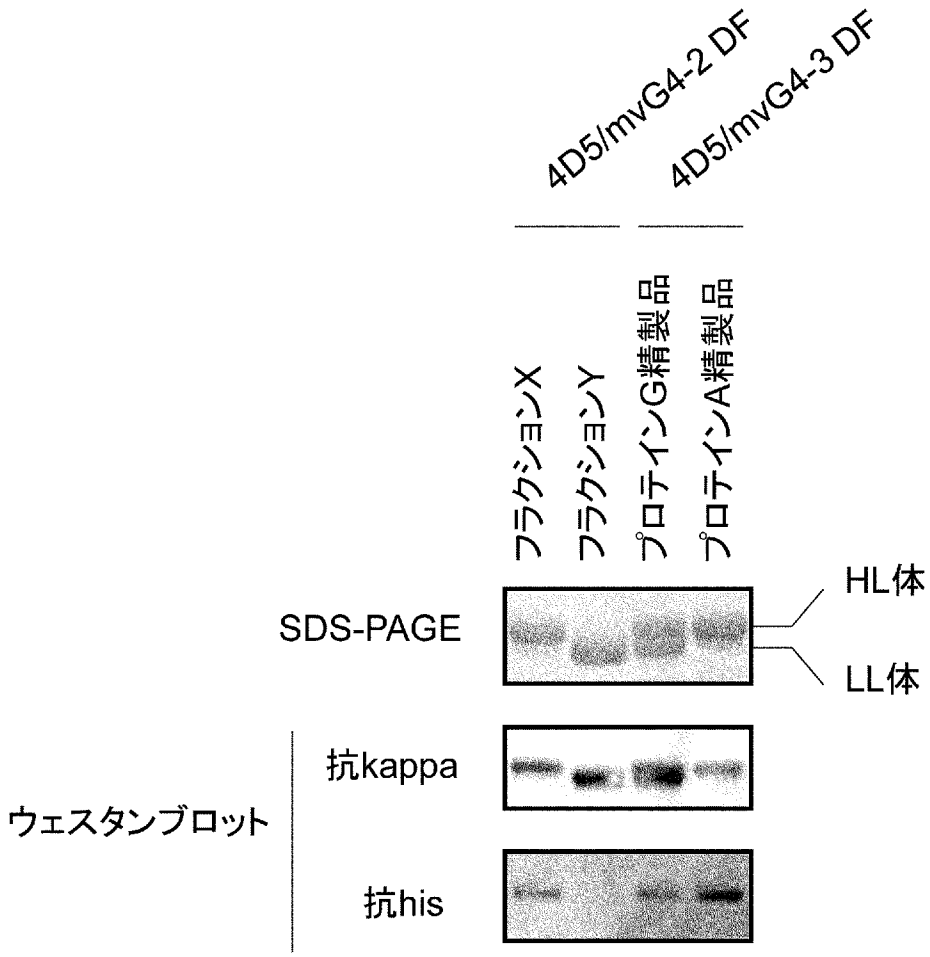
[図9]


mAU
200
150
100
50
0
保持時間
(1)
5.653
(2)
9.983
10.439
10.933
(3)
11.912
(4)(5)
12.714
13.451
(6)
14.208
(7)
30.433
(8)
31.412
(9)
32.285
32.963
(10)
33.377
0
5
10
15
20
25
30
35
分

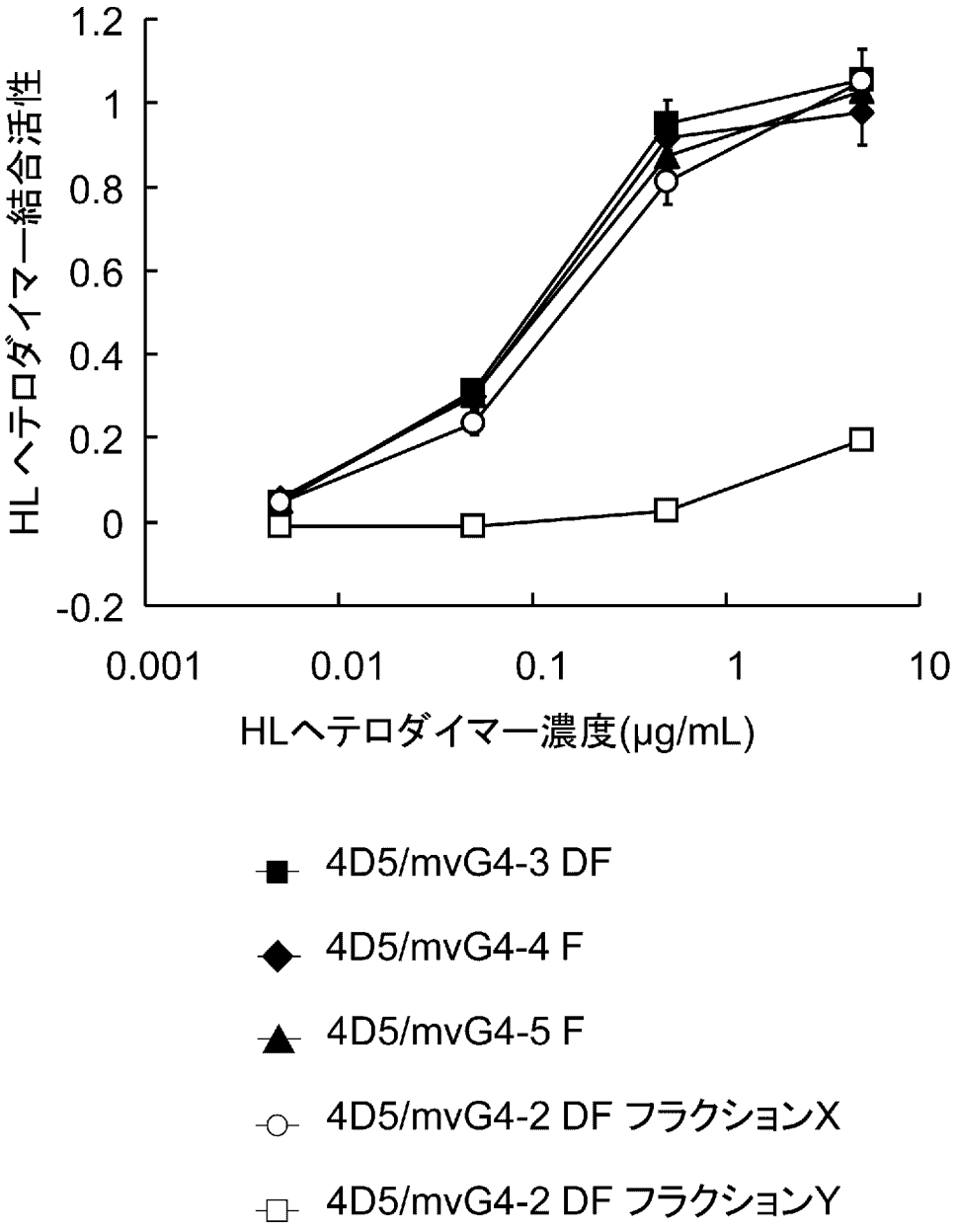
[図10]



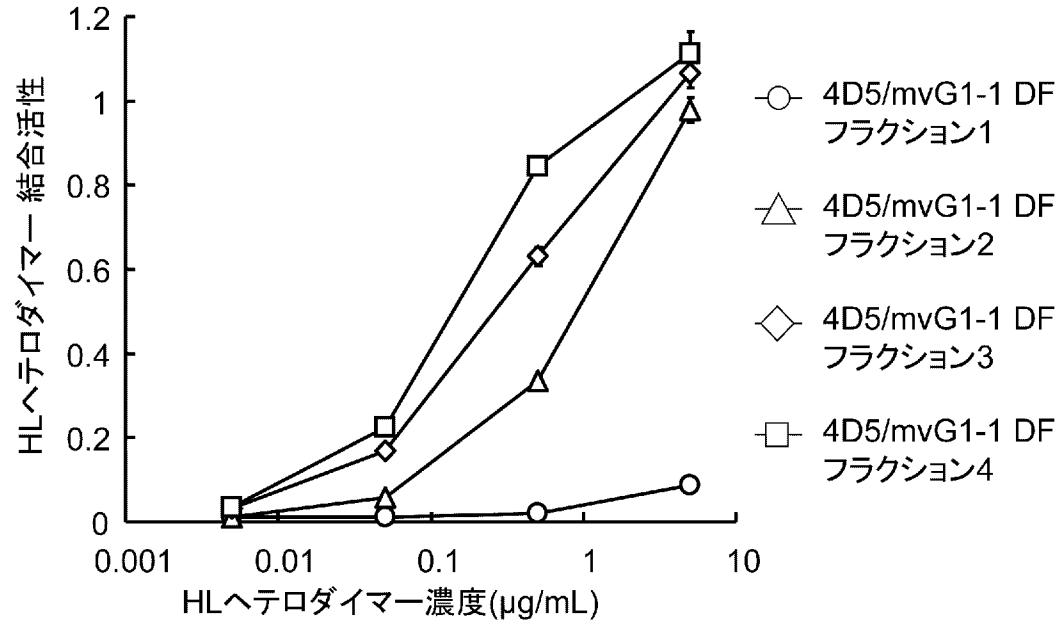
[図11]


4D5/mvG4-2 DF
4D5/mvG4-3 DF
フラクションX
フラクションY
プロテインG精製品
プロテインA精製品
SDS-PAGE
HL体
LL体
ウェスタンブロット
抗kappa
抗his

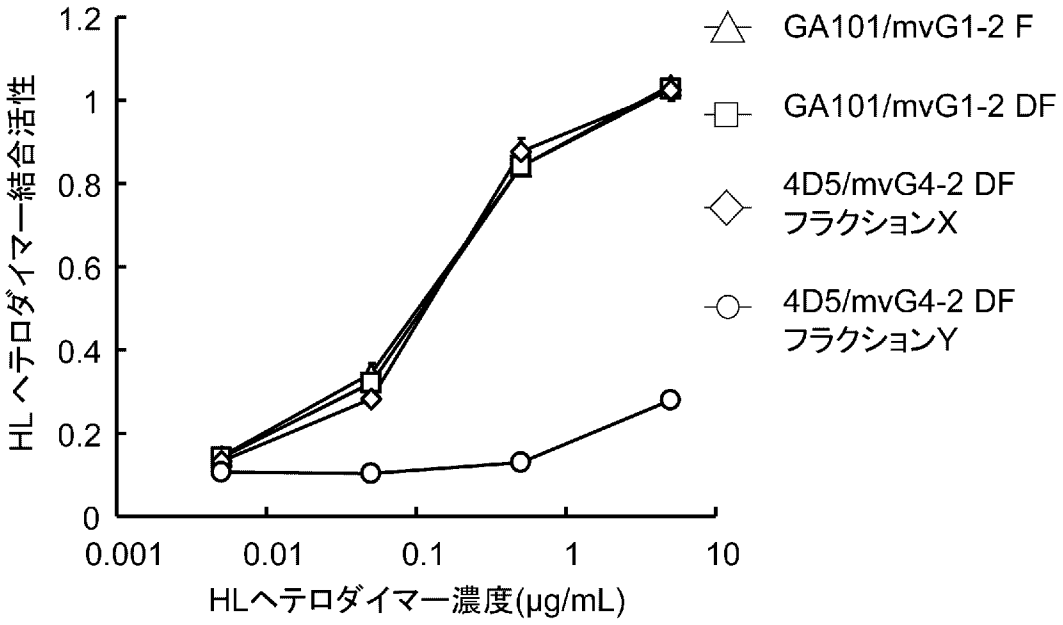
[図12]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
HL ヘテロダイマー結合活性
0.001
0.01
0.1
1
10
HLヘテロダイマー濃度(μg/mL)
4D5/mvG4-3 DF
4D5/mvG4-4 F
4D5/mvG4-5 F
4D5/mvG4-2 DF フラクションX
4D5/mvG4-2 DF フラクションY

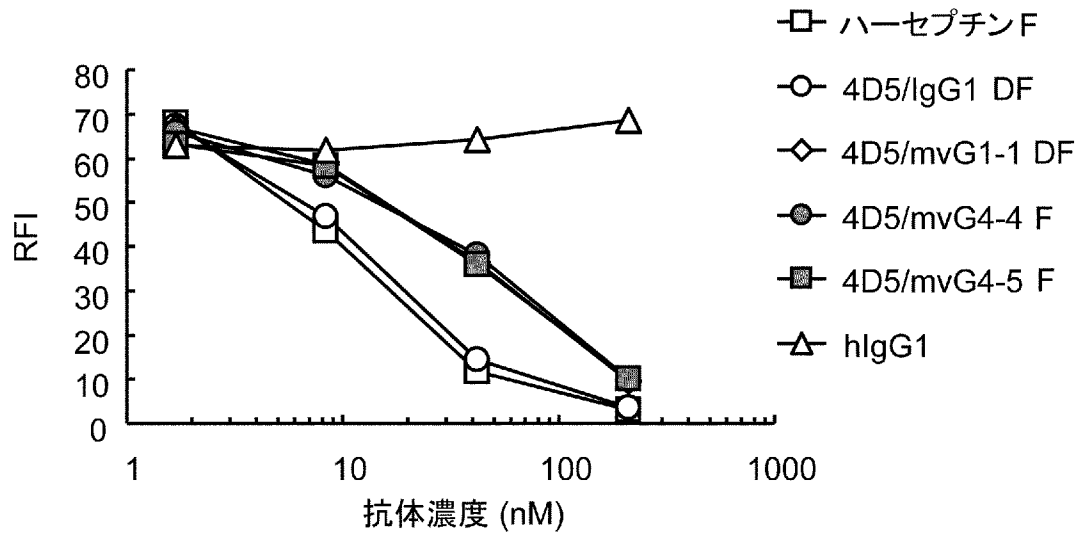
[図13A]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
HLヘテロダイマー 結合活性
HLヘテロダイマー濃度(μg/mL)
4D5/mvG1-1 DF
フラクション1
4D5/mvG1-1 DF
フラクション2
4D5/mvG1-1 DF
フラクション3
4D5/mvG1-1 DF
フラクション4

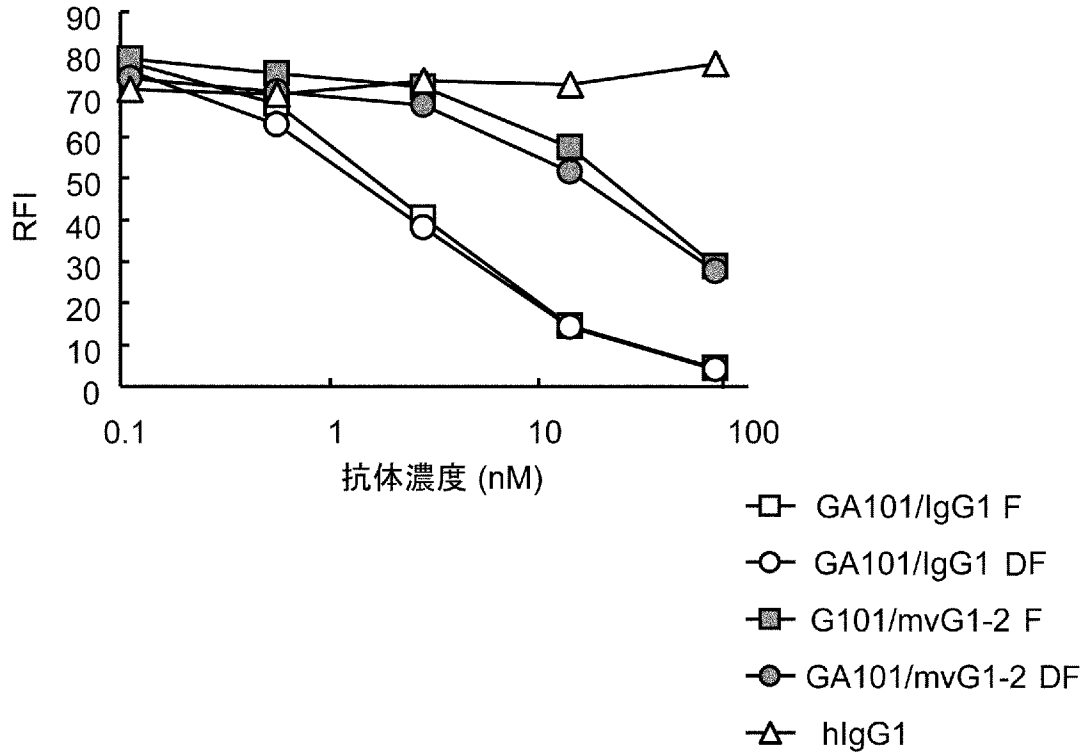
[図13B]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
HL ヘテロダイマー結合活性
HLヘテロダイマー濃度(μg/mL)
GA101/mvG1-2 F
GA101/mvG1-2 DF
4D5/mvG4-2 DF
フラクションX
4D5/mvG4-2 DF
フラクションY

[図14A]

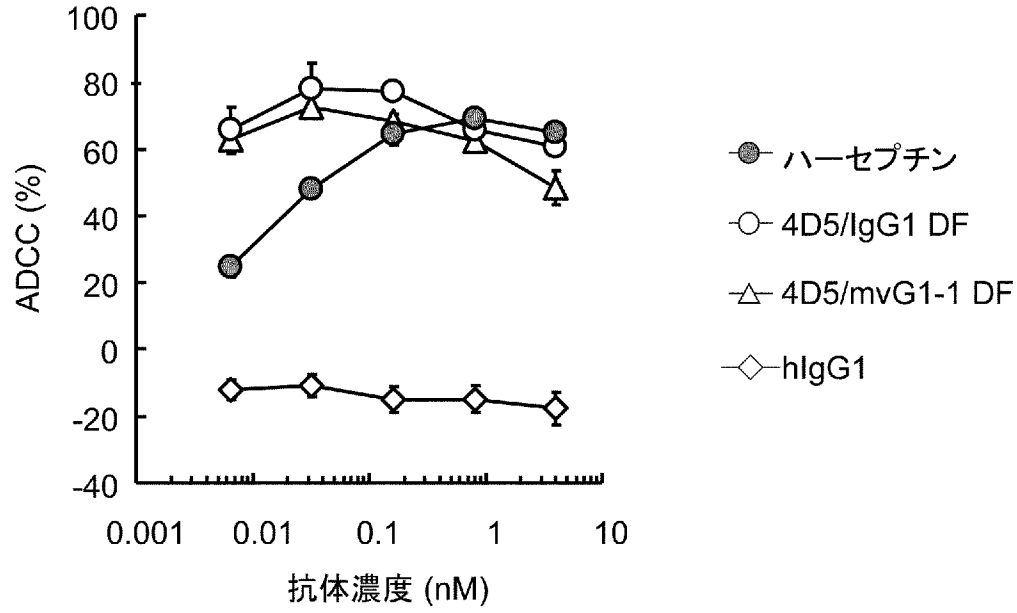

ハーセプチンF
4D5/IgG1 DF
4D5/mvG1-1 DF
4D5/mvG4-4 F
4D5/mvG4-5 F
hIgG1
RFI
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
抗体濃度 (nM)

[図14B]

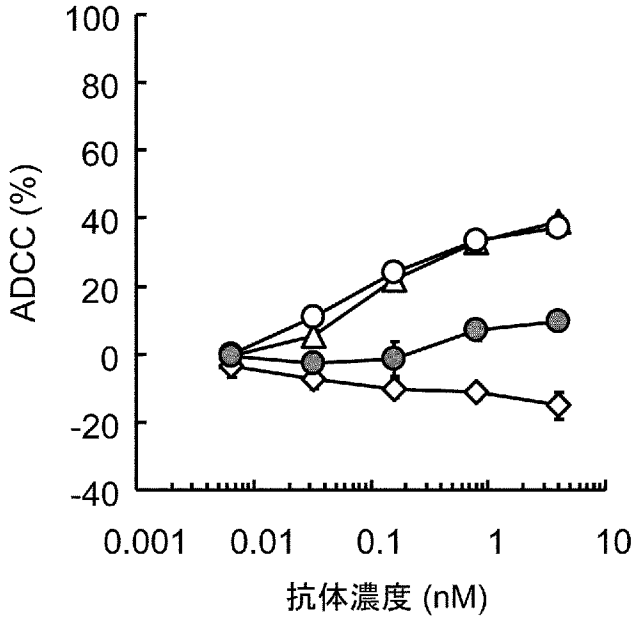

RFI
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
抗体濃度 (nM)
GA101/IgG1 F
GA101/IgG1 DF
G101/mvG1-2 F
GA101/mvG1-2 DF
hIgG1

[図15A]

(a) SK-BR-3

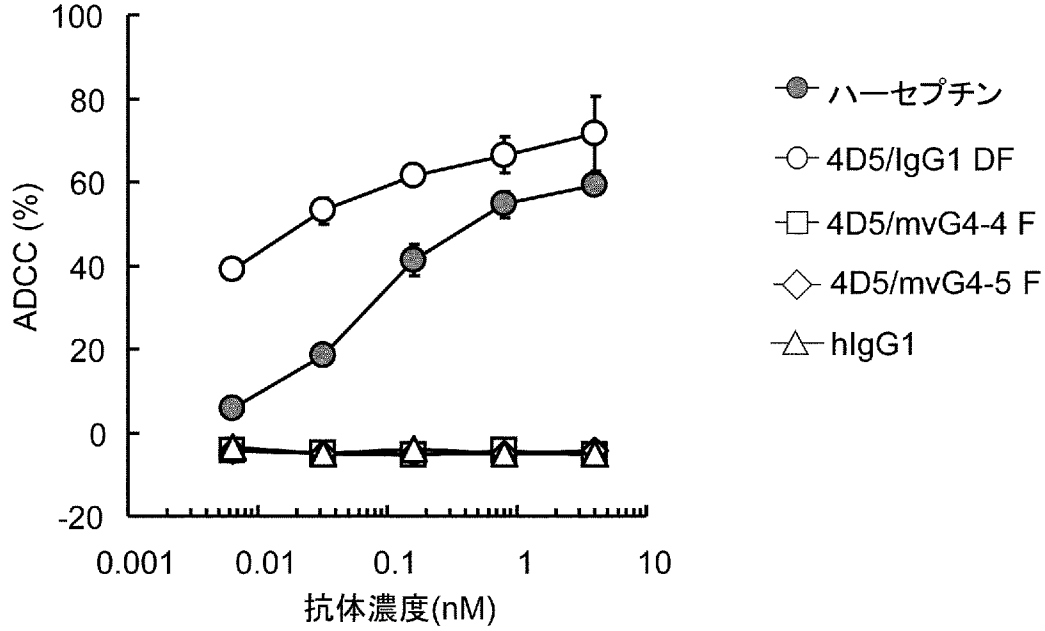


(b) BT-20

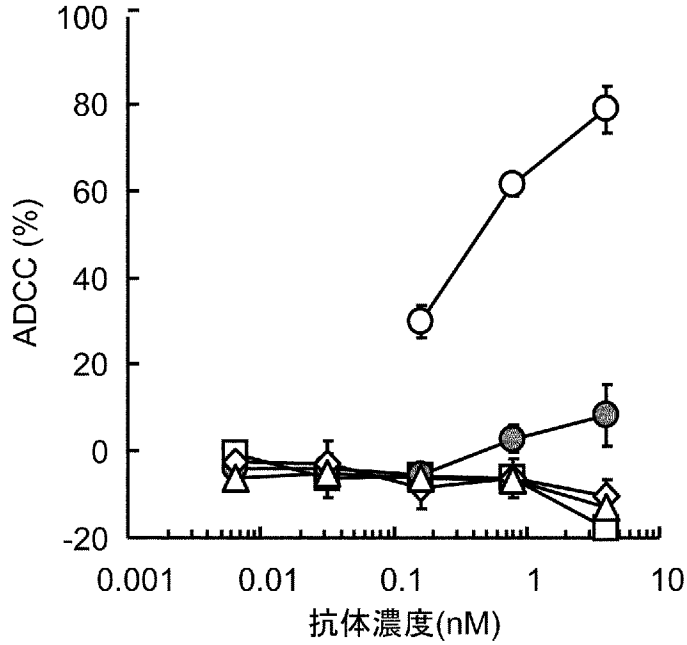


[図15B]

(a) SK-BR-3

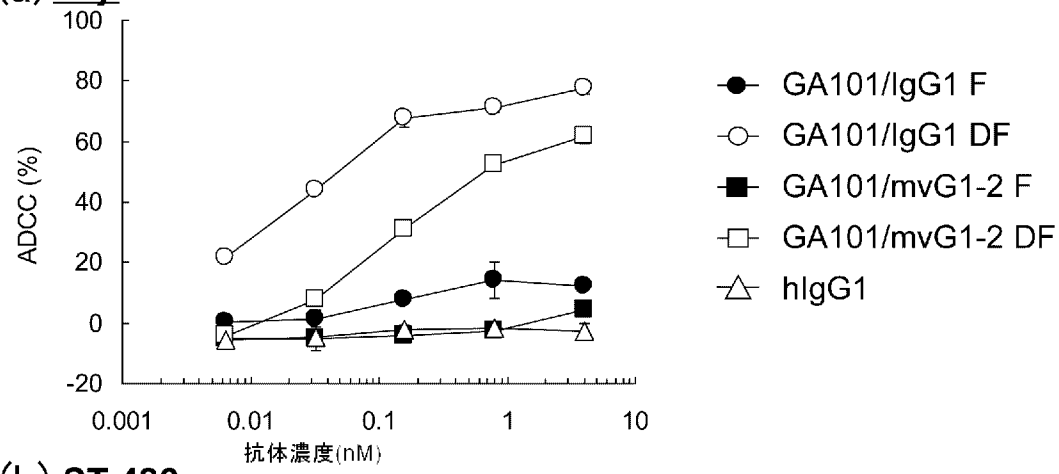


(b) BT-20

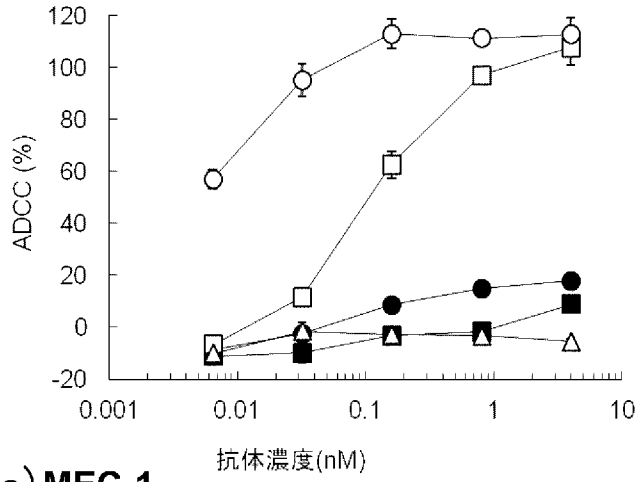


[図16]

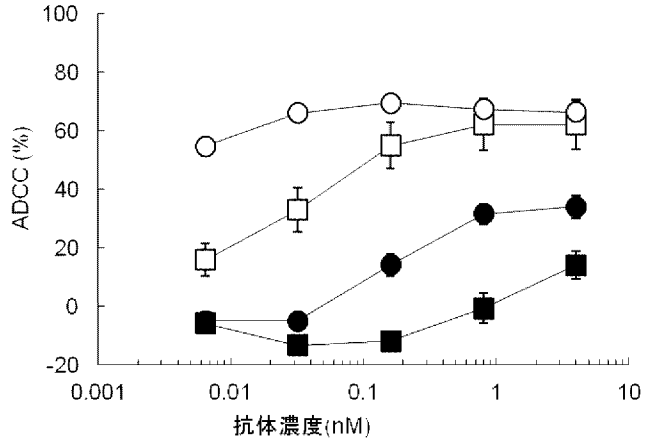
(a) Raji



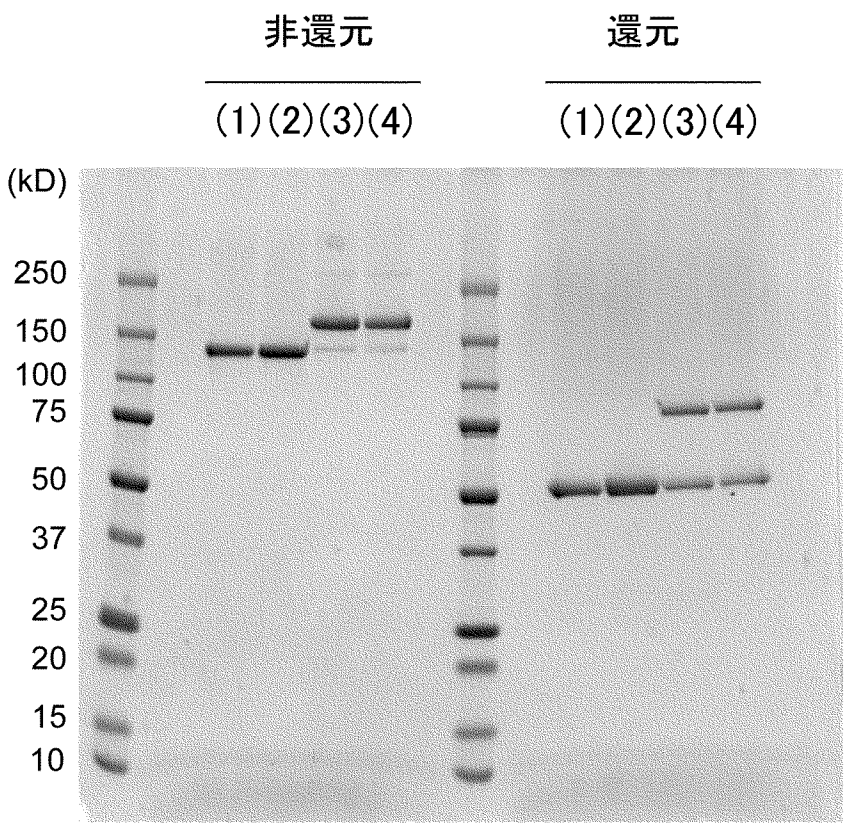
(b) ST-486



(c) MEC-1



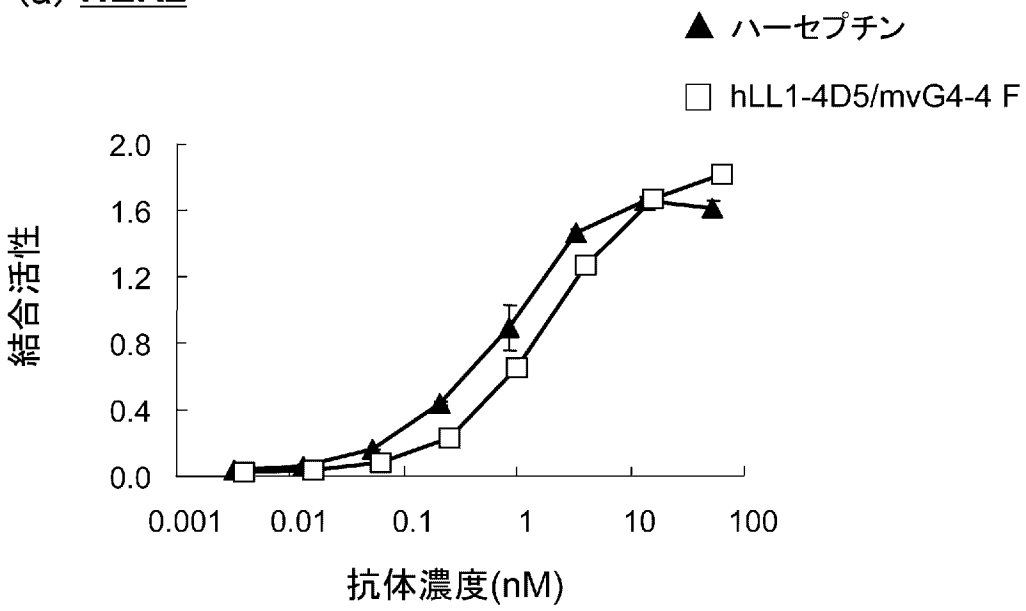
[図17]



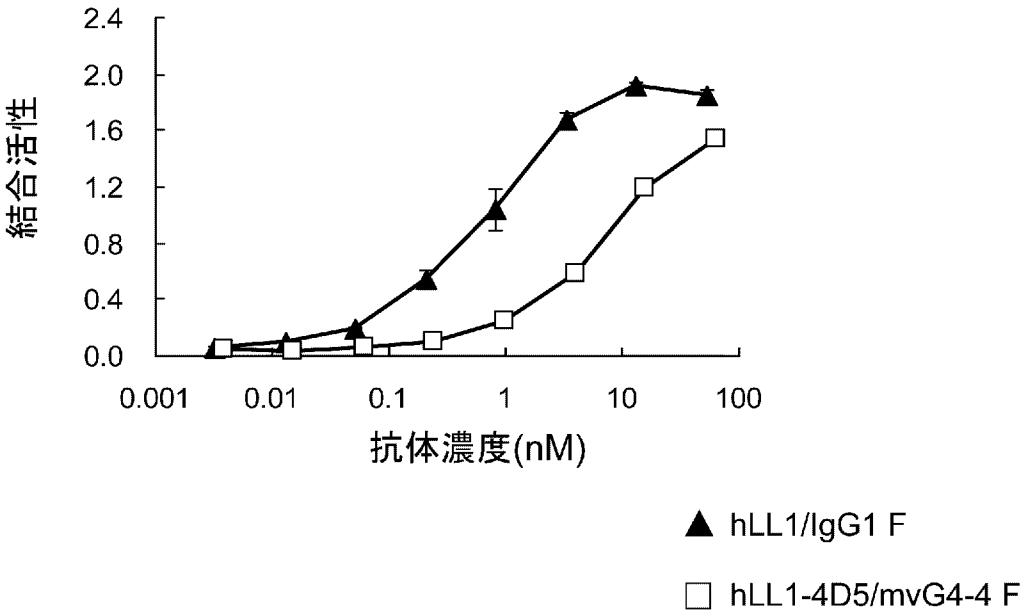
(1) 4D5/mvG4-4 F
(2) hLL1/mvG4-4 F
(3) hLL1-4D5/mvG4-4 F
(4) hLL1-2F2/mvG4-4 F

[図18]

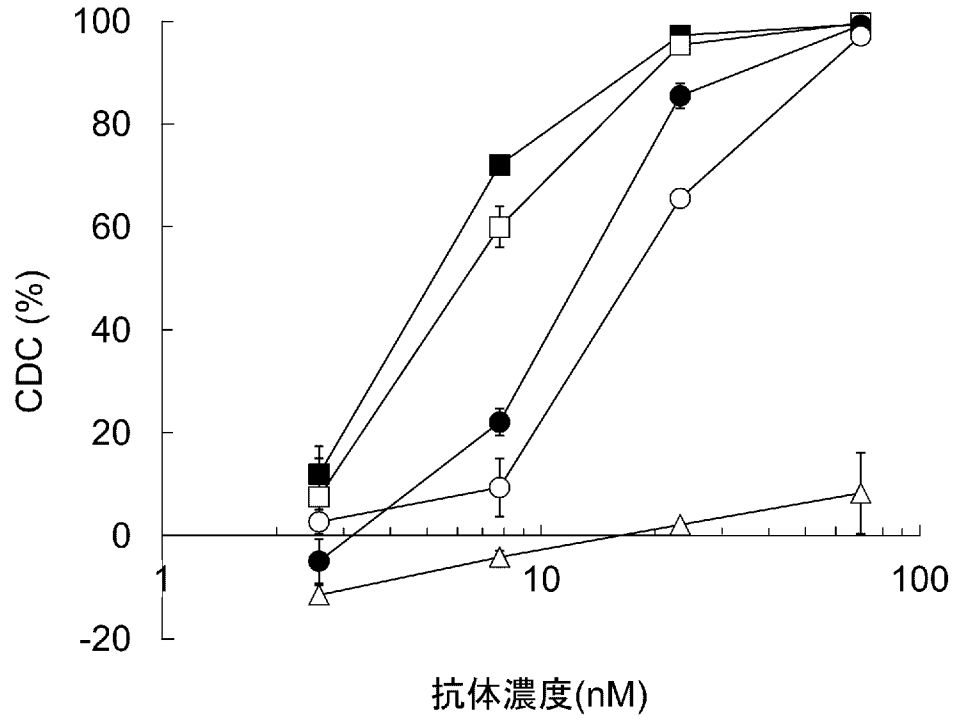
(a) HER2



(b) CD74

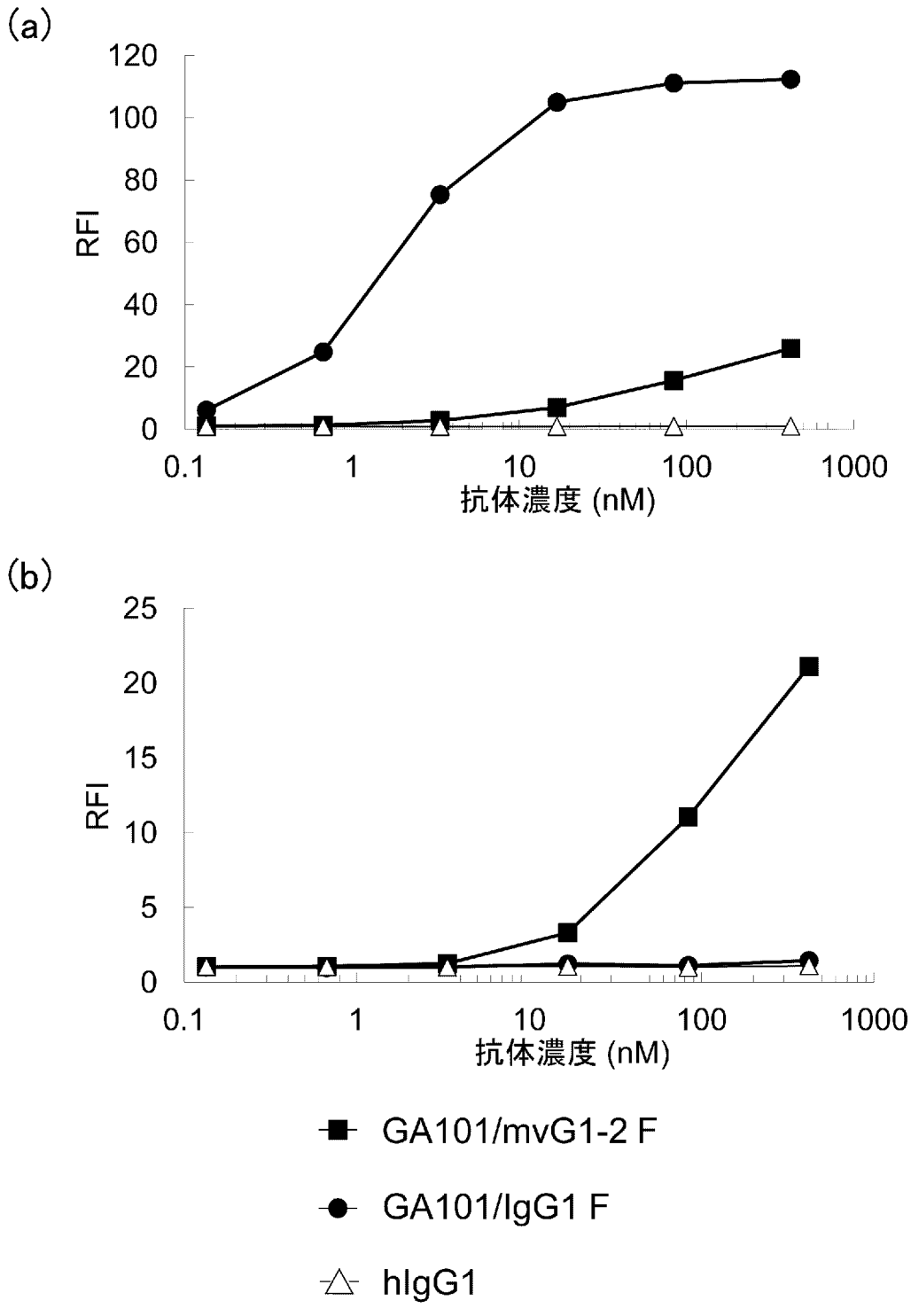


[図19]

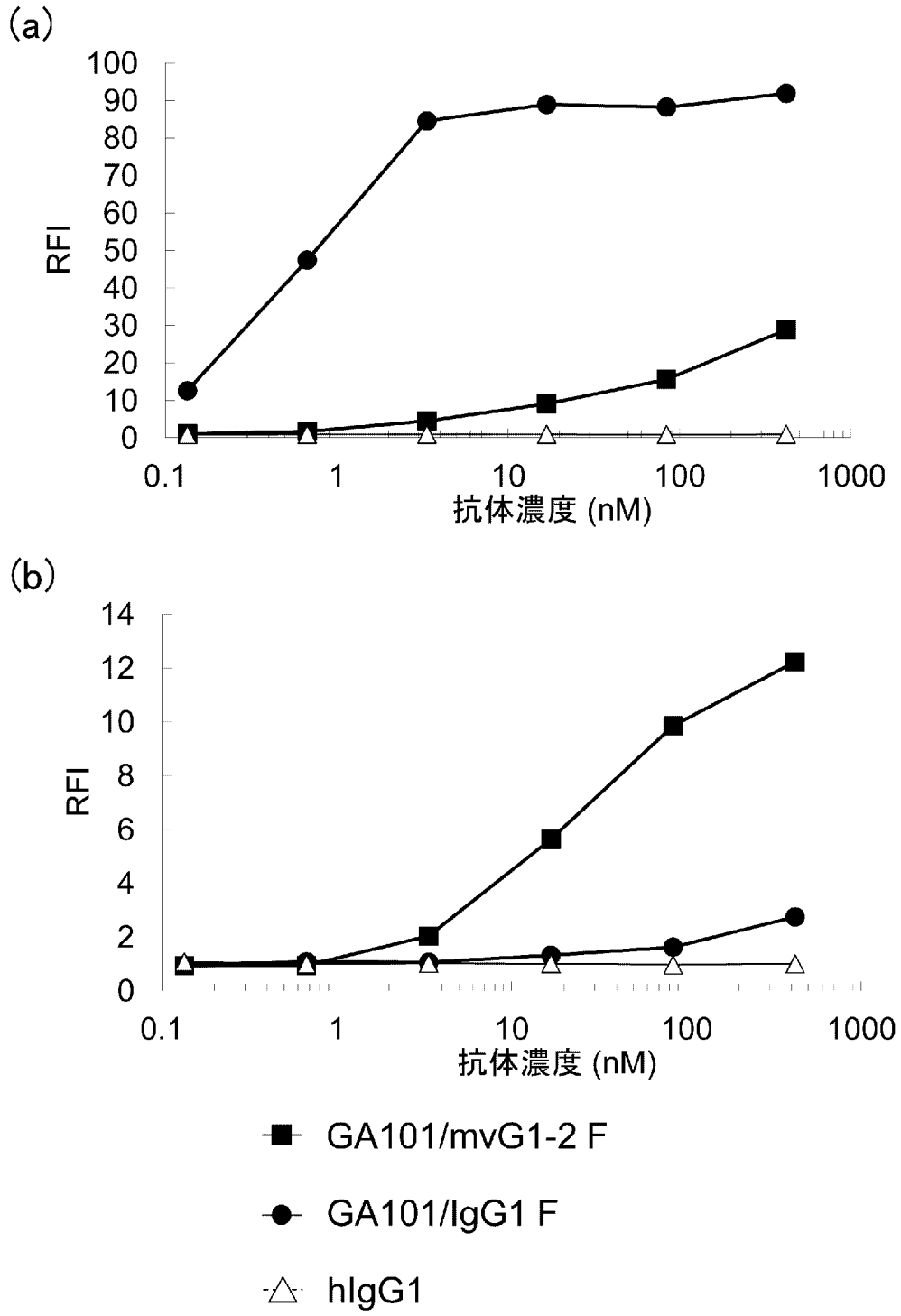

100
80
60
40
20
0
-20
CDC (%)
1
10
100
抗体濃度(nM)


GA101/IgG1 F
GA101/IgG1 DF
GA101/mvG1-2 F
GA101/mvG1-2 DF
hIgG1

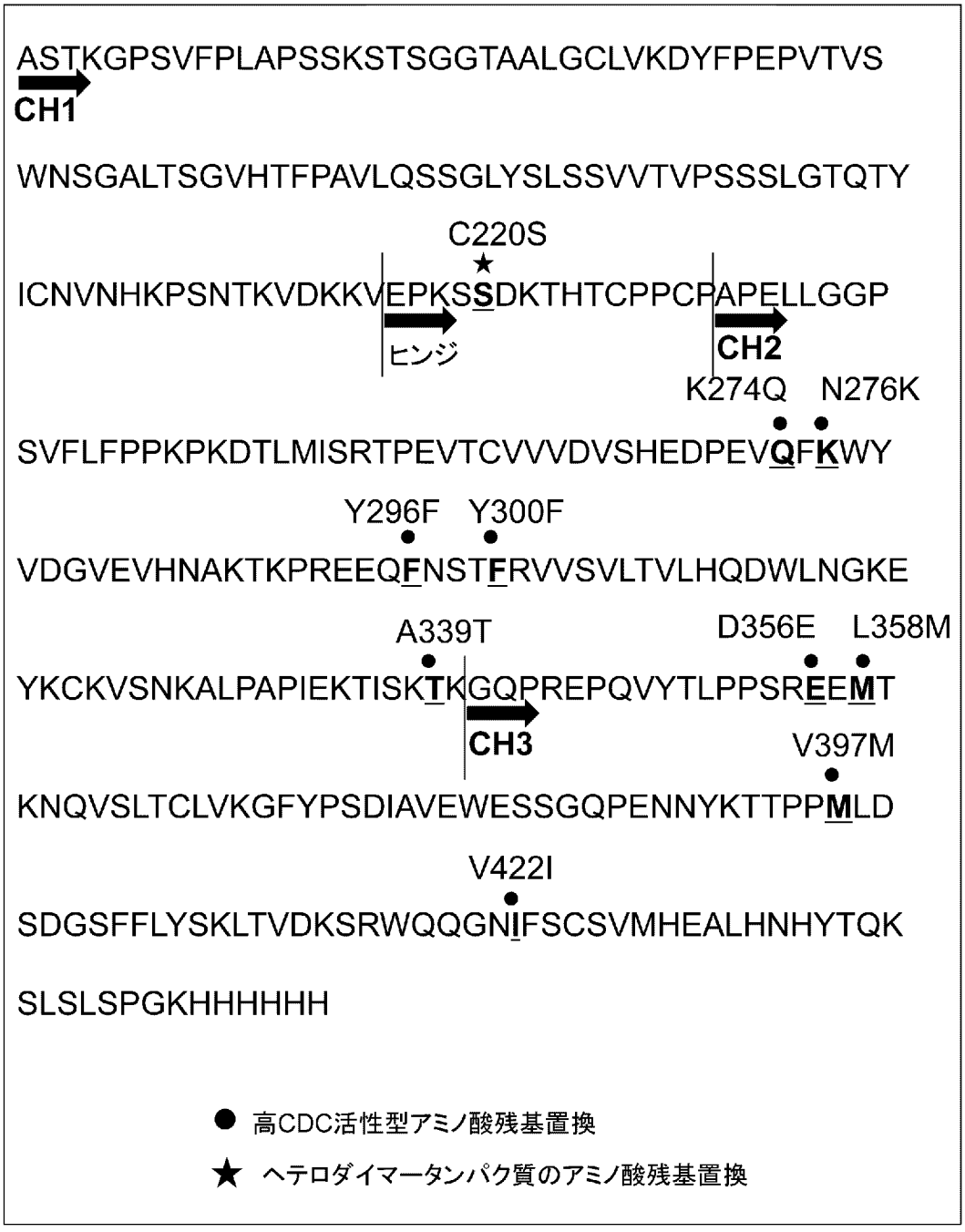
[図20]


(a)
120
100
80
60
40
20
0
RFI
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度 (nM)
(b)
25
20
15
10
5
0
RFI
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度 (nM)
GA101/mvG1-2 F
GA101/IgG1 F
hIgG1

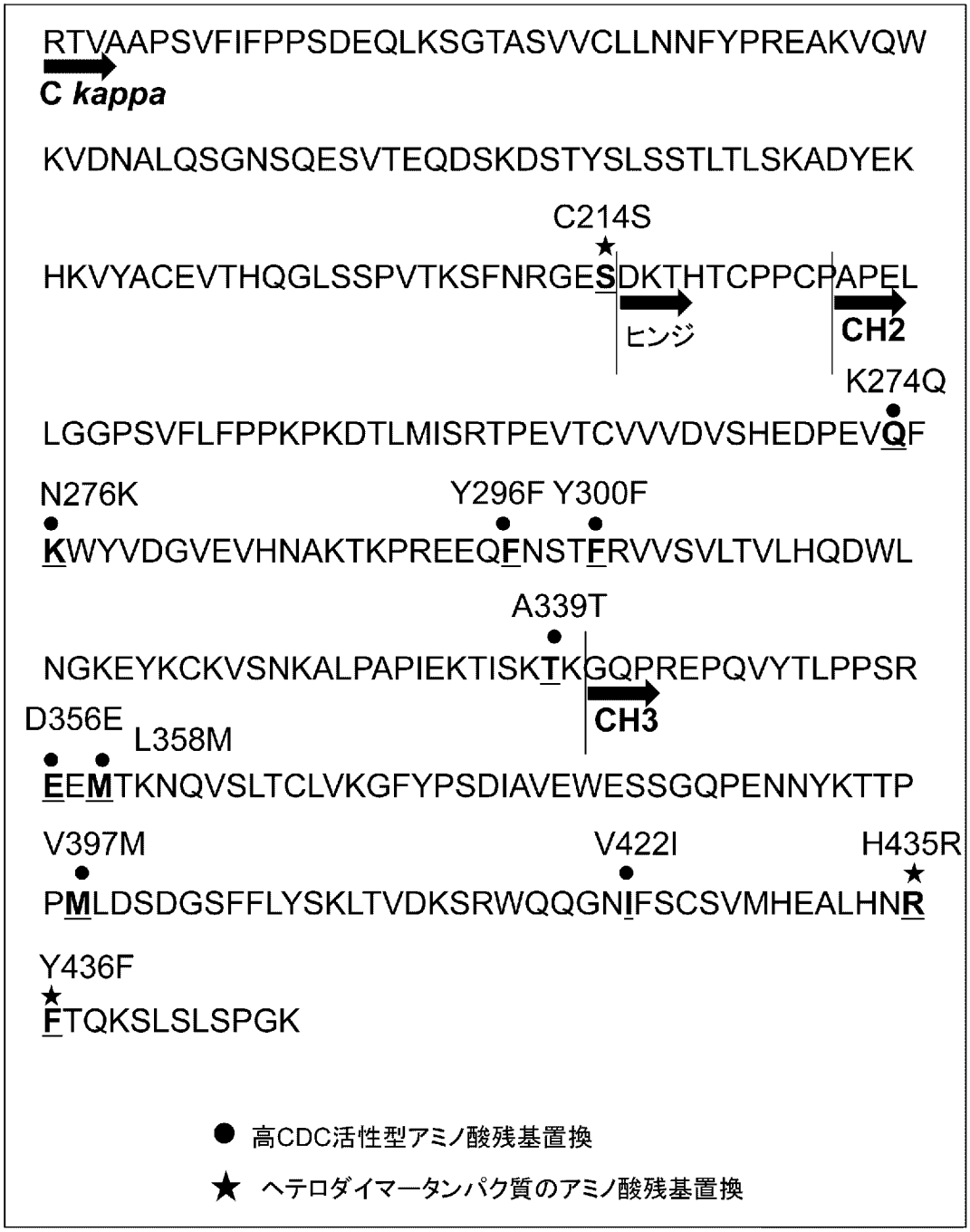
[図21]


(a)
RFI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度 (nM)
(b)
RFI
14
12
10
8
6
4
2
0
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度 (nM)
GA101/mvG1-2 F
GA101/IgG1 F
hIgG1

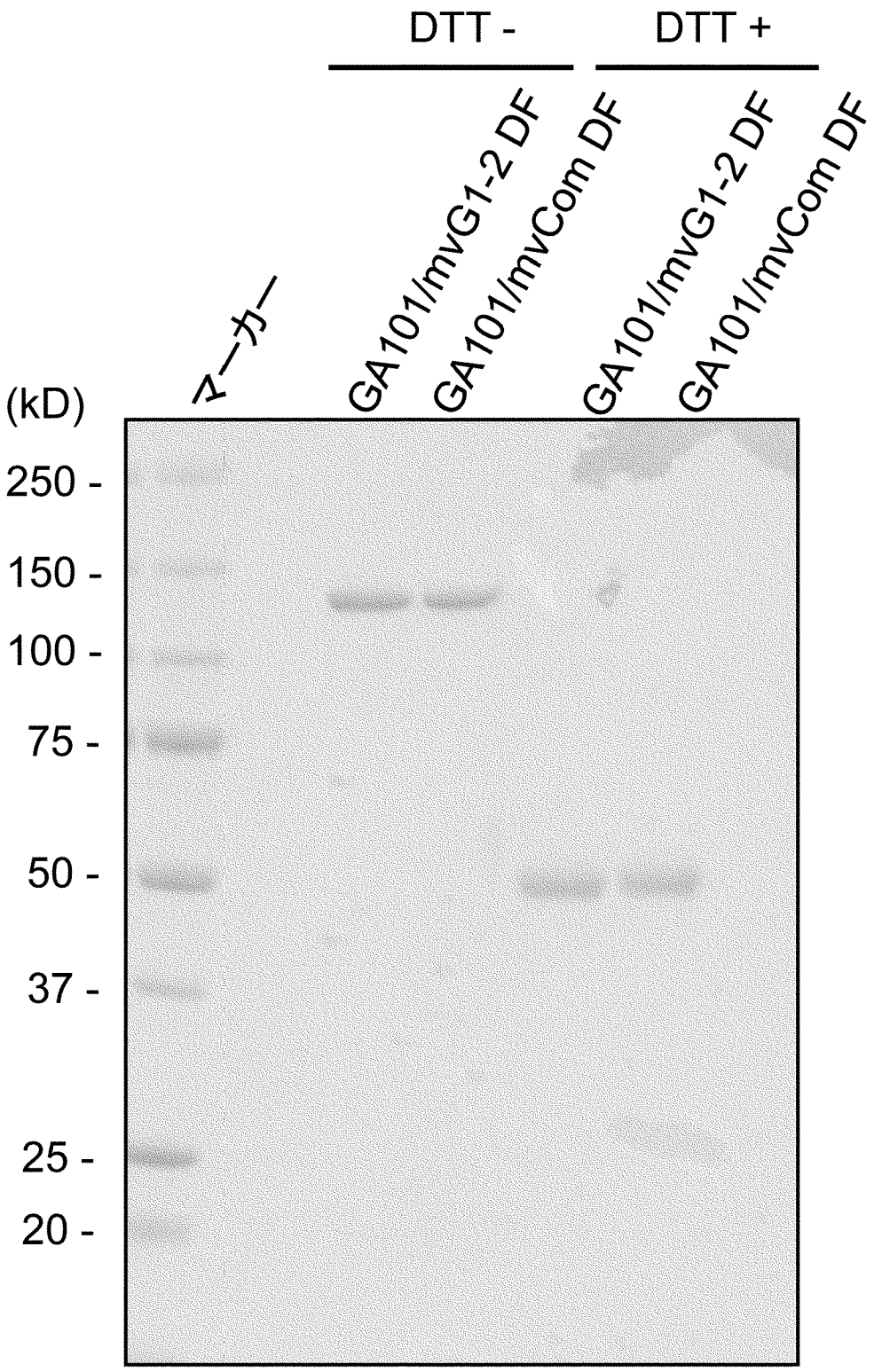
[図22A]


ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
C220S
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
ヒンジ
CH2
K274Q N276K
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY
Y296F Y300F
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKE
A339T D356E L358M
YKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
CH3
V397M
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTPPMLD
V422I
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKHHHHHH
● 高CDC活性型アミノ酸残基置換
★ ヘテロダイマータンパク質のアミノ酸残基置換

[図22B]

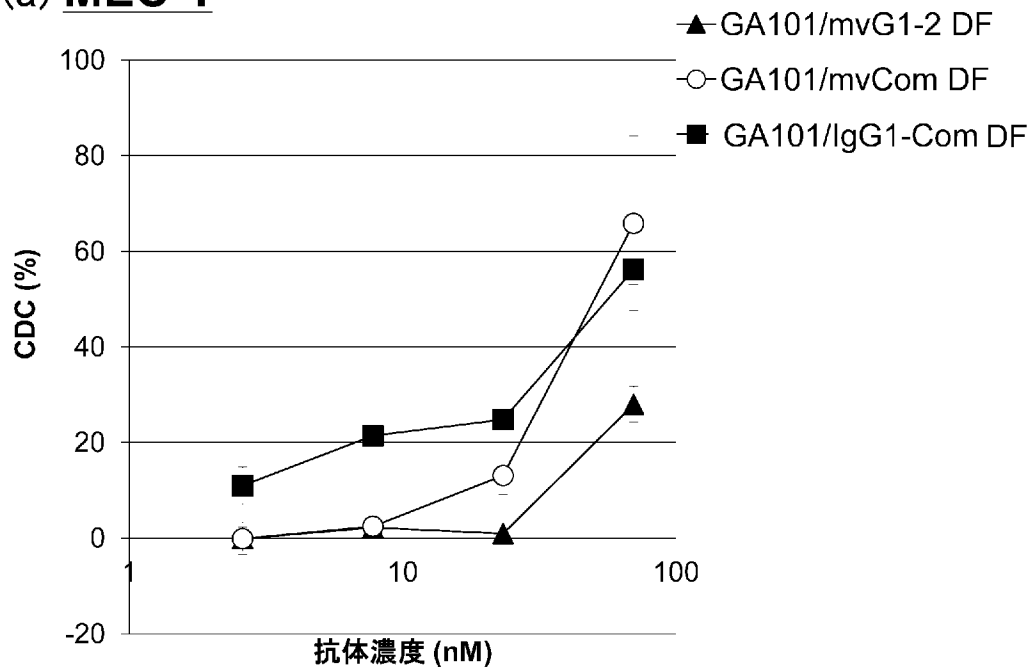

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
C kappa
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
C214S
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESDKTHTCPPCPAPEL
ヒンジ
CH2
K274Q
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
N276K
Y296F Y300F
KWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWL
A339T
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
CH3
D356E
L358M
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTP
V397M
V422I
H435R
PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNR
Y436F
FTQKSLSLSPGK
● 高CDC活性型アミノ酸残基置換
★ ヘテロダイマータンパク質のアミノ酸残基置換

[図23]

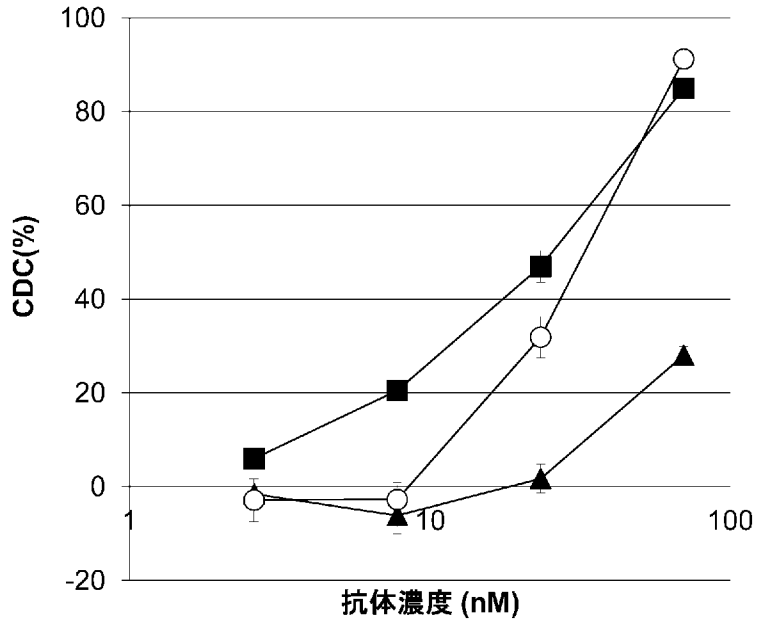

DTT -
DTT +
マーカー
GA101/mvG1-2 DF
GA101/mvCom DF
GA101/mvG1-2 DF
GA101/mvCom DF
(kD)
250 -
150 -
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -

[図24]

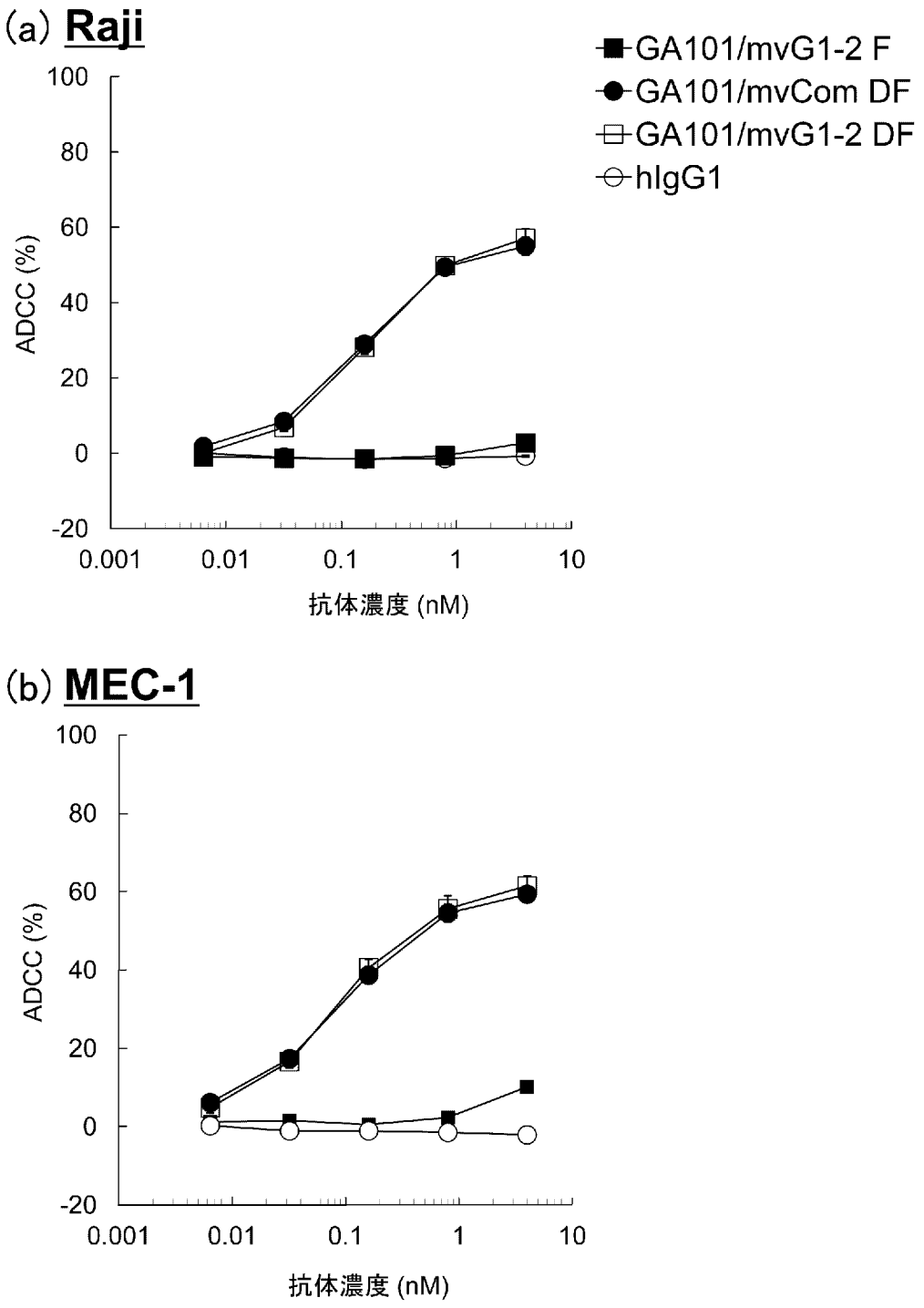
(a) MEC-1



(b) Raji



[図25]


(a) Raji
GA101/mvG1-2 F
GA101/mvCom DF
GA101/mvG1-2 DF
hIgG1
ADCC (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度 (nM)
(b) MEC-1
ADCC (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度 (nM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/077172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/46(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/00*(2006.01)i, *C12P21/02*(2006.01)i

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)
C07K16/00-16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/00-15/90, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/048037 A2 (AMGEN INC.), 26 April 2007 (26.04.2007), & JP 2009-512453 A & EP 1957533 A1 & US 2007/0105199 A1	1-25
Y	GUNASEKARAN K. et.al., Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. J. Biol. Chem., 2010, vol.285, no.25, pp.19637-19646	1-25
Y	WO 2012/116927 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG), 07 September 2012 (07.09.2012), & US 2012/0237507 A1	1-25

☒ 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	Date of mailing of the international search report
20 December, 2013 (20.12.13)	07 January, 2014 (07.01.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/077172

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/080251 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG), 02 July 2009 (02.07.2009), & JP 2011-506509 A & EP 2231709 A1 & US 2009/0232811 A1	1-25
Y	WO 2009/080253 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG), 02 July 2009 (02.07.2009), & JP 2011-505848 A & EP 2225280 A1 & US 2009/0162360 A1	1-25
Y	WO 2010/136172 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG), 02 December 2010 (02.12.2010), & JP 2012-528092 A & EP 2435473 A1 & US 2010/0322935 A1	1-25
Y	WO 2010/145793 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG), 23 December 2010 (23.12.2010), & JP 2012-530089 A & EP 2443153 A1 & US 2010/0322934 A1	1-25
Y	WO 2007/059782 A1 (GENMAB A/S), 31 May 2007 (31.05.2007), & JP 2009-517006 A & EP 1973576 A1 & US 2009/0226421 A1	1-25
Y	WO 2004/029207 A2 (XENCOR), 08 April 2004 (08.04.2004), & JP 2006-512407 A & EP 1553975 A1 & US 2004/0132101 A1	1-25

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７７１７２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/00-16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/00-15/90, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2007/048037 A2 (AMGEN INC.) 2007.04.26. & JP 2009-512453 A & EP 1957533 A1 & US 2007/0105199 A1	1-25
Y	GUNASEKARAN K. et.al., Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. J. Biol. Chem., 2010, vol.285, no.25, pp.19637-19646	1-25

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２０．１２．２０１３	国際調査報告の発送日 ０７．０１．２０１４
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９６４ 戸来　幸男 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2012/116927 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2012.09.07. & US 2012/0237507 A1	1-25
Y	WO 2009/080251 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2009.07.02. & JP 2011-506509 A & EP 2231709 A1 & US 2009/0232811 A1	1-25
Y	WO 2009/080253 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2009.07.02. & JP 2011-505848 A & EP 2225280 A1 & US 2009/0162360 A1	1-25
Y	WO 2010/136172 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2010.12.02. & JP 2012-528092 A & EP 2435473 A1 & US 2010/0322935 A1	1-25
Y	WO 2010/145793 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2010.12.23. & JP 2012-530089 A & EP 2443153 A1 & US 2010/0322934 A1	1-25
Y	WO 2007/059782 A1 (GENMAB A/S) 2007.05.31. & JP 2009-517006 A & EP 1973576 A1 & US 2009/0226421 A1	1-25
Y	WO 2004/029207 A2 (XENCOR) 2004.04.08. & JP 2006-512407 A & EP 1553975 A1 & US 2004/0132101 A1	1-25