(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-531757
(P2021-531757A)
(43)公表日　令和3年11月25日(2021.11.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13		4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	ZNA	4B065
C12N 15/10	(2006.01)	C12N	15/10	200Z	4C076
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 182 頁）　最終頁に続く

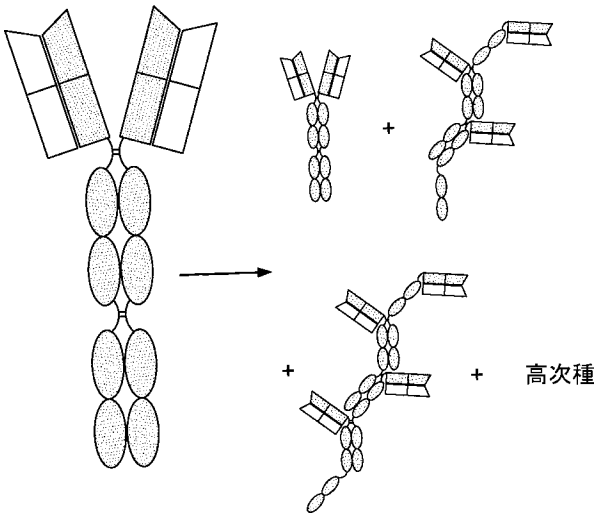
(21)出願番号　特願2021-500916 (P2021-500916)
(86)(22)出願日　令和1年7月11日 (2019.7.11)
(85)翻訳文提出日　令和3年3月9日 (2021.3.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/041492
(87)国際公開番号　WO2020/014545
(87)国際公開日　令和2年1月16日 (2020.1.16)
(31)優先権主張番号　62/696,708
(32)優先日　平成30年7月11日 (2018.7.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　508134441
モメンタ　ファーマシューティカルズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ビニー　ストリート　３０１
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100196966
弁理士　植田　渉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改変されたＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に関する組成物および方法

(57)【要約】
本開示は、改変されたＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の組成物および方法に関するものであり、当該Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、少なくとも２個のＦｃドメインと少なくとも１個の抗原結合ドメインとを含む。



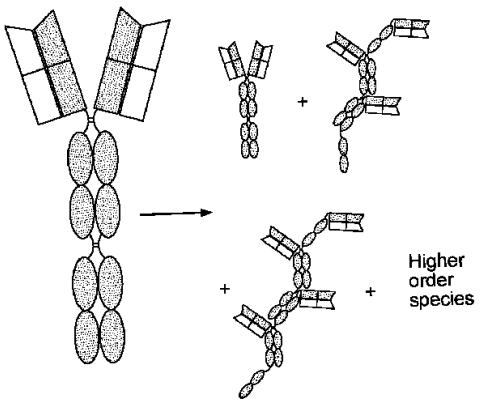


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第２のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第３のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む、ポリペプチドであって、
少なくとも１つのＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、
少なくとも１つの他のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個、２個、または３個の逆電荷変異を含む、
前記ポリペプチド。
【請求項２】
前記抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
前記抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項８】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項９】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＩｇＧ１ドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１２】

改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の突起形成変異を有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１３】

逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の逆電荷変異を有する、請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１４】

改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１５】

改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まない前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記逆電荷変異とは異なる逆電荷変異を含む、請求項１４に記載のポリペプチド。

【請求項１６】

改変された突起を形成する前記変異、および前記逆電荷変異が、前記ＣＨ３ドメインにある、請求項１～１５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１７】

前記変異が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１６に記載のポリペプチド。

【請求項１８】

前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１～１７のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１９】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２０】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、グリシンスペーサーである、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２１】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが独立して、４～３０、４～２０、８～３０、８～２０、１２～２０または１２～３０個のグリシン残基からなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２２】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、２０個のグリシン残基からなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２３】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む、請求項１～２２に記載のポリペプチド。

【請求項２４】

ＥＵのＩ２５３位の各アミノ酸変異が独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される、請求項２３に記載のポリペプチド。

【請求項２５】

Ｉ２５３位の各アミノ酸変異が、Ｉ２５３Ａである、請求項２４に記載のポリペプチド。

【請求項２６】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２７】

ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異が独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される、請求項２６に記載のポリペプチド。

【請求項２８】

Ｒ２９２位の各アミノ酸変異が、Ｒ２９２Ｐである、請求項２７に記載のポリペプチド。

【請求項２９】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、

EPKSCDKTHTCPPCPAPELL および DKTHTCPPCPAPELL

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１～２８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３０】

前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELL

を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。

【請求項３１】

前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列

EPKSCDKTHTCPPCPAPEL

を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。

【請求項３２】

前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列

EPKSCDKTHTCPPCPAPEL

を有し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELL

を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。

【請求項３３】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３４】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３５】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３６】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３７】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３８】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４０】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４１】
前記単一アミノ酸置換が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される、請求項３３～４０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４３】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインにおける逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項４２に記載のポリペプチド。

【請求項４４】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項４２に記載のポリペプチド。
【請求項４５】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４６】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１、４～１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４７】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１～４６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４８】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１～４６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４９】
前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５０】
前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５１】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５２】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５３】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５４】
前記抗原結合ドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５５】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５６】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除く前記ＶＨドメイン配列および前記ＶＬドメイン配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項４８に記載のポリペプチド。

【請求項５７】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５８】
前記抗原結合ドメインが、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む、請求項１～４６に記載のポリペプチド。
【請求項５９】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる、請求項１～４６に記載のポリペプチド。
【請求項６０】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている請求項１～５９のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第２のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合されている、
前記ポリペプチド複合体。
【請求項６１】
前記第２のポリペプチド単量体が、改変された空洞を形成する変異を含む、請求項６０に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６２】
前記改変された空洞を形成する前記変異が、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される、請求項６１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６３】
前記第２のポリペプチド単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項６１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６４】
前記少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項６３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６５】
前記ポリペプチド複合体が、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドにさらに結合され、前記ポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第３のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、前記第２および第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合している、請求項６０～６４のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６６】
前記第３のポリペプチド単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項６５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６７】
前記少なくとも２個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項６６に記載のポリペプチド複合体。

【請求項６８】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２および第３のポリペプチド単量体が、異なる逆電荷変異を含む、請求項６５に記載のポリペプチド。
【請求項６９】
前記第２のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項６０～６８のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７０】
前記第３のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項６５～６９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７１】
前記ポリペプチドが、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む、請求項６０～６９にいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７２】
前記Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体が、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む、請求項７１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７３】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７４】
前記第２のポリペプチドが、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む、請求項７３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７５】
前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７６】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７７】
単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む、請求項６０～７６のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７８】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第１のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第２のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む、ポリペプチドであって、
少なくとも１つのＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、
少なくとも１つの他のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個、２個、または３個の逆電荷変異を含む、

前記ポリペプチド。
【請求項７９】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８０】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８１】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８２】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８３】
第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８４】
第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８５】
第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８６】
第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＩｇＧ１ドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８７】
改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の突起形成変異を有する、請求項７８～８６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項８８】
逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の逆電荷変異を有する、請求項７８～８７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項８９】
改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項７８～８８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９０】
改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まない前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記逆電荷変異とは異なる逆電荷変異を含む、請求項１４に記載のポリペプチド。

【請求項９１】
改変された突起を形成する前記変異、および前記逆電荷変異が、前記ＣＨ３ドメインにある、請求項７８～９０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９２】
前記変異が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項９１に記載のポリペプチド。
【請求項９３】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項７８～９２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９４】
前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG,
GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS,
RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS,
GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項９５】
前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、グリシンスペーサーである、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項９６】
前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが独立して、４～３０、４～２０、８～３０、８～２０、１２～２０、または１２～３０個のグリシン残基からなる、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項９７】
前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、２０個のグリシン残基からなる、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項９８】
前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む、請求項７８～９７に記載のポリペプチド。
【請求項１００】
ＥＵのＩ２５３位の各アミノ酸変異が独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される、請求項９８に記載のポリペプチド。
【請求項１０１】
Ｉ２５３位の各アミノ酸変異が、Ｉ２５３Ａである、請求項１００に記載のポリペプチド。
【請求項１０２】
前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む、請求項７８～１０１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０３】
ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異が独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される、請求項１０２に記載のポリペプチド。

【請求項１０４】
Ｒ２９２位の各アミノ酸変異が、Ｒ２９２Ｐである、請求項１０３に記載のポリペプチド。
【請求項１０５】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、
EPKSCDKTHTCPPCPAPELL および DKTHTCPPCPAPELL
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項７８～１０４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０６】
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
DKTHTCPPCPAPELL
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０７】
前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
DKTHTCPPCPAPELL
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０８】
前記第１のＦｃドメイン単量体、前記第２のＦｃドメイン単量体、および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
DKTHTCPPCPAPELL
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０９】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１０】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１１】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１２】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１３】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１４】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１５】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１６】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１７】
前記単一アミノ酸置換が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される、請求項１０９～１１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１８】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１９】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインにおける逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項１１８に記載のポリペプチド。
【請求項１２０】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１１８に記載のポリペプチド。
【請求項１２１】
改変された突起を形成する前記変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項１２２】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項７８～９１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１２３】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている請求項７８～１２２のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第２

のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合されている、
前記ポリペプチド複合体。
【請求項１２４】
前記第２のポリペプチド単量体が、改変された空洞を形成する変異を含む、請求項１２３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２５】
前記改変された空洞を形成する前記変異が、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される、請求項１２４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２６】
前記第２のポリペプチド単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１２４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２７】
前記少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１２６に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２８】
前記ポリペプチド複合体が、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドにさらに結合され、前記ポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第３のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、前記第２および第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合する、請求項１２３～１２７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２９】
前記第３のポリペプチド単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１２８に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３０】
前記少なくとも２個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１２９に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３１】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２および第３のポリペプチド単量体が、異なる逆電荷変異を含む、請求項１２８に記載のポリペプチド。
【請求項１３２】
前記第２のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１２３～１３１のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３３】
前記第３のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１２８～１３２のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１３４】
前記ポリペプチドが、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む、請求項１２３～１３２にいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３５】
前記Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体が、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む、請求項１３４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３６】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３７】
前記第２のポリペプチドが、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む、請求項１３６に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３８】
前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３９】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４０】
前記第２のポリペプチドが、抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２８～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４１】
前記第３のポリペプチドが、抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２８～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４２】
前記抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４３】
前記抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４４】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４５】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４６】
前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４７】
前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４８】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４９】

前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５０】

前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５１】

前記抗原結合ドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５２】

前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５３】

前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除く前記ＶＨドメイン配列および前記ＶＬドメイン配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５４】

前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５５】

前記抗原結合ドメインが、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５６】

前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５７】

前記第２のポリペプチドが、第１の抗原結合ドメインをさらに含み、前記第３のポリペプチドが、第２の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２３～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５８】

単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む、請求項１２３～１５７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項１５９】

請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項１６０】

請求項１５９に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項１６１】

請求項１５９に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項１６２】

請求項１６０に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１６３】
請求項１６１または請求項１６２に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現する条件下で培養する工程を含む、請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドを生成する方法。
【請求項１６４】
抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６５】
抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１６６】
抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６７】
抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１６８】
１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６９】
１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１７０】
前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、前記ＣＨ３ドメイン中に１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下の単一アミノ酸変異を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１６８または１６９に記載の宿主細胞。
【請求項１７１】
請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項１７２】
前記ポリペプチドの４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、２％未満が、Ｆｃドメイン単量体上の少なくとも１個のフコース修飾を有する、請求項１７１に記載の薬学的組成物。
【請求項１７３】
（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに
（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第１のポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、

前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、
前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７４】
前記リンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１７３に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７５】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１７３に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７６】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１７５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７７】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７８】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７９】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項１７８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１８０】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１７９に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１８１】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１８２】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１８３】

前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項１７５～１８２のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８４】

前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項１７５～１８３のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８５】

前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１７５～１８４のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８６】

前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８７】

前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８８】

前記抗原結合ドメインが、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８９】

前記抗原結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９０】

V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９１】

前記V_Hドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９２】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９３】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記V_H配列が、表２に記載される抗体の前記V_H配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９４】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列を含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９５】

（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、

（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、

（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、

（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに

（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー

を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第１のポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、
前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９６】
前記リンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGGおよびGGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１９５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９７】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１９５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９８】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１９７に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９９】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２００】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０１】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項２００に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０２】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項２０１に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０３】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６

Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０４】

少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０５】

前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項１９５～２０４のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０６】

前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項１９５～２０５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０７】

前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１９５～２０６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０８】

前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２０９】

前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１０】

前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１１】

前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１２】

ＶＬドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１３】

前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１４】

前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１５】

前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２１６】

前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項２１０に記載の

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１７】
（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに
（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、
前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１８】
前記リンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項２１７に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１９】
前記第１のＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２および第３のＦｃドメイン単量体が各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項２１７に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２０】
前記第１のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項２１９に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２１】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２２】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２３】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインの逆電荷変異である

か、または改変された突起を形成する変異である、請求項２２２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２４】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項２２３に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２５】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２６】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２７】
前記第１のＦｃドメイン単量体が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第２および第３のＦｃドメイン単量体が各々、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項２１９～２２６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２８】
前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項２１９～２２７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２２９】
前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項２１９～２２８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３０】
前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３１】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３２】
前記抗原結合ドメインが、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３３】
前記抗原結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３４】
V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３５】
前記V_Hドメインが、表１ＡおよびＢに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３６】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３７】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記V_H配列が、表２に記載される抗体の前記V_H配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３８】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列を含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３９】
以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；
前記抗原結合ドメインが、前記第１のポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４０】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２３９に記載の方法。
【請求項２４１】
以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；

前記抗原結合ドメインが、前記第１のポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４２】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２４１に記載の方法。
【請求項２４３】
以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；
前記抗原結合ドメインが、前記第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４４】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２４３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
開示の背景
多くの治療用抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）、および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ：ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）など、Ｆｃドメインのエフェクター機能を介して自然免疫系の因子をリクルートすることにより機能する。治療用タンパク質の改善に対するニーズは未だ存在する。
【発明の概要】
【０００２】
開示の概要
本開示は、抗原結合ドメインの標的特異性と、少なくとも２個のＦｃドメインを組み合わせて、固有の生物活性を有する新たな治療法を生み出すための組成物および方法を特徴とする。本明細書に記載される組成物および方法は、複数のポリペプチド鎖からの複数の抗原結合ドメインおよび複数のＦｃドメインを有するタンパク質の構築体を可能にする。抗原結合ドメインの数および間隔は、標的抗原に対するタンパク質複合体の結合特性（例えば、結合力）を変えるように調整され得、Ｆｃドメインの数は、抗原結合細胞を死滅さ

せるエフェクター機能の大きさを制御するように調整され得る。変異（すなわち、本明細書に記載されるヘテロ二量体形成および／またはホモ二量体形成変異）がポリペプチドに導入されて、産生された望ましくない、あるいは組み立てられたタンパク質の数を低減する。いくつかの例では、ヘテロ二量体形成および／またはホモ二量体形成変異がＦｃドメイン単量体に導入され、特異的に変異したＦｃドメイン単量体は、タンパク質に組み立てられる異なるポリペプチド鎖の間に配置されて、所望のタンパク質構造へのポリペプチド鎖の組み立てを制御する。これらの変異は、ある特定のＦｃドメイン単量体の所望の対形成を選択的に安定化し、他のＦｃドメイン単量体の望ましくない対形成を選択的に不安定化する。場合によっては、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、Ｆｃ単量体のうちの少なくとも２個が異なるヘテロ二量体形成変異を含有する（したがって、配列が互いに異なる）、複数のＦｃドメイン単量体を含有する第１のポリペプチド、例えば、異なるヘテロ二量体形成変異を伴う２つ以上のＦｃ単量体を有するより長いポリペプチド、ならびに追加のポリペプチドのＦｃ単量体が互いに異なるヘテロ二量体形成変異（およびしたがって、異なる配列）を含有する、各々が少なくとも１個のＦｃ単量体を含有する少なくとも２個の追加のポリペプチド、例えば、各々が異なるヘテロ二量体形成変異を伴う単一Ｆｃドメイン単量体を含有する、２個のより短いポリペプチドによって形成された「直交性」Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体である。追加のポリペプチドのヘテロ二量体形成変異は、第１のポリペプチドの少なくともＦｃ単量体のヘテロ二量体形成変異に適合する。

【０００３】

いくつかの例では、本開示は、Ｆｃドメイン、例えば、既知の治療用抗体を含む治療用タンパク質の抗原結合ドメインを、少なくとも２個のＦｃドメインと組み合わせて、新規の治療用構築体を生成することを企図する。そのような構築体を作製するために、本開示は、少なくとも２個、例えば複数のＦｃドメインを有する構築体の組み立てるための様々な方法を提供するものであり、それにより、それらのホモ二量体形成およびヘテロ二量体形成が制御され、限られた数のポリペプチド鎖からの異なるサイズの分子の組み立てが行われ、そしてそれらポリペプチドもまた本開示の対象である。これらの構築体の特性により、実質的に均質な薬学的組成物の効率的な生成が可能となる。薬学的組成物の安全性、有効性、均一性、および信頼性を確実にするためには、薬学的組成物においてそのような均質性があることが望ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される少なくとも２個のＦｃドメインを有する新規の治療用構築物は、単一Ｆｃドメインを有する治療用タンパク質よりも大きい生物活性を有する。

【０００４】

第１の態様では、本開示は、少なくとも１個の抗原結合ドメインと、リンカーにより第２のＦｃドメインに結合された第１のＦｃドメインとを含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を特徴とする。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合構築体は、増強されたエフェクター機能を含み、当該Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、少なくとも１個の抗原結合ドメインと、リンカーにより第２のＦｃドメインに結合された第１のＦｃドメインとを含み、当該Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、１つのＦｃドメインと抗原結合ドメインを有する構築体と比較して、エフェクター機能が増強されている。

【０００５】

一態様では、本開示は、抗原結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第２のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第３のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドに関し、少なくとも１個のＦｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、少なくとも１個の他のＦｃドメイン単量体は、少なくとも１、２または３個の逆電荷変異を含む。

【０００６】
いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方は、改変された突起を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【０００７】
いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含む。

【０００８】
いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【０００９】
いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方は各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００１０】
いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方はそれぞれ、改変された突起を形成する変異を含み、第３のＩｇＧ１ドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００１１】
いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体はそれぞれ、同一の突起形成変異を有する。いくつかの実施形態では、逆電荷変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は各々、同一の逆電荷変異を有する。

【００１２】
いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも１、２、または３個の逆電荷変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まないポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の逆電荷変異（複数可）とは異なる逆電荷変異を含む。

【００１３】
いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異および逆電荷変異は、ＣＨ３ドメイン内にある。いくつかの実施形態では、変異は、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。いくつかの実施形態では、変異は、単一アミノ酸変化である。

【００１４】
いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG,
GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG,
SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH,
GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR,
GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS,
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG,
GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、グリシンスペーサーである。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは独立して、４～３０、４～２０、８～３０、８～２０、１２～２０、または１２～３０個のグリシン残基からなる。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、２０個のグリシン残基からなる。

【００１５】

いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個は、ＥＵのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む。いくつかの実施形態では、ＥＵのＩ２５３位の各アミノ酸変異は独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｉ２５３位の各アミノ酸変異は、Ｉ２５３Ａである。

【００１６】

いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個は、ＥＵのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む。いくつかの実施形態では、ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異は独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｒ２９２位の各アミノ酸変異は、Ｒ２９２Ｐである。

【００１７】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のヒンジは独立して、
EPKSCDKTHTCPPCPAPELL および DKTHTCPPCPAPELL
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
DKTHTCPPCPAPELL
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
EPKSCDKTHTCPPCPAPEL
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
EPKSCDKTHTCPPCPAPEL
を有し、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
DKTHTCPPCPAPELL
を有する。

【００１８】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。

【００２０】

いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体の各々は独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換のうちの最大で６個は、ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、ＥｕのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４

９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００２１】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＬドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、ＶＨ配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除き、表２に記載される抗体のＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、ＶＨドメイン配列およびＶＬドメイン配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除き、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ならびにＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる。

【００２２】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている前述のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド複合体に関し、ポリペプチドおよび第２のポリペプチドは、ポリペプチドの第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体のヒンジドメイン、ならびに第２のポリペプチドのヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合されている。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、改変された空洞を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、改変された空洞を形成する変異は、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、以下から選択される。Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド複合体は、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドに

さらに結合され、ポリペプチドおよび第３のポリペプチドは、ポリペプチドの第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体のヒンジドメイン内および第３のポリペプチドのヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、第２および第３のポリペプチドは、ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合している。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチド単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも２個の逆電荷変異は、以下から選択される。Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００２４】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、第２および第３のポリペプチド単量体は、異なる逆電荷変異を含む。

【００２５】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチドは、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む。いくつかの実施形態では、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体は、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド複合体は、単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む。

【００２８】

別の態様では、本開示は、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第１のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第２のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドに関し、少なくとも１個のＦｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、少なくとも１個の他のＦｃドメイン単量体は、少なくとも１、２、または３個の逆電荷変異を含む。

【００２９】

いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷

変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方は、改変された突起を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００３０】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含む。

【００３１】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００３２】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方はそれぞれ、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００３３】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方はそれぞれ、改変された突起を形成する変異を含み、第３のＩｇＧ１ドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体はそれぞれ、同一の突起形成変異を有する。いくつかの実施形態では、逆電荷変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は各々、同一の逆電荷変異を有する。いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、少なくとも１、２、または３個の逆電荷変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含むポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まないポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の逆電荷変異（複数可）とは異なる逆電荷変異を含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異および逆電荷変異は、ＣＨ３ドメイン内にある。いくつかの実施形態では、変異は、ＥｕのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。いくつかの実施形態では、変異は、単一アミノ酸変化である。

【００３６】

いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS, GGSGGSGGSGGS, GGSG,
GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG,
SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH,
GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR,
GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGGSGGGSGGGS,
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG,
GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーは、グリシンスペーサーである。いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーが独立して、４～３０、４～２０、８～３０、８～２０、１２～２０、または１２～３０個のグリシン残基からなる。いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーは、２０個のグリシン残基からなる。

【００３７】

いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個は、ＥｕのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む。いくつかの実施形態では、ＥｕのＩ２５３位の各アミノ酸変異は独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｉ２５３位の各アミノ酸変異は、Ｉ２５３Ａである。

【００３８】

いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個は、ＥｕのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む。いくつかの実施形態では、ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異は独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｒ２９２位の各アミノ酸変異は、Ｒ２９２Ｐである。

【００３９】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のヒンジは独立して、

EPKSCDKTHTCPPCPAPELL および DKTHTCPPCPAPELL

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELL

を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELL

を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体、第２のＦｃドメイン単量体、および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列

DKTHTCPPCPAPELL

を有する。

【００４０】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
のアミノ酸配列を含む。

【００４１】

いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
のアミノ酸配列を含む。

【００４２】

いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体の各々は独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換のうちの最大で６個は、ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、ＥｕのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００４３】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている前述のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド複合体に関し、ポリペプチドおよび第２のポリペプチドは、ポリペプチドの第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体のヒンジドメイン内および第２のポリペプチドのヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合されている。

【００４４】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、改変された空洞を形成する変異を含む。いくつかの実施形態では、改変された空洞を形成する変異は、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、以下から選択される。Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド複合体は、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドにさらに結合され、ポリペプチドおよび第３のポリペプチドは、ポリペプチドの第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体のヒンジドメイン内および第３のポリペプチドのヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、第２および第３のポリペプチドは、ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合している。

【００４６】

いくつかの実施形態では、第３のポリペプチド単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも２個の逆電荷変異は、以下から選択される。Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００４７】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、第２および第３のポリペプチド単量体は、異なる逆電荷変異を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチドは、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。

【００４９】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む。いくつかの実施形態では、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体は、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチド単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、第３のポリペプチド単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。

【００５０】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、抗原結合ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、第３のポリペプチドは、抗原結合ドメインをさらに含む。いくつ

かの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＬドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、ＶＨ配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除き、表２に記載される抗体のＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、ＶＨドメイン配列およびＶＬドメイン配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除き、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ならびにＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、第１の抗原結合ドメインをさらに含み、第３のポリペプチドは、第２の抗原結合ドメインをさらに含む。

【００５１】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド複合体は、単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む。

【００５２】

別の態様では、本開示は、前述のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸分子に関する。

【００５３】

別の態様では、本開示は、核酸分子を含む発現ベクターに関する。

【００５４】

別の態様では、本開示は、核酸分子を含む宿主細胞に関する。

【００５５】

別の態様では、本開示は、発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

【００５６】

別の態様では、本開示は、ポリペプチドを発現する条件下で、前述の実施形態のために宿主細胞を培養する工程を含む、前述のポリペプチドのうちのいずれかを生成する方法に関する。

【００５７】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコード

する核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、ＣＨ３ドメイン中に１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下の単一アミノ酸変異を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。

【００５８】

別の態様では、本開示は、前述のポリペプチドのうちのいずれかを含む薬学的組成物に関する。

【００５９】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物のポリペプチドの４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、２％未満は、Ｆｃドメイン単量体上の少なくとも１個のフコース修飾を有する。

【００６０】

別の態様では、本開示は、ａ）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびにｉｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、ｄ）第１のポリペプチドおよび第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと、を含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に関し、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する。

【００６１】

いくつかの実施形態では、リンカーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS,
GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS,
GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG,
GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,
RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS,
GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００６２】

いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第３のＦｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体は、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、変異は、単一アミノ酸変化である。いくつかの実施形態では

、Ｆｃドメイン単量体の各々は独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換のうちの最大で６個は、ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、ＥｕのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。

【００６４】

いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。

【００６５】

いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体はそれぞれ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、第３のＦｃドメイン単量体は、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、第４のＦｃドメイン単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、第５のＦｃドメイン単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。

【００６６】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、Ｆａｂである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、V_Lドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、V_H配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除き、表２に記載される抗体のV_H配列に対して少なくとも９５％同一である。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体のV_H配列を含む。

【００６７】

別の態様では、本開示は、ａ）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびにｉｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、ｄ）第１のポリペプチドおよび第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと、を含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に関し、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する。

【００６８】

いくつかの実施形態では、リンカーは、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS,
GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS,
GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG,
GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,
RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS,
GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００６９】

いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体はそれぞれ、改変された突起を形成する変異を含み、第３のＦｃドメイン単量体は、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体は、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む。

【００７０】

いくつかの実施形態では、変異は、単一アミノ酸変化である。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体の各々は独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換のうちの最大で６個は、ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。

【００７１】

いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、Ｄ３５６Ｋ、およびＤ３５６Ｋから選択される。いくつかの実施形態では、第１および第２のＦｃドメイン単量体はそれぞれ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、第３のＦｃドメイン単量体は、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、第４のＦｃドメイン単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、第５のＦｃドメイン単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。

【００７２】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、Ｆａｂである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ＶＬドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、ＶＬドメインを含む第４のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、ＶＨ配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除き、表２に記載される抗体のＶＨ配列に対して少なくとも９５％同一である。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む。

【００７３】

別の態様では、本開示は、ａ）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｖ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびにｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、ｄ）第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと、を含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に関し、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する。

【００７４】

いくつかの実施形態では、リンカーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS,
GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGSGGS, GGSGGSGGS,
GGSGGSGGSGGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG,
GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,
RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS,
GGGSGGGSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００７５】

いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体は、改変された突起を形成する変異を含み、第２および第３のＦｃドメイン単量体は各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体は、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む。

【００７６】

いくつかの実施形態では、変異は、単一アミノ酸変化である。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体の各々は独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換のうちの最大で６個は、ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である。いくつかの実施形態では、単一アミノ酸置換は、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある。

【００７７】

いくつかの実施形態では、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１個の逆電荷変異は、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体は、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、第２および第３のＦｃドメイン単量体は各々、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む。いくつかの実施形態では、第４のＦｃドメイン単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、第５のＦｃドメイン単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、Ｆａｂである。いくつかの実施形態で

は、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、V_Lドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、V_H配列は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除き、表２に記載される抗体のV_H配列に対して少なくとも９５％同一である。いくつかの実施形態では、V_Hドメインは、表２に記載される抗体のV_H配列を含む。

【００７９】

別の態様では、本開示は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法に関し、方法は、ａ）（１）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｖ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、（４）抗原結合ドメインと、を発現する宿主細胞を培養する工程であって、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し、抗原結合ドメインは、第１のポリペプチドおよび第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程、ならびに、ｂ）細胞培養上清からＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程を含む。

【００８０】

いくつかの実施形態では、細胞培養上清中のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％は、構造的に同一である。

【００８１】

別の態様では、本開示は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法に関し、方法は、ａ）（１）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｖ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、（４）抗原結合ドメインと、を発現する宿主細胞を培養する工程であって、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し、抗原結合ドメインは、第１のポリペプチドおよび第２のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程、ならびに、ｂ）細胞培養上清からＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程を含む。

【００８２】

いくつかの実施形態では、細胞培養上清中のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％は、構造的に同一である。

【００８３】

別の態様では、本開示は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法に関し、方法

は、ａ）（１）ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、ｉｖ）第１のＦｃドメイン単量体および第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ｖ）第２のＦｃドメイン単量体を第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカーを含む、第１のポリペプチドと、（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、（４）抗原結合ドメインと、を発現する宿主細胞を培養する工程であって、第１のＦｃドメイン単量体および第４のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、第２のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、第３のＦｃドメイン単量体および第５のＦｃドメイン単量体は組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し、抗原結合ドメインは、第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程、ならびに、ｂ）細胞培養上清からＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程を含む。

【００８４】

いくつかの実施形態では、細胞培養上清中のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％は、構造的に同一である。

【００８５】

本開示のすべての態様では、Ｆｃドメイン単量体の一部または全部（例えば、１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下の単一アミノ酸置換（例えば、ＣＨ３ドメイン内のみ）を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むＦｃドメイン単量体）は、他のアミノ酸置換または改変に加えて、Ｅ３４５ＫおよびＥ４３Ｇアミノ酸置換のうちの一方または両方を含むことができる。Ｅ３４５ＫおよびＥ４３Ｇアミノ酸置換は、Ｆｃドメイン多量体形成を増加させることができる。

【００８６】

定義：

本明細書に使用される場合、「Ｆｃドメイン単量体」という用語は、少なくともヒンジドメイン、ならびに第２および第３の抗体定常ドメイン（C_H2およびC_H3）、またはそれらの機能性断片（例えば、少なくともヒンジドメインまたはその機能性断片、ＣＨ２ドメインまたはその機能性断片、およびＣＨ３ドメインまたはその機能性断片）（例えば、（ｉ）別のＦｃドメイン単量体と二量体形成してＦｃドメインを形成し、そして（ｉｉ）Ｆｃ受容体に結合することができる断片）を含むポリペプチド鎖を指す。好ましいＦｃドメイン単量体は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、ＩｇＧ１ヒンジ、ＩｇＧ１　ＣＨ２ドメインおよびＩｇＧ１　ＣＨ３ドメインの少なくとも一部分を含む。したがって、Ｆｃドメイン単量体、例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体は、Ｅ３１６～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｐ３１７～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３１８～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３１８～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｓ３１９～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｃ３２０～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｄ３２１～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３２２～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｔ３２３～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３２３～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｈ３２４～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｔ３２５～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、またはＣ３２６～Ｇ４４６もしくはＫ４４７にわたることができる。Ｆｃドメイン単量体は、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはＩｇＤを含む、任意の免疫グロブリン抗体アイソタイプとすることが可能である（例えば、ＩｇＧ）。さらに、Ｆｃドメイン単量体は、ＩｇＧサブタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）であり得る（例えば、ヒトＩｇＧ１）。ヒトＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、本明細書に記載される実施例において使用される。ヒトＩｇＧ１の完全ヒンジドメインは、ＥＵナンバリングＥ３１６～Ｐ２３０またはＬ２３５にわたり、ＣＨ２ドメインは、Ａ２３１またはＧ２３６～Ｋ３４０にわたり、ＣＨ３ドメインは、Ｇ３４１～Ｋ４４７にわたる。ヒンジドメインの最後のアミノ酸の位置については異なる見解がある。それは、Ｐ２３０またはＬ２３５のいずれかである。本明細書の多くの実施例では、ＣＨ３ドメインはＫ３４７を含まない。ゆえにＣＨ３ドメインは、Ｇ３４１～Ｇ４４６で

あってもよい。本明細書の多くの実施例では、ヒンジドメインは、Ｅ２１６～Ｌ２３５を含み得る。これは、例えば、ヒンジがＣＨ１ドメインまたはＣＤ３８結合ドメインに対してカルボキシ末端であるときに当てはまる。例えばヒンジがポリペプチドのアミノ末端であるときなどのいくつかの例では、ＥＵナンバリング２２１のＡｓｐは、Ｇｌｎに変異される。Ｆｃドメイン単量体は、抗原認識領域、例えば可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）として機能することが可能である、免疫グロブリンの部分を何も含まない。Ｆｃドメイン単量体は、野生型（例えば、ヒト）Ｆｃドメイン単量体配列からの変更を１０程度（例えば、１～１０、１～８、１～６、１～４のアミノ酸置換、付加、または欠失）含有することが可能であり、該変更は、ＦｃドメインとＦｃ受容体との間の相互作用を変える。Ｆｃドメイン単量体は、野生型Ｆｃドメイン単量体配列（例えば、１～１０、１～８、１～６、１～４のアミノ酸置換、付加または欠失）からの変更（例えば、単一アミノ酸置換）を１０程度含有することが可能であり、当該変更は、Ｆｃドメイン単量体間の相互作用を変える。特定の実施形態では、以下のヒトＩｇＧ１　ＣＨ３ドメイン配列と比較して、ＣＨ３ドメイン上に、最大で１０、８、６または５個の単一アミノ酸置換が存在する：
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
。好適な変更の例は、この技術分野で公知である。

【００８７】

本明細書で使用される場合、「Ｆｃドメイン」という用語は、Ｆｃ受容体を結合することが可能である２つのＦｃドメイン単量体による二量体を指す。野生型Ｆｃドメインでは、２つのＦｃドメイン単量体が２つのＣ$_H$３抗体定常ドメイン間の相互作用、ならびに二量体形成している２つのＦｃドメイン単量体のヒンジドメイン間に形成される１つ以上のジスルフィド結合によって二量体形成する。

【００８８】

本開示において、「Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体」という用語は、本明細書に記載のＦｃドメインを少なくとも２個形成し、少なくとも１個の「抗原結合ドメイン」を含む会合したポリペプチド鎖を指す。本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、同一または異なる配列を有するＦｃドメイン単量体を含むことが可能である。例えば、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、３つのＦｃドメインを有することが可能であり、そのうちの２つがＩｇＧ１またはＩｇＧ１に由来するＦｃドメイン単量体を含み、３つ目がＩｇＧ２またはＩｇＧ２に由来するＦｃドメイン単量体を含む。別の非限定的な例において、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、３個のＦｃドメインを有することができ、そのうちの２個は、「空洞に突起が挿入された対」（「ノブイントゥホール対」としても既知）を含み、そのうちの第３のＦｃドメインは、「空洞に突起が挿入された対」を含まず、例えば、第３のＦｃドメインは、空洞に突起が挿入された対ではなく１つ以上の静電的ステアリング変異を含むか、または第３のＦｃドメインは、野生型配列を含む（すなわち、変異を含まない）。Ｆｃドメインは、例えばＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩｂ、またはＦｃγＲＩＶであるＦｃ受容体と結合する最小限の構造を形成する。場合によっては、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、Ｆｃ単量体のうちの少なくとも２個が異なるヘテロ二量体形成変異を含有する（すなわち、Ｆｃ単量体の各々が、異なる突起形成変異を有するか、または各々が、異なる静電的ステアリング変異を有するか、または１個の単量体が、突起形成変異を有し、１個の単量体が、静電的ステアリング変異を有する）、複数のＦｃドメイン単量体を含有する第１のポリペプチドを、追加のポリペプチドのＦｃ単量体が、互いとは異なるヘテロ二量体形成変異を含有する（すなわち、追加のポリペプチドのＦｃ単量体が、異なる突起形成変異を有するか、または異なる静電的ステアリング変異を有するか、または１個の単量体が、突起形成変異を有し、１個の単量体が、静電的ステアリング変異を有する）、各々が少なくとも１個のＦｃ単量体を含有する少なくとも２個の追加のポリペプチドに結合させることにより形成される、「直交性」Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体である。追加のポリペプチドのヘテロ二量体化変異は、第１のポリペプチドの少なくともＦｃ単量体のヘテロ二量体化変異に適合

して関連する。

【００８９】

本明細書で使用される場合、「抗原結合ドメイン」という用語は、標的分子に特異的に結合することができるペプチド、ポリペプチド、または会合したポリペプチドのセットを指す。いくつかの実施形態では、「抗原結合ドメイン」は、抗体により結合される抗体に、特異性をもって結合する抗体の最小配列である。当技術分野で公知の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ：Ｓｕｒｆａｃｅ ｐｌａｓｍｏｎ ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）または様々な免疫アッセイ（例えば、ウエスタンブロットまたはＥＬＩＳＡ）を使用して、抗原に対する抗体の特異性を評価することができる。いくつかの実施形態では、「抗原結合ドメイン」は、抗体の可変ドメインまたは相補性決定領域（ＣＤＲ）、例えば、表１に記載される抗体の１つ以上のＣＤＲ、表２に記載される抗体の１つ以上のＣＤＲ、または表２に記載される抗体のＶＨドメインおよび／もしくはＶＬドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３８結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを、任意にＶＬドメインとともに含み得る。他の実施形態では、抗原（例えば、ＣＤ３８）結合ドメインは、抗体のＦａｂ断片またはｓｃＦｖである。したがって、ＣＤ３８結合ドメインは、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含むか、またはそれからなる「ＣＤ３８重鎖結合ドメイン」と、ＶＬドメインおよびC_Lドメインを含むか、またはそれからなる「ＣＤ３８軽鎖結合ドメイン」とを含み得る。ＣＤ３８結合ドメインは、フィブロネクチン系の結合タンパク質（例えば、フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン（ＦＮ３）モノボディ）などの標的に特異的に結合する合成的に改変されたペプチドであってもよい。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」（ＣＤＲ）という用語は、抗体の可変ドメインのアミノ酸残基を指し、その存在は抗原結合に必須である。各可変ドメインは通常、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３、ならびにＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３として識別される３つのＣＤＲ領域を有する。各相補性決定領域は、Ｋａｂａｔにより規定される場合の「相補性決定領域」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中のおよそ２４－３４残基（ＣＤＲ－Ｌ１）、５０－５６残基（ＣＤＲ－Ｌ２）、および８９－９７残基（ＣＤＲ－Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の３１－３５残基（ＣＤＲ－Ｈ１）、５０－６５残基（ＣＤＲ－Ｈ２）、および９５－１０２残基（ＣＤＲ－Ｈ３）；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．, Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ, ５ｔｈ Ｅｄ. Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ, Ｂｅｔｈｅｓｄａ, Ｍｄ.（１９９１））、および／または「超可変ループ（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｌｏｏｐ）」からのそれら残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中のおよそ２６－３２残基（ＣＤＲ－Ｌ１）、５０－５２残基（ＣＤＲ－Ｌ２）、および９１－９６残基（ＣＤＲ－Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の２６－３２残基（ＣＤＲ－Ｈ１）、５３－５５残基（ＣＤＲ－Ｈ２）、および９６－１０１残基（ＣＤＲ－Ｈ３）；Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））を含んでもよい。いくつかの例では、相補性決定領域は、Ｋａｂａｔに従い規定されるＣＤＲ領域と、超可変ループの両方からのアミノ酸を含み得る。

【００９１】

「フレームワーク領域（Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ ｒｅｇｉｏｎｓ）」（以下、ＦＲ）は、ＣＤＲ残基以外のそれら可変ドメイン残基である。各可変ドメインは通常、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４として識別される４つのＦＲを有する。ＣＤＲがＫａｂａｔに従い規定される場合、軽鎖ＦＲ残基はおよそ１－２３残基（ＬＣＦＲ１）、３５－４９残基（ＬＣＦＲ２）、５７－８８残基（ＬＣＦＲ３）、および９８－１０７残基（ＬＣＦＲ４）に位置付けられ、重鎖ＦＲ残基は重鎖残基中、およそ１－３０残基（ＨＣＦＲ１）、３６－４９残基（ＨＣＦＲ２）、６６－９４残基（ＨＣＦＲ３）、および１０３－１１３残基（ＨＣＦＲ４）に位置付けられる。ＣＤＲが超可変ループ由来のアミノ酸残基を含む

場合、軽鎖ＦＲ残基は、軽鎖中、およそ１－２５残基（ＬＣＦＲ１）、３３－４９残基（ＬＣＦＲ２）、５３－９０残基（ＬＣＦＲ３）、および９７－１０７残基（ＬＣＦＲ４）に位置付けられ、重鎖ＦＲ残基は、重鎖残基中、およそ１－２５残基（ＨＣＦＲ１）、３３－５２残基（ＨＣＦＲ２）、５６－９５残基（ＨＣＦＲ３）、および１０２－１１３残基（ＨＣＦＲ４）に位置付けられる。いくつかの例では、ＣＤＲが、Ｋａｂａｔに規定されるＣＤＲと、超可変ループの両方からのアミノ酸を含む場合、ＦＲ残基は、適切に調整されるであろう。

【００９２】

「Ｆｖ」断片は、完全な抗原認識および結合の部位を含有する抗体断片である。この領域は、緊密に会合した１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなり、例えばｓｃＦｖにおいては共有結合性であり得る。この構造において、各可変ドメインの３個のＣＤＲが相互作用して、V_H－V_L二量体表面上の抗原結合部位を規定する。

【００９３】

「Ｆａｂ」断片は、軽鎖の可変ドメインと定常ドメイン、および重鎖の可変ドメインと第１の定常ドメイン（C_H1）を含む。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は、一般的にヒンジシステインによりそのカルボキシ末端近傍で共有結合されるＦａｂ断片の対を含む。

【００９４】

「一本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」抗体断片は、単一ポリペプチド鎖中に抗体のV_HドメインとV_Lドメインを含む。一般的に、ｓｃＦｖは、V_HドメインとV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それによりｓｃＦｖは所望の抗原結合のための構造を形成することができるようになる。

【００９５】

本明細書で使用される場合、「抗体定常ドメイン」という用語は、抗体の定常領域ドメイン（例えば、C_L抗体定常ドメイン、C_H1抗体定常ドメイン、C_H2抗体定常ドメイン、またはC_H3抗体定常ドメイン）に相当するポリペプチドを指す。

【００９６】

本明細書で使用される場合、「促進する」という用語は、例えば他の別個のＦｃドメイン単量体に対するよりも、互いに高い結合親和性を有する２つのＦｃドメイン単量体でＦｃドメインを形成することを支持するといったように、促すことおよび支持することを意味する。本明細書に記載されるように、結合してＦｃドメインを形成する２つのＦｃドメイン単量体は、それらの各C_H3抗体定常ドメインの界面において適合可能なアミノ酸改変（例えば、改変された突起および改変された空洞、ならびに／または静電的ステアリング変異）を有することが可能である。適合可能なアミノ酸改変は、こうしたアミノ酸改変を有さない、または適合しないアミノ酸改変をもつ他のＦｃドメイン単量体よりも、こうしたＦｃドメイン単量体同士での選択的な相互作用を促進するまたは支持する。これは、相互作用する２つのC_H3抗体定常ドメインの界面におけるアミノ酸改変に起因して、Ｆｃドメイン単量体が、アミノ酸改変を有さない他のＦｃドメイン単量体に対するよりも互いに対して高い親和性を有することを理由に起こる。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「二量体形成選択モジュール」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体間の好都合な対形成を促進するＦｃドメイン単量体の配列を指す。「相補的」な二量体形成選択モジュールは、２つのＦｃドメイン単量体の互いに対する選択的な相互作用を促進するまたは支持する二量体形成選択モジュールである。相補的な二量体形成選択モジュールは、同一の配列または異なる配列を有することが可能である。例示的な相補的な二量体形成選択モジュールが本明細書に記載されており、表３の改変された突起形成および空洞形成変異、ならびに表４の静電的ステアリング変異から選択される相補的な変異を含むことができる。

【００９８】

本明細書で使用される場合、「改変された空洞（ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｃａｖｉｔｙ）」という用語は、C_H3抗体定常ドメイン内の本来のアミノ酸残基のうちの少なくとも

１つが、本来のアミノ酸残基よりも低分子量の側鎖を有する異なるアミノ酸残基で置換されることによって、C_H3抗体定常ドメイン内に形成された三次元の空洞を指す。「本来のアミノ酸残基」という用語は、野生型のC_H3抗体定常ドメインの遺伝コードによってコードされた天然のアミノ酸残基を指す。改変された空洞は、例えば、表３の空洞形成置換変異のうちのいずれか１つ以上によって形成され得る。

【００９９】

本明細書で使用される場合、「改変された突起（ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｐｒｏｔｕｂｅｒａｎｃｅ）」という用語は、C_H3抗体定常ドメイン内の本来のアミノ酸残基のうちの少なくとも１つが、本来のアミノ酸残基よりも高分子量の側鎖を有する異なるアミノ酸残基で置換されることによって、C_H3抗体定常ドメイン内に形成された三次元の突起を指す。「本来のアミノ酸残基」という用語は、野生型のC_H3抗体定常ドメインの遺伝コードによってコードされた天然のアミノ酸残基を指す。改変された突起は、例えば、表３の突起形成置換変異のうちのいずれか１つ以上によって形成され得る。

【０１００】

本明細書で使用される場合、「空洞に突起が挿入された対」という用語は、第１のＦｃドメイン単量体がそのC_H3抗体定常ドメイン内に改変された空洞を含む一方で、第２のＦｃドメイン単量体がそのC_H3抗体定常ドメイン内に改変された突起を含むものである２つのＦｃドメイン単量体を含んだＦｃドメインを説明するものである。空洞に突起が挿入された対においては、第１のＦｃドメイン単量体のC_H3抗体定常ドメイン内の改変された突起は、該突起が第２のＦｃドメイン単量体のC_H3抗体定常ドメイン内の改変された空洞と、C_H3抗体定常ドメイン間の界面における二量体の正常な会合を有意に邪魔することなく相互作用するように配置される。空洞に突起が挿入された対は、例えば、表３の任意の１つ以上の空洞形成置換変異および任意の１つ以上の突起形成置換変異の相補的な対を含むことができる。

【０１０１】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二量体Ｆｃドメイン」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体のヘテロ二量体形成によって形成されるＦｃドメインを指すものであって、該２つのＦｃドメイン単量体は、これら２つのＦｃドメイン単量体の好ましい形成を促進する異なる逆電荷の変異（例えば、表４の変異を参照）を含有する。

【０１０２】

本明細書で使用される場合、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の群に関連する「構造的に同一」という用語は、同じポリペプチド配列が同じ比率および構成で組み立てられた構築体を指し、例えばグリコシル化などのいずれの翻訳後修飾も指していない。

【０１０３】

本明細書で使用される場合、「ホモ二量体Ｆｃドメイン」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体のホモ二量体形成によって形成されるＦｃドメインを指すものであって、当該２つのＦｃドメイン単量体は、同一の逆電荷の変異（例えば、表５および６の変異を参照）を含有する。

【０１０４】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二量体形成選択モジュール」という用語は、適合するヘテロ二量体形成選択モジュールを有する２つのＦｃドメイン単量体の好ましいヘテロ二量体形成を促進するために、Ｆｃドメイン単量体のC_H3抗体定常ドメイン内に作製することが可能である、改変された突起、改変された空洞および特定の逆電荷のアミノ酸置換を指す。ヘテロ二量体形成選択モジュールを含有するＦｃドメイン単量体が結合して、ヘテロ二量体Ｆｃドメインを形成し得る。ヘテロ二量体形成選択モジュールの例を、表３および４に示している。

【０１０５】

本明細書で使用される場合、「ホモ二量体形成選択モジュール」という用語は、Ｆｃドメイン単量体のホモ二量体形成を促進してホモ二量体Ｆｃドメインを形成するC_H3ドメイン間の界面において電荷をもつ残基の環の範囲内の少なくとも２つの位置におけるＦｃ

ドメイン単量体内の逆電荷の変異を指す。例えば、ホモ二量体形成選択モジュールを形成する逆電荷変異は、ＣＨ３ドメイン間の界面において電荷をもつ残基の環の範囲内にある、３５７、３７０、３９９、および／または４０９位（ＥＵナンバリングによる）からの少なくとも２個のアミノ酸内にあり得る。ホモ二量体形成選択モジュールの例を、表４および５に示している。

【０１０６】

本明細書で使用される場合、「連結する」という用語は、化学的複合体化、組換え手段ならびに例えばペプチド結合、ジスルフィド結合およびアミド結合である化学結合を含む手段によって、２以上の成分、要素、成分または例えばポリペプチドであるタンパク質ドメインを組み合わせるまたは付加することを説明するために用いる。例えば、２つの単一ポリペプチドを結合して、化学的複合体化、化学結合、ペプチドリンカーまたはその他の共有結合手段を介して、１つの隣接し合うタンパク質構造を形成することが可能である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインとＦｃドメイン単量体の両方をコードする連続的な核酸配列から発現されることにより、Ｆｃドメイン単量体に結合される。他の実施形態では、抗原結合ドメインは、ペプチドリンカーを介してＦｃドメイン単量体に結合され、この場合において当該ペプチドリンカーのＮ末端は、例えばペプチド結合などの化学結合を介して、抗原結合ドメインのＣ末端に結合され、そしてペプチドリンカーのＣ末端は、例えばペプチド結合などの化学結合を介して、Ｆｃドメイン単量体のＮ末端に結合される。

【０１０７】

本明細書で使用される場合、「会合した（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）」という用語は、ポリペプチド（または１つの単一ポリペプチド内の配列）が、本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えば、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）を形成するように配置されるような、例えば水素結合、疎水性相互作用またはイオン性相互作用などのポリペプチド（または１つの単一ポリペプチド内の配列）間の相互作用を記載するために使用される。例えば、いくつかの実施形態では、例えば、２つのＦｃドメイン単量体をそれぞれ含む２つのポリペプチドと、１つのＦｃドメイン単量体をそれぞれ含む２つのポリペプチドの４つのポリペプチドが会合して、３つのＦｃドメインを有するＦｃ構築体が形成される（例えば、図５０および５１に図示するとおり）。４つのポリペプチドは、それらの各Ｆｃドメイン単量体を介して会合することが可能である。ポリペプチド間の会合は、共有結合相互作用を含まない。

【０１０８】

本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、２つの要素間、例えばタンパク質ドメイン間の結合を指す。リンカーは、共有結合またはスペーサーとすることが可能である。「結合」という用語は、化学結合、例えばアミド結合もしくはジスルフィド結合、または、例えば化学的複合体化である化学反応により形成される任意の種類の結合を指す。「スペーサー」という用語は、２つのポリペプチドもしくはポリペプチドドメインドメイン間に空間および／または柔軟性をもたらす２つのポリペプチドまたはポリペプチドドメイン間に生じる部分（例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマー）またはアミノ酸配列（例えば３～２００アミノ酸、３～１５０アミノ酸、または３～１００アミノ酸の配列）を指す。アミノ酸スペーサーは、ポリペプチドの一次配列の一部（例えば、ポリペプチド骨格を介して、離間したポリペプチドまたはポリペプチドドメインに連結されるような）である。例えばＦｃドメインを形成する２つのヒンジ領域または２つのＦｃドメイン単量体の間におけるジスルフィド結合の形成は、リンカーとは考えない。

【０１０９】

本明細書で使用される場合、「グリシンスペーサー」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体を直列に連結する、グリシンのみを含有するリンカーを指す。グリシンスペーサーは、少なくとも４、８、または１２個のグリシン（例えば、４～３０、８～３０、または１２～３０個のグリシン、例えば、１２～３０個、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４

、２５、２６、２７、２８、２９または３０個のグリシン）を含有し得る。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)
の配列を有する。本明細書で使用される場合、「アルブミン結合ペプチド」という用語は、血清アルブミンに対する親和性および血清アルブミンを結合する機能を有する１２～１６のアミノ酸のアミノ酸配列を指す。アルブミン結合ペプチドは、例えばヒト、マウスまたはラットである様々な起源のものとすることが可能である。本開示のいくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドが、Ｆｃドメイン単量体のＣ末端に融合され、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の血清半減期が増加する。アルブミン結合ペプチドは、直接またはリンカーを介して、Ｆｃドメイン単量体のＮ末端またはＣ末端と融合することが可能である。

【０１１０】

本明細書で使用される場合、「精製用ペプチド」という用語は、ポリペプチドの精製、単離または同定に用いることが可能である任意の長さのペプチドを指す。精製用ペプチドは、ポリペプチドに連結して、例えば細胞溶解混合物からの、ポリペプチドの精製および／またはポリペプチドの単離を支援し得る。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドは、精製用ペプチドに対して特異的な親和性を有する別の部分と結合する。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドと特異的に結合するこうした部分は、基剤、樹脂またはアガロースビーズ等の固相支持体に付加する。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合され得るペプチドの精製例を、本明細書においてさらに詳細に記載する。

【０１１１】

本明細書で使用される場合、「多量体」という用語は、本明細書に記載の会合したＦｃ構築体またはＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を少なくとも２個含む分子を指す。

【０１１２】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオチド、およびその断片または部分を指し、またゲノム由来もしくは合成由来のＤＮＡまたはＲＮＡを指し、それは一本鎖または二本鎖であり、センス鎖またはアンチセンス鎖を表し得る。単一のポリヌクレオチドが、単一のポリペプチドに翻訳される。

【０１１３】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、モノマーがアミド結合を介してともに連結するアミノ酸残基であるような単一のポリマーを説明している。ポリペプチドは、天然、組換えまたは合成的に産生されるかのいずれかである任意のアミノ酸配列を包含することを意図する。

【０１１４】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸位置」という用語は、タンパク質またはタンパク質ドメイン内のアミノ酸の位置番号を指す。アミノ酸位置は、指示された場合（例えば、ＣＤＲおよびＦＲ領域について）、Ｋａｂａｔナンバリングシステム（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，ｅｄ ５，１９９１））を使用して番号付け、そうでない場合は、ＥＵナンバリングを使用した。

【０１１５】

図１７Ａ～１７Ｄは、Ｋａｂａｔのナンバリングシステムを使用して番号付けされたヒトＩｇＧ１ Ｆｃドメインを示す。

【０１１６】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸改変」という用語は、参照配列（例えば、野生型の、非変異の、または改変されていないＦｃ配列）と比較して、Ｆｃ構築体の薬物動態（ＰＫ）および／または薬力学（ＰＤ）の性質、血中半減期、エフェクター機能（例えば、細胞溶解（例えば、抗体依存性細胞介在性傷害（ＡＤＣＣ）および／または補体依存細胞傷害活性（ＣＤＣ））、貪食（例えば、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）および／また

は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣＣ））、免疫活性化およびＴ細胞活性化）、Ｆｃ受容体（例えば、Ｆｃ－ガンマ受容体（ＦｃγＲ）（例えば、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２）、ＦｃγＲＩＩｂ（ＣＤ３２）、ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）および／またはＦｃγＲＩＩＩｂ（ＣＤ１６ｂ））、Ｆｃ－アルファ受容体（ＦｃａＲ）、Ｆｃ－イプシロン受容体（ＦｃεＲ）および／または胎児性Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ））に対するアフィニティー、補体カスケードに関与するタンパク質（例えば、Ｃ１ｑ）に対するアフィニティー、翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、シアリル化）、凝集性（例えば、二量体（例えば、ホモ二量体および／またはヘテロ二量体）および／または多量体を形成する能力）、および生物物理学的性質（例えば、C_H1およびC_L間の相互作用を変える、安定性を変える、ならびに／または、温度および／もしくはｐＨに対する感度を変える）に対して効果を発揮し、そして免疫学的疾患および炎症性疾患の治療有効性の改善を促進し得る、Ｆｃドメインのポリペプチド配列の変更を指す。アミノ酸改変は、アミノ酸置換、欠失および／または挿入を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸改変は、１つのアミノ酸の改変である。他の実施形態では、アミノ酸改変は、複数の（例えば、２以上）アミノ酸の改変である。アミノ酸改変は、アミノ酸の置換、欠失および／または挿入の組み合わせを含み得る。アミノ酸改変の解説には、Ｆｃポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の点変異（例えば、１つのヌクレオチドを別のヌクレオチドと交換）、挿入および欠失（例えば、１つ以上のヌクレオチドの付加および／または除去）などの、遺伝的（すなわち、ＤＮＡおよびＲＮＡ）変更が含まれる。

【０１１７】

ある特定の実施形態では、Ｆｃ構築体内またはＦｃ－抗原結合ドメイン構築体内の少なくとも１個（例えば、少なくとも１、２、または３個）のＦｃドメインは、アミノ酸改変を含む。いくつかの例では、少なくとも１個のＦｃドメインは、１個以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０個以上）のアミノ酸改変を含む。

【０１１８】

特定の実施形態では、Ｆｃ構築体内またはＦｃ－抗原結合ドメイン構築体内の少なくとも１個（例えば、少なくとも１、２または３個）のＦｃドメイン単量体がアミノ酸改変（例えば、置換）を含む。いくつかの例では、少なくとも１個のＦｃドメイン単量体が、１つ以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０以下）のアミノ酸改変（例えば、置換）を含む。

【０１１９】

本明細書で使用される場合、「パーセント（％）同一性」という用語は、候補配列、例えば本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体中のＦｃドメイン単量体の配列のアミノ酸（または核酸）残基であって、配列を整列させて、必要であれば最大のパーセント同一性を達成するようにしてギャップを導入した後で（すなわち、最適なアラインメントのために候補配列および参照配列の一方または両方においてギャップを導入することが可能であり、比較目的のために非相同の配列は無視することが可能である）、野生型のＦｃドメイン単量体の配列等の参照配列のアミノ酸（または核酸）残基に対して一致している、候補配列のアミノ酸（または核酸）残基の百分率を指すものである。パーセント同一性の決定のためのアラインメントは、この分野の技術の範囲内である種々の方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア等の公に利用可能であるコンピュータソフトウェアを用いて達成することが可能である。当業者は、比較している配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメント測定用の適切なパラメータを決定することが可能である。いくつかの実施形態では、所与の参照配列との、該参照配列でのまたは該参照配列に対する、所与の候補配列のパーセントアミノ酸（または核酸）配列同一性（あるいは、所与の参照配列との、該参照配列でのまたは該参照配列に対する、特定のパーセントアミノ酸（または核酸）配列同一性を有するまたは含む、所与の候補配列と表すことがある）は、以下のとおりに計算される：

１００×（Ａのフラクション／Ｂ）

式中、Ａは候補配列および参照配列のアラインメント内で同一として採点されたアミノ酸（または核酸）残基の数であり、Ｂは参照配列内のアミノ酸（または核酸）残基の総数である。候補配列の長さが参照配列の長さと等しくない場合のいくつかの実施形態では、参照配列に対する候補配列のパーセントアミノ酸（または核酸）配列同一性は、候補配列に対する参照配列のパーセントアミノ酸（または核酸）配列同一性と等しくないはずである。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＦｃ構築体（例えば、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）中のＦｃドメイン単量体は、野生型のＦｃドメイン単量体の配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２）と、少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％または９９．５％同一）である配列を有することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＦｃ構築体（例えば、３個のＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３～４８および５０～５３のうちのいずれか１個の配列に対して少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有することができる。特定の実施形態では、Ｆｃ構築体中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８、５２および５３の配列に対して少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有することができる。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、本明細書にさらに記載されるＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３６（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７、１８、２６、および２７）のうちのいずれか１つの配列と、少なくとも７５％同一（少なくとも７５％、７７％、７９％、８１％、８３％、８５％、８７％、８９％、９１％、９３％、９５％、９７％、９９％、９９．５％または１００％同一）である配列を有し得る。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、Ｆｃ構築体中のＦｃドメイン単量体は、最大で１０個のアミノ酸、例えば、１、２、３，４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸によって、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２～４８および５０～５３の配列とは異なる配列を有し得る。いくつかの実施形態では、Ｆｃ構築体中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２～４８および５０～５３のうちのいずれか１個の配列に対して、最大で１０個のアミノ酸置換、例えば、１、２、３，４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸置換を有する。

【０１２３】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、タンパク質をそれらの対応する核酸から発現するのに必要であるような、例えばオルガネラである、必要な細胞成分を含む担体を指す。核酸は典型的に、この技術分野で公知の従来の技術（形質転換、トランスフェクション、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、直接の微量注入等）によって宿主細胞内に導入されることが可能である核酸ベクター中に含まれる。宿主細胞は、例えば細菌細胞である原核細胞、または、例えば哺乳動物細胞（例えばＣＨＯ細胞）である真核細胞とすることができる。本明細書において記載される場合、宿主細胞は、所望のドメインをコードするポリペプチドを１つ以上発現させるために使用され、それらポリペプチドはその後組み合わされて、所望のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成させることができる。

【０１２４】

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」という用語は、活性成分のみならず、活性成分を投与方法に好適であるようにさせることが可能である、１つ以上の賦形剤および希釈剤を含有する薬用製剤または薬学的製剤を指す。本開示の薬学的組成物は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体と適合可能な薬学的に許容される成分を含む。薬学的組成物は典型的に、静脈投与または皮下投与のために水性形態である。

【０１２５】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドまたはＦｃ構築体の「実質的に均質な群」は

、組成物（例えば、細胞培養培地または薬学的組成物）中のポリペプチドまたはＦｃ構築体のうちの少なくとも５０％が、非還元ＳＤＳゲル電気泳動またはサイズ排除クロマトグラフィーにより決定された場合に、同数のＦｃドメインを有する群である。ポリペプチド、またはＦｃ構築体の実質的に均質な群は、精製前、または、プロテインＡもしくはプロテインＧ精製後、または、任意のＦａｂもしくはＦｃ特異的なアフィニティークロマトグラフィー単独の後で、得ることができる。種々の実施形態では、組成物中のポリペプチドまたはＦｃ構築体のうちの少なくとも５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％または８５％が、同数のＦｃドメインを有する。他の実施形態では、組成物中のポリペプチドのまたはＦｃ構築体のうちの最大で８５％、９０％、９２％または９５％が、同数のＦｃドメインを有する。

【０１２６】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的組成物中の賦形剤または希釈剤を指す。薬学的に許容される担体は、製剤の他の成分と適合可能でなければならず、そしてレシピエントに対し有害であってはならない。本開示において、薬学的に許容される担体は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に対し、十分な薬学的安定性を与えなければならない。担体の性質は、投与形態によって異なる。例えば、経口投与では、固形担体が好ましく、静脈内投与では概して、水溶液担体（例えば、ＷＦＩおよび／または緩衝液）が用いられる。

【０１２７】

本明細書で使用される場合、「治療効果量」は、例えば薬剤投与量である、対象もしくは患者において所望の生物学的な効果の誘導に、または、本明細書に記載の状態または障害を有する患者の治療に有効である量を指す。本明細書においては、「治療効果量」が、単回投与または任意の投薬もしくは経路での摂取、単独でまたは他の治療薬剤と組み合わせての摂取のいずれでも、所望の治療効果をもたらす量として解釈できるということも理解されたい。

【０１２８】

本明細書で使用される場合、断片という用語、および部分という用語は、相互交換可能に使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【０１２９】

【図１】（同一のポリペプチド鎖を一緒に結合させることにより形成される）２個のＦｃドメインを有するタンデム構築体、およびタンデムＦｃ配列のオフレジスター（ｏｆｆ－ｒｅｇｉｓｔｅｒ）会合により生成された結果として生じる種の一部を示す概略図である。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。

【図２】（同一のポリペプチド鎖を一緒に結合させることにより形成される）ペプチドリンカーにより接続される３個のＦｃドメインを有するタンデム構築体、およびタンデムＦｃ配列のオフレジスター会合により生成された結果として生じる種の一部を示す概略図である。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。

【図３】図３Ａおよび３Ｂは、リンカーにより接続され、直交性ヘテロ二量体形成ドメインを使用して組み立てられた、２個のＦｃドメイン（図３Ａ）または３個のＦｃドメイン（図３Ｂ）を有するＦｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示さ

れ、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ノブおよび空洞を示して、ノブイントゥホール対を示すために、突起を有するＣＨ３楕円形が示される。プラスおよび／またはマイナス印は、ＣＨ３ドメイン中の静電的ステアリング変異を示すために使用される。

【図４】図４Ａ～Ｈは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用してアセンブリされた、タンデムな複数のＦｃドメインを含むＦｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図５】図５Ａ～Ｆは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の対称的に分布されたＦｃドメインを含む分岐Ｆｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図６】図６Ａ～Ｆは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の非対称的に分布されたＦｃドメインを含む分岐Ｆｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図７】図７Ａ～Ｄは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の対称的に分布されたＦｃドメインおよび非対称的に分布されたＦａｂ（複数可）を含む分岐Ｆｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図８】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む分岐工ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図９】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図１０】図８のＦｃ構築体にアセンブリするポリペプチドをコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示す。最も左のレーン（レーン１）内の２００ｋＤａのバンドの存在は、意図されるＦｃ構築体の形成を示す。

【図１１】図９のＦｃ構築体にアセンブリするポリペプチドをコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示す。２００ｋＤａよりもわずか

に高い分子量を有する最も左のレーン（レーン１）内のバンドの存在は、意図されるＦｃ構築体の形成を示す。

【図１２】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインと含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４５）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４５０２）は、C_H３荷電アミノ酸置換（４５１０）の第１のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体と、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）（４５０８および４５０６）の第２のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換を有し、Ｎ末端でV_Hドメイン（４５１２）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２のポリペプチド（４５２４）は、荷電アミノ酸置換（４５１０）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）（４５２２）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４５１８）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第３および第４のポリペプチド（４５１６および４５１４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４５０８および４５０６）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４５０４および４５２０）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１３】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４６）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４６０２）は、C_H３荷電アミノ酸置換（４６０８）の第１のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体と、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）（４６０６および４６０４）の第２のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換を有し、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２のポリペプチド（４６１８）は、荷電アミノ酸置換（４６０８）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含む。第３および第４のポリペプチド（４６２６および４６２４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４６０６および４６０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４６２２および４６２０）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。V_L含有ドメイン（４６１４および４６１０）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１４】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４７）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４７０２）は、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、C_H３荷電アミノ酸置換（４７０８および４７０６）の第１のセットと、任意にC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）（４７０４）の第２のセットを含む突起形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体とを含み、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２および第３のポリペプチド（４７２６および４７２４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４７０８および４７０６）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４７２２および４７２０）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第４のポリペプチド（４７１０）は、荷電アミノ酸置換（４７０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４７１２および４７１６）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１５】５個のＦｃドメインおよび４個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４８）の説明図である。構築体は、６個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４８０２）は、４個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H3荷電アミノ酸置換（複数可）（４８１２、４８１０、４８０８、および４８０６）の第１のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換と、C_H3荷電アミノ酸置換（４８０４）の第２のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体とを含み、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２、第３、第４、および第５のポリペプチド（４８４６、４８４４、４８４２、および４８４０）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４８１２、４８１０、４８０８、および４８０６）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するＣＨ３荷電アミノ酸置換（複数可）（４８３０、４８２６、４８２２、および４８１８）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４８３８、４８３６、４８３４、および４８３２）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第６のポリペプチド（４８１４）は、荷電アミノ酸置換（４８０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４８１６、４８２０、４８２４、および４８２８）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１６】図１６Ａ～Ｃは、抗原結合ドメインがＦｃ構築体のＦｃドメインに結合され得る３つの例示的な方法の概略図である。図１６Ａは、抗原結合ドメインの重鎖構成要素が、Ｆｃ鎖の融合タンパク質として発現され得ることと、軽鎖構成要素が、別個のポリペプチドとして発現され得ることを示す。図１６Ｂは、長鎖Ｆｃの融合タンパク質として発現されるｓｃＦｖを示す。図１６Ｃは、別個に発現され、外因的に付加され、化学結合でＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合される重鎖構成要素および軽鎖構成要素を示す。

【図１７】図１７Ａは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きである。図１７Ｂは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）を示す。両端を含むＥ２１６～Ｃ２２０を欠いたヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きであり、Ｋ４４７を欠く。図１７Ｃは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きであり、そして４４７Ｋを欠く。図１７Ｄは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２）を示す。両端を含むＥ２１６～Ｃ２２０を欠いたヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きである。

【図１８】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図１９】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図２０】図１８に示されるものなどの単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体を作成するために使用され得るポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図２１】図１８に示されるものなどの単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体を作成するために使用され得るポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１３０】

詳細な説明

多くの治療用抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎ

ｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）、および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ：ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）など、Ｆｃドメインのエフェクター機能を介して自然免疫系の因子をリクルートすることにより機能する。いくつかの例では、本開示は、抗原結合ドメインを、少なくとも２個のＦｃドメインと組み合わせて、新規の治療薬を生成することを企図する。いくつかの場合では、本開示は、単一Ｆｃドメイン含有治療薬、例えば、既知の治療用抗体の抗原結合ドメインを、少なくとも２個のＦｃドメインと組み合わせて、固有の生物学的活性を有する新規の治療薬を生成することを企図する。いくつかの例では、本明細書に開示される新規の治療薬は、単一Ｆｃドメイン含有治療薬、例えば、既知の治療用抗体のものを越える生物学的活性を有する。少なくとも２個のＦｃドメインの存在により、エフェクター機能を増強することができ、そして例えばＡＤＣＰおよび／またはＣＤＣと組み合わされたＡＤＣＣなどの複数のエフェクター機能が活性化され、それにより治療用分子の有効性が上昇する。

【０１３１】

本明細書に記載される方法および組成物は、複数の直交性ヘテロ二量体化技術（例えば、表３および４から選択される変異の２個の異なるセット）を、任意にホモ二量体化技術（例えば、表５および６から選択される変異）とともに、同じタンパク質を形成するために一緒に結合するポリペプチドに導入することによって、複数のＦｃドメインを有する抗原結合タンパク質の構築を可能にする。複数のヘテロ二量体形成変異を同じタンパク質に組み立てられるポリペプチドに導入する、本明細書に記載される設計原理は、例えば、タンデムＦｃドメインを有する抗体様タンパク質、対称分岐型タンパク質、および非対称分岐型タンパク質を含む、多種多様なタンパク質構成の作成を可能にする。本明細書に記載される設計原理は、複合体タンパク質の立体配置の制御された作成を可能にするが、一方で、所望でない高次構造または制御されていない複合体の形成を不利にしている。本明細書に記載される直交性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、リンカーにより結合される少なくとも１個の抗原結合ドメインと少なくとも２個のＦｃドメインとを含有し、Ｆｃドメインのうちの少なくとも２個は、互いとは異なり、例えば、構築体の少なくとも１個のＦｃドメインは、抗原結合ドメインに結合され、構築体の少なくとも１個のＦｃドメインは、抗原結合ドメインに結合されないか、または構築体の２つのＦｃドメインは、異なる抗原結合ドメインに結合される。直交性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、リンカーにより分離された２つ以上のＦｃ単量体を含有する１つの長ペプチド鎖を発現し、長ペプチド鎖上の１つ以上の特定のＦｃ単量体に選択的に結合するように設計された単一Ｆｃ単量体を各々が含有する、２つ以上の異なる短ペプチド鎖を発現することにより製造される。任意の数のＦｃドメインをこの方法で直列に接続することができ、それにより、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のＦｃドメインを有する構築体の作製が可能となった。

【０１３２】

直交性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６８９、ならびに国際公開第ＷＯ／２０１５／１６８６４３号、同第ＷＯ２０１７／１５１９７１号、同第ＷＯ ２０１７／２０５４３６号、および同第ＷＯ ２０１７／２０５４３４号に記載される、２つ以上のＦｃドメインを有する分子を組み立てるためのＦｃ改変方法を使用して作られる。改変する方法は、直交性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４５～４８；図１２～図１５）を正確にアセンブリするための、ヘテロ二量体化選択性モジュールの２つのセット：（ｉ）異なる逆電荷変異を有するヘテロ二量体化選択性モジュール（表４）、ならびに（ｉｉ）改変された空洞および突起を有するヘテロ二量体化選択性モジュール（表３）を使用する。任意のヘテロ二量体形成選択モジュールが、各Ｆｃ単量体ポリペプチドに特定のアミノ酸置換を導入することにより、構築体の特定のＦｃドメインに組み立てられるように設計されたＦｃ単量体の対に組み込まれ得る。ヘテロ二量体形成選択モジュールは、異なるヘテロ二量体

形成選択モジュールの変位を有するＦｃ単量体との会合を好まない一方で、特定のヘテロ二量体形成選択モジュールの相補的なアミノ酸置換を有するＦｃ単量体間の会合を促すように設計されている。これらのヘテロ二量体形成変異は、より小さいまたはより大きい複合体の最小形成を伴う、構築体の異なるＦｃドメインの所望のタンデム構成への異なるＦｃ単量体ポリペプチドの組み立てを確実にする。これらの構築体の特性は、薬学的組成物の安全性、有効性、均一性、および信頼性を確実にするために望ましい、実質的に均質な薬学的組成物の効率的な生成を可能にする。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される直交性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の組み立ては、本明細書に記載の２セットのヘテロ二量体形成変異の間で異なる静電的ステアリング変異を使用して実現され得る。直交性静電的ステアリング変異の一例は、Ｆｃ単量体の第１のノブのＥ３５７ＫおよびＦｃ単量体の第１のホールのＫ３７０Ｄ（これらのＦｃ単量体は会合して、第１のＦｃドメインを形成する）、ならびにＦｃ単量体の第２のノブのＤ３９９ＫおよびＦｃ単量体の第２のホールのＫ４０９Ｄ（これらのＦｃ単量体は会合して、第２のＦｃドメインを形成する）である。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、異なる結合特性、例えば、異なる結合親和性（同じもしくは異なる標的に対して）、または異なる標的分子に対する特異性を有する、少なくとも２個の抗原結合ドメイン（例えば、２、３、４、５、または６個の抗原結合ドメイン）を有する。二重特異性構築体は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のポリペプチドのうちの２つ以上が、異なる抗原結合ドメインを含む、例えば、長鎖が、第１の特異性の１個の抗原結合ドメインを含み、短鎖が、第２の特性の異なる抗原結合ドメインを含む、上記のＦｃ骨格から生成され得る。異なる抗原結合ドメインは、異なる軽鎖を使用してもよく、または共通軽鎖を使用してもよく、またはｓｃＦｖドメインからなることもできる。

【０１３５】

二重特異性および三重特性構築体は、２個の異なるセットのヘテロ二量体形成変異、すなわち、直交性ヘテロ二量体形成変異を使用することにより生成され得る。このようなヘテロ二量体形成配列は、他のヘテロ二量体形成配列との会合が不利となるように設計される必要がある。そのような設計は、本明細書に記載される、２セットのヘテロ二量体形成変異の間で異なる静電的ステアリング変異、および／または２セットのヘテロ二量体形成変異の間で異なる空洞に突起が挿入された変異を使用して実現され得る。直交性（直交性）の静電的ステアリング変異の一例は、第１のノブ（ｋｎｏｂ）Ｆｃ中のＥ３５７Ｋ、第１のホール（ｈｏｌｅ）Ｆｃ中のＫ３７０Ｄ、第２のノブＦｃ中のＤ３９９Ｋ、および第２のホールＦｃ中のＫ４０９Ｄである。

【０１３６】

Ｉ．Ｆｃドメイン単量体

Ｆｃドメイン単量体は、ヒンジドメイン、C_H2抗体定常ドメイン、およびC_H3抗体定常ドメインの少なくとも一部分（例えば、任意のアミノ酸置換を有するヒトＩｇＧ１ヒンジ、C_H2抗体定常ドメイン、およびC_H3抗体定常ドメイン）を含む。Ｆｃドメイン単量体は、免疫グロブリン抗体アイソタイプＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはＩｇＤのものとすることが可能である。Ｆｃドメイン単量体はまた、任意の免疫グロブリン抗体アイソタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４）のものとしてもよい。Ｆｃドメイン単量体はまた複合型であってもよく、例えば、ヒンジおよびＩｇＧ１からのC_H2およびＩｇＡからのC_H3による複合型、または、ヒンジおよびＩｇＧ１からのC_H2であるがＩｇＧ３からのC_H3による複合型であってもよい。Ｆｃドメイン単量体の二量体は、白血球表面上にある受容体である、例えばＦｃγＲＩＩａであるＦｃ受容体と結合することが可能なＦｃドメイン（本明細書でさらに規定される）である。本開示では、Ｆｃドメイン単量体のC_H3抗体定常ドメインが、C_H3－C_H3抗体定常ドメインの界面におけるアミノ酸置換を含有して、それらの相互による会

合を促進し得る。他の実施形態では、Ｆｃドメイン単量体は、例えばアルブミン結合ペプチドまたは精製用ペプチドである、Ｎ末端またはＣ末端に付加するさらなる部分を含む。本開示では、Ｆｃドメイン単量体は、例えばV_H、V_L、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域（ＨＶＲ）である、いずれの種類の抗体可変領域も含有しない。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えば、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２の配列に対して少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えば、三つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３、４４、４６、４７、４８、および５０～５３のいずれか１つの配列に対して少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有し得る。ある特定の実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体中のＦｃドメイン単量体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８、５２、および５３のうちのいずれか１個の配列に対して少なくとも９５％同一（少なくとも９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有することができる。

SEQ ID NO: 42
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

SEQ ID NO: 44
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 46
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 48
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

SEQ ID NO: 50
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO: 51
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

NNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

SEQ ID NO: 52
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

SEQ ID NO: 53
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

【０１３８】

ＩＩ．Ｆｃドメイン

本明細書で規定するように、Ｆｃドメインは、C_H3抗体定常ドメイン間の相互作用によって二量体形成する２つのＦｃドメイン単量体を含む。Ｆｃドメインは、Ｆｃ受容体、例えばＦｃ－ガンマ受容体（すなわち、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ））、Ｆｃ－アルファ受容体（すなわち、Ｆｃα受容体（ＦｃαＲ））、Ｆｃ－イプシロン受容体（すなわち、Ｆｃε受容体（ＦｃεＲ））および／または胎児性Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する最小限の構造を形成する。いくつかの実施形態では、本開示のＦｃドメインは、Ｆｃγ受容体（例えば、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩＡ（ＣＤ３２）、ＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２）、ＦｃγＲＩＩＩＡ（ＣＤ１６ａ）、ＦｃγＲＩＩＩＢ（ＣＤ１６ｂ））および／またはＦｃγＲＩＶおよび／または胎児性Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する。

【０１３９】

ＩＩＩ．抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインは、特定の標的分子または標的分子のセットに結合する任意のタンパク質またはポリペプチドであり得る。抗原結合ドメインは、標的分子に特異的に結合する１つ以上のペプチドまたはポリペプチドを含む。抗原結合ドメインは、抗体の抗原結合ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体または抗体構築体の断片、例えば、標的抗原に結合する抗体の最小部分であってもよい。抗原結合ドメインは、例えばフィブロネクチン系の結合タンパク質（例えば、ＦＮ３モノボディ）などの標的に特異的に結合する合成的に改変されたペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、リガンドまたは受容体であり得る。断片の抗原結合（Ｆａｂ）断片は、標的抗原に結合する抗体上の領域である。この領域は、重鎖および軽鎖それぞれの１つの定常ドメインと１つの可変ドメインから構成される。Ｆａｂ断片は、V_H、V_L、C_H1およびC_Lドメインを含む。可変ドメインのV_HおよびV_Lはそれぞれ、単量体のアミノ末端で、相補性決定領域（ＣＤＲ）が３個の１セットを含有する。Ｆａｂ断片は、免疫グロブリン抗体アイソタイプのＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはＩｇＤのものであり得る。またＦａｂ断片単量体は、任意の免疫グロブリン抗体アイソタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４）のものであってもよい。いくつかの実施形態では、Ｆａｂ断片は、免疫グロブリンのプロテアーゼ処置（例えばペプシン）後の第２の同一Ｆａｂ断片に共有結合的に付加され、$F(ab')_2$断片を形成してもよい。いくつかの実施形態では、Ｆａｂは、例えばドメイン間のリンカーを用いて融合される可変ドメインと定常ドメインの両方を含む単一ポリペプチドとして発

現されてもよい。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、Ｆａｂ断片の一部のみが抗原結合ドメインとして使用される場合がある。いくつかの実施形態では、Ｆａｂの軽鎖構成要素（V_L＋C_L）のみ、またはＦａｂの重鎖構成要素（V_H＋C_H）のみが使用される場合がある。いくつかの実施形態では、Ｆａｂ可変領域のV_H鎖とV_L鎖の融合タンパク質である一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）が使用される場合がある。他の実施形態では、直列のＦｄセグメント（V_H－C_H１－V_H－C_H１）の対を含む直線状抗体が使用される場合があり、このセグメントは、相補的な軽鎖ポリペプチドとともに抗原結合領域の対を形成する。

【０１４１】

抗原結合ドメインは、本明細書に記載されるＦｃ含有ポリペプチド内において種々の数で、かつ種々の位置に配置され得る。いくつかの実施形態では、１つ以上の抗原結合ドメインは、Ｆｃ含有ポリペプチドのＮ末端、Ｃ末端、および／またはＦｃドメイン間に配置され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはペプチドリンカーは、抗原結合ドメイン、例えば、Ｆａｂドメインと、Ｆｃ含有ポリペプチドのＦｃドメインとの間に配置され得る。いくつかの実施形態では、連続して結合される複数の抗原結合ドメイン（例えば、２、３、４、または５つ以上の抗原結合ドメイン）は、ポリペプチド鎖に沿った任意の位置に配置され得る（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２５：１２９０－１２９７，２００７）。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、２つ以上の抗原結合ドメインは、Ｆｃドメイン含有ポリペプチド上、または多数のＦｃドメイン含有ポリペプチドから作られるタンパク質複合体上で、互いに対して種々の距離で配置され得る。いくつかの実施形態では、２つ以上の抗原結合ドメインは、例えば、モノクローナル抗体にあるように、同じＦｃドメイン上で、互いに近く配置される。いくつかの実施形態では、２つ以上の抗原結合ドメインは、互いに対してさらに遠く離れて配置され、例えば、抗原結合ドメインは、タンパク質構造上の１、２、３、４、または５つ以上のＦｃドメインによって互いから分離している。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合ドメインは、表１Ａおよび１Ｂに列記される標的または抗原に対して、以下の表１Ａおよび１Ｂにさらに詳細に提示されるように、当該列記される標的または抗原に関して表１Ａおよび１Ｂに列記されるＣＤＲ配列のうちの１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つすべてを含む。

【０１４４】

（表１Ａ）ＣＤＲ配列

標的	抗体の名称	CDR1-IMGT (重)	CDR2-IMGT (重)	CDR3-IMGT (重)	CDR1-IMGT (軽)	CDR2-IMGT (軽)	CDR3-IMGT (軽)
B7-H3	エノブリツズマブ (Enoblitzumab)	GFTFSSFG (SEQ ID NO: 76)	ISSDSSAI (SEQ ID NO: 106)	GRGRENIYY GSRLDY (SEQ ID NO: 137)	QNVDTN (SEQ ID NO: 171)	SAS	QQYNNYPF T (SEQ ID NO: 201)
ベータ-アミロイド	ガンテネルマブ (Gantenerumab)	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 77)	INASGTRT (SEQ ID NO: 107)	ARGKGNTH KPYGYVRYF DV (SEQ ID NO: 138)	QSVSSSY (SEQ ID NO: 172)	GAS	LQIYNMPIT (SEQ ID NO: 202)
CCR4	モガムリズマブ (Mogamulizumab)	GFIFSNYG (SEQ ID NO: 78)	ISSASTYS (SEQ ID NO: 108)	GRHSDGNF AFGY (SEQ ID NO: 139)	RNIVHINGD TY (SEQ ID NO: 173)	KVS	FQGSLLPW T (SEQ ID NO: 203)
CD19	イネビリズマブ (Inebilizumab)	GFTFSSSW (SEQ ID NO: 79)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)	ARSGFITTV RDFDY (SEQ ID NO: 140)	ESVDTFGIS F (SEQ ID NO: 174)	EAS	QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 204)
CD20	オビヌツズマブ (Obinutuzumab)	GYAFSYSW (SEQ ID NO: 80)	IFPGDGDT (SEQ ID NO: 110)	ARNVFDGY WLVY (SEQ ID NO: 141)	KSLLHSNGI TY (SEQ ID NO: 175)	QMS	AQNLELPYT (SEQ ID NO: 205)
CD20	オカラツズマブ (Ocaratuzumab)	GRTFTSYN MH (SEQ ID NO: 81)	AIYPLTGDT (SEQ ID NO: 111)	ARSTYVGG DWQFDV (SEQ ID NO: 142)	SSVPY (SEQ ID NO: 176)	ATS	QQWLSNPP T (SEQ ID NO: 206)
CD20	リツキシマブ (Rituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	CARSTYYG GDWYFNV (SEQ ID NO: 143)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPP T (SEQ ID NO: 207)
CD20	ウブリツキシマブ (Ublituximab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARYDYNYA MDY (SEQ ID NO: 144)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTFNPP T (SEQ ID NO: 208)
CD20	ベルツズマブ (Veltuzumab)	GYTFTSYN (SEQ ID NO: 82)	IYPGNGDT (SEQ ID NO: 112)	ARSTYYGG DWYFDV	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWTSNPP T

					(SEQ ID NO: 145)			(SEQ ID NO: 207)
CD22	エプラツズマブ (Epratuzumab)	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 83)	INPRNDYT (SEQ ID NO: 113)		ARRDITTFY (SEQ ID NO: 146)	QSVLYSANHKNY (SEQ ID NO: 178)	WAS	HQYLSS (SEQ NO: 209)
CD37	オトレルツズマブ (Otlertuzumab)	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGGT (SEQ ID NO: 114)		ARSVGPFDS (SEQ ID NO: 147)	ENVYSY (SEQ ID NO: 179)	FAK	QHHSDNPWT (SEQ ID NO: 210)
CD38	ダラツムマブ (Daratumumab)	GFTFNSFA (SEQ ID NO: 85)	ISGSGGGT (SEQ ID NO: 115)		AKDKILWFGEPVFDY (SEQ ID NO: 148)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWPPT (SEQ ID NO: 211)
CD38	イサツキシマブ (Isatuximab)	GYTFTDYW (SEQ ID NO: 86)	IYPGDGDT (SEQ ID NO: 109)		ARGDYYGSNSLDY (SEQ ID NO: 149)	QDVSTV (SEQ ID NO: 181)	SAS	QQHYSPPYT (SEQ ID NO: 212)
CD3イプシロン	フォラルマブ (Foralumab)	GFKFSGYG (SEQ ID NO: 87)	IWYDGSKK (SEQ ID NO: 116)		ARQMGYWHFDLW (SEQ ID NO: 150)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 213)
CD52	アレムツズマブ (Alemtuzumab)	GFTFTDFY (SEQ ID NO: 88)	IRDKAKGYTT (SEQ ID NO: 117)		AREGHTAAPFDY (SEQ ID NO: 151)	QNIDKY (SEQ ID NO: 182)	NTN	LQHISRPRT (SEQ ID NO: 214)
CD105	カロツキシマブ (Carotuximab)	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSKASNHAT (SEQ ID NO: 118)		TRWRRFFDS (SEQ ID NO: 152)	SSVSY (SEQ ID NO: 177)	ATS	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 215)
CD147	cHAb18	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 89)	IRSANNHAPT (SEQ ID NO: 119)		TRDSTATH (SEQ ID NO: 153)	QSVIND (SEQ ID NO: 183)	TAS	QQDTSPP (SEQ ID NO: 216)
c-Met	ABT-700	GYIFTAYT (SEQ ID NO: 90)	IKPNNGLA (SEQ ID NO: 120)		ARSEITTEFDY (SEQ ID NO: 154)	ESVDSYANSF (SEQ ID NO: 184)	RAS	QQSKEDPLT (SEQ ID NO: 217)

CTLA-4	イピリムマブ (Ipilimumab)	GFTFSSYT (SEQ ID NO: 91)	ISYDGNNK (SEQ ID NO: 121)	ARTGWLGP FDY (SEQ ID NO: 155)	QSVGSSY (SEQ ID NO: 185)	GAF	QQYGSSPW T (SEQ ID NO: 218)
EGFR2	マルゲツキシマブ (Margetuximab)	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGF YAMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 219)
EGFR3	ルムレツズマブ (Lumretuzumab)	GYTFRSSY (SEQ ID NO: 93)	IYAGTGSP (SEQ ID NO: 123)	ARHRDYYS NSLTY (SEQ ID NO: 157)	QSVLNSGN QKNY (SEQ ID NO: 187)	WAS	QSDYSYPYT (SEQ ID NO: 220)
EphA3	イファボツズマブ (Ifabotuzumab)	GYTFTGYW (SEQ ID NO: 94)	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 124)	ARGGYYED FDS (SEQ ID NO: 158)	QGIISY (SEQ ID NO: 188)	AAS	GQYANYPY T (SEQ ID NO: 221)
GD3	エクロメキシマブ (Ecromeximab)	GFAFSHYA (SEQ ID NO: 95)	ISSGGSGT (SEQ ID NO: 125)	TRVKLGTYY FDS (SEQ ID NO: 159)	QDISNY (SEQ ID NO: 189)	YSS	HQYSKLP (SEQ ID NO: 222)
GPC3	コドリツズマブ (Codrituzumab)	GYTFTDYE (SEQ ID NO: 96)	LDPKTGDT (SEQ ID NO: 126)	TRFYSYTY (SEQ ID NO: 160)	QSLVHSNR NTY (SEQ ID NO: 190)	KVS	SQNTHVPPT (SEQ ID NO: 223)
KIR2DL1/2/3	リリルマブ (Lirilumab)	GGTFSFYA (SEQ ID NO: 97)	FIPIFGAA (SEQ ID NO: 127)	ARIPSGSYY YDYDMDV (SEQ ID NO: 161)	QSVSSY (SEQ ID NO: 180)	DAS	QQRSNWMY T (SEQ ID NO: 224)
MUC5AC	エンシツキシマブ (Ensituximab)	GFSLSKFG (SEQ ID NO: 98)	IWGDGST (SEQ ID NO: 128)	VKPGGDY (SEQ ID NO: 162)	SSISY (SEQ ID NO: 191)	DTS	HQRDSYPW T (SEQ ID NO: 225)
ホスファチジルセリン	バビツキシマブ (Bavituximab)	GYSFTGYN (SEQ ID NO: 84)	IDPYYGDT (SEQ ID NO: 129)	VKGGYYGH WYFDV (SEQ ID NO: 163)	QDIGSS (SEQ ID NO: 192)	ATS	LQYVSSPPT (SEQ ID NO: 226)
RHD	ロレジマブ (Roledumab)	GFTFKNYA (SEQ ID NO: 99)	ISYDGRNI (SEQ ID NO: 130)	ARPVRSRW LQLGLEDAF HI	QDIRNY (SEQ ID NO: 193)	AAS	QQYYNSPP T (SEQ ID NO: 227)

SLAMF7	エロツズマブ (Elotuzumab)	GFDFSRYW (SEQ ID NO: 100)	INPDSSTI (SEQ ID NO: 131)	ARPDGNYW YFDV (SEQ ID NO: 165)	QDVGIA (SEQ ID NO: 194)	WAS	QQYSSYPY T (SEQ ID NO: 228)
HER2	トラスツズマブ (Trastuzumab)	GFNIKDTY (SEQ ID NO: 92)	IYPTNGYT (SEQ ID NO: 122)	SRWGGDGF YAMDY (SEQ ID NO: 156)	QDVNTA (SEQ ID NO: 186)	SAS	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 219)
OX40	オキセルマブ (Oxelumab)	GFTFNSYA (SEQ ID NO: 101)	ISGSGGFT (SEQ ID NO: 132)	AKDRLVAPG TFDY (SEQ ID NO: 166)	QGISSW (SEQ ID NO: 195)	AAS	QQYNSYPY T (SEQ ID NO: 229)
PD-L1	アベルマブ (Avelumab)	GFTFSSYI (SEQ ID NO: 102)	IYPSGGIT (SEQ ID NO: 133)	ARIKLGTVT TVDY (SEQ ID NO: 167)	SSDVGGYN Y (SEQ ID NO: 196)	DVS	SSYTSSSTR V (SEQ ID NO: 230)
CD135	4G8-SDIEM	SYWMH (SEQ ID NO: 103)	EIDPSDSYK DYNQKFKD (SEQ ID NO: 134)	AITTTPFDF (SEQ ID NO: 168)	RASQSISNN LH (SEQ ID NO: 197)	YSQSIS (SEQ ID NO: 200)	QQSNTWPY T (SEQ ID NO: 231)
HIV1	VRC01LS	GYTFLNCPI (SEQ ID NO: 104)	GWMKPRG GAVN (SEQ ID NO: 135)	ARYFFGSSP NWYFD (SEQ ID NO: 169)	SQYGSLAW (SEQ ID NO: 198)	GGS	QQYEFFGQ GT (SEQ ID NO: 232)
HER3	KTN3379	GFTFSYYYM Q (SEQ ID NO: 105)	IGSSGGVTN (SEQ ID NO: 136)	ARVGLGDA FDIWQQ (SEQ ID NO: 170)	SLSNIGLN (SEQ ID NO: 199)	SRN	AAWDDSPP G (SEQ ID NO: 233)

【０１４５】
（表１Ｂ）可変ドメイン配列

抗体	VH/CH1	VL
アテゾリズマブ (Atezolizumab) PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVA WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARRHW PGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV STAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
デュルバルマブ (Durvalumab) PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
トレメリムマブ (Tremelimumab) CTLA-4	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIN SYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFN RGEC

抗体	VH/CH1	VL
	GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	
イサツキシマブ (Isatuximab) CD38	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKAS GYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIG TIYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKS SKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGDY YGSNSLDYWGQGTSVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDV STVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGV PDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYY CQQHYSPPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
MOR 202 CD38	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVS GISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLP LVYTGFAYWGQGTLVTV (VH のみ)	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHY YVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC QTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ

【０１４６】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４５の抗原結合ドメイン（図１２の４５０４／４５１２および４５１８／４５２０）はそれぞれ、表１Ａおよび１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個の３個の重鎖および３個の軽鎖のＣＤＲ配列を含み得る。

【０１４７】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４６の抗原結合ドメイン（図１３の４６１０／４６２０および４６１４／４６２２）はそれぞれ、表１Ａおよび１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個の３個の重鎖および３個の軽鎖のＣＤＲ配列を含み得る。

【０１４８】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の抗原結合ドメイン（図１４の４７１２／４７２０および４７１６／４７２２）はそれぞれ、表１Ａおよび１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個の３個の重鎖および３個の軽鎖のＣＤＲ配列を含み得る。

【０１４９】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の抗原結合ドメイン（図１５の４８１６／４８３２、４８２０／４８３４、４８２４／４８３６、および４８２８／４８３８）はそれぞれ、表１Ａおよび１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個の３個の重鎖および３個の軽鎖のＣＤＲ配列を含み得る。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン（例えばＦａｂまたはｓｃＦｖ）は、表２

または表１Ｂに列記される抗体のＶ$_{H}$鎖およびＶ$_{L}$鎖を含む。いくつかの実施形態では、Ｆａｂは、表２または表１Ｂに列記される抗体のＶ$_{H}$鎖およびＶ$_{L}$鎖に含有されるＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、Ｆａｂは、表２に列記される抗体のＶ$_{H}$鎖およびＶ$_{L}$鎖に含有されるＣＤＲを含み、Ｖ$_{H}$配列およびＶ$_{L}$配列の残りは、表２の抗体のＶ$_{H}$配列およびＶ$_{L}$配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。いくつかの実施形態では、Ｆａｂは、表１Ｂに列記される抗体のＶＨ鎖およびＶＬ鎖に含有されるＣＤＲを含み、ＶＨ配列およびＶＬ配列の残りは、表１Ｂの抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１５１】

（表２）

標的	抗体の名称
AbGn-7 抗原	AbGn-7
AMHR2	GM-102
B7-H3	DS-5573a
CA19-9	MVT-5873
CAIX	抗CAIX
CD19	XmAb5871
CD33	BI-836858
CD37	BI-836826
CD38	MOR-202
CD47	抗CD47
CD70	ARGX-110
CD70	ARGX-110
CD98	IGN-523
CD147	メツズマブ (Metuzumab)
CD157	MEN-1112
c-Met	ARGX-111
EGFR2	GT-Mab 7.3-GEX
EphA2	DS-8895a
FGFR2	FPA-144
GM2	BIW-8962
HPA-1a	NAITgam
ICAM-1	BI-505
IL-3Rアルファ	タラコツズマブ (Talacotuzumab)
JL-1	ロイコツキシマブ (Leukotuximab)
カッパ骨髄腫抗原	MDX-1097
KIR32DL2	IPH-4102
LAG-3	GSK-2381781
緑膿菌 (P. aeruginosa) 血清型01	AR-104
pGlu-aベータ	PBD-C06
TA-MUC1	GT-MAB 2.5-GEX

【０１５２】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４５の抗原結合ドメイン（図１２の４５０４／４５１２および４５１８／４５２０）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列を含み得る。

【０１５３】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４６の抗原結合ドメイン（図１３の４６１０／４６２０および４６１４／４６２２）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列を含み得る。

【０１５４】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の抗原結合ドメイン（図１４の４７１２／４７２０および４７１６／４７２２）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列を含み得る。

【０１５５】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の抗原結合ドメイン（図１５の４８１６／４８３２、４８２０／４８３４、４８２４／４８３６、および４８２８／４８３８）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列を含み得る。

【０１５６】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４５の抗原結合ドメイン（図１２の４５０４／４５１２および４５１８／４５２０）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得る。

【０１５７】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４６の抗原結合ドメイン（図１３の４６１０／４６２０および４６１４／４６２２）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得る。

【０１５８】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の抗原結合ドメイン（図１４の４７１２／４７２０および４７１６／４７２２）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得る。

【０１５９】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の抗原結合ドメイン（図１５の４８１６／４８３２、４８２０／４８３４、４８２４／４８３６、および４８２８／４８３８）はそれぞれ、表２および１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得る。

【０１６０】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４５の抗原結合ドメイン（図１２の４５０４／４５１２および４５１８／４５２０）はそれぞれ、V_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得、V_HおよびV_L配列の残りは、表２または表１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１６１】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４６の抗原結合ドメイン（図１３の４６１０／４６２０および４６１４／４６２２）はそれぞれ、V_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得、V_HおよびV_L配列の残りは、表２または表１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１６２】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の抗原結合ドメイン（図１４の４７１２／４７２０および４７１６／４７２２）はそれぞれ、V_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得、V_HおよびV_L配列の残りは、表２または表１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１６３】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の抗原結合ドメイン（図１５の４８１６／４８３２、４８２０／４８３４、４８２４／４８３６、および４８２８／４８３８）はそれぞれ、V_HおよびV_L配列に含まれるＣＤＲ配列を含み得、V_HおよびV_L配列の残りは、表２または表１Ｂに列記される抗体のうちのいずれか１個のV_HおよびV_L配列に対して少なくとも９５％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９９％同一、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１６４】
ＩＶ．二量体形成選択モジュール
本開示において、二量体形成選択モジュールは、２つのＦｃドメイン単量体の好ましい対形成を促進してＦｃドメインを形成する、Ｆｃドメイン単量体内の構成要素または選択アミノ酸を含む。詳細には、二量体形成選択モジュールは、２つのＦｃドメイン単量体の相互作用するＣ$_{H}$３抗体定常ドメイン間の界面に位置するアミノ酸置換を含む、Ｆｃドメイン単量体のＣ$_{H}$３抗体定常ドメインの部分である。二量体形成選択モジュールにおいては、アミノ酸置換が、それら置換に選択されたアミノ酸の適合性の結果として、２つのＣ$_{H}$３抗体定常ドメインの好ましい二量体形成を行う。好ましいＦｃドメインの最終形態は、二量体形成選択モジュールをもたないＦｃドメイン単量体で、または二量体形成選択モジュール内に適合しないアミノ酸置換をもつＦｃドメイン単量体で形成される他のＦｃドメインに対して選択的である。この種のアミノ酸置換は、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ等のこの技術分野で周知の従来の分子クローニング技術を用いて行うことが可能である。
【０１６５】
いくつかの実施形態では、二量体形成選択モジュールは、Ｃ$_{H}$３抗体定常ドメイン内に改変された空洞（本明細書でさらに説明する）を含む。他の実施形態では、二量体形成選択モジュールは、Ｃ$_{H}$３抗体定常ドメイン内に改変された突起（本明細書でさらに説明する）を含む。選択的にＦｃドメインを形成するために、適合可能な二量体形成選択モジュールをもつ２つのＦｃドメイン単量体、例えば改変された空洞を含む一方のＣ$_{H}$３抗体定常ドメインと、改変された突起を含むもう一方のＣ$_{H}$３抗体定常ドメインとを結合して、Ｆｃドメイン単量体の空洞に突起が挿入された対を形成する。改変された突起および改変された空洞は、ヘテロ二量体形成選択モジュールの例であり、それらは、適合するヘテロ二量体形成選択モジュールを有する２つのＦｃドメイン単量体の好ましいヘテロ二量体形成を促進するために、Ｆｃドメイン単量体のＣ$_{H}$３抗体定常ドメイン内に作製することが可能である。
【０１６６】
他の実施形態では、正電荷をもつアミノ酸置換を含有する二量体形成選択モジュールをもつＦｃドメイン単量体と、負電荷をもつアミノ酸置換を含有する二量体形成選択モジュールをもつＦｃドメイン単量体とを選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリング（本明細書においてさらに説明する）を経てＦｃドメインを形成することができる。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体は、以下の正電荷をもつアミノ酸置換および負電荷をもつアミノ酸置換のうちの１つ以上を含み得る：Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４３９ＤおよびＫ４３９Ｅ。一実施例では、正電荷をもつアミノ酸置換、例えばＤ３５６ＫまたはＥ３５７Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、負電荷をもつアミノ酸置換、例えばＫ３７０ＤまたはＫ３７０Ｅを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。別の実施例では、Ｅ３５７Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、Ｋ３７０Ｄを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。別の実施例では、Ｅ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。いくつかの実施形態では、逆電荷のアミノ酸置換を、ヘテロ二量体形成選択モジュールとして用い得るものであって、異なるが適合する逆電荷のアミノ酸置換を含有する２つのＦｃドメイン単量体が結合して、ヘテロ二量体Ｆｃドメインを形成する。特定の二量体形成選択モジュールを、さらに以下に説明される表３および４にさらに列記しているが、これらに限定されない。
【０１６７】
他の実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体が、Ｃ$_{H}$３ドメイン間の界面における電荷をもつ残基の環内の少なくとも２つの位置において、同一の逆電荷の変異を含有するホ

モ二量体形成選択モジュールを含む。ホモ二量体形成選択モジュールは、Ｆｃドメイン単量体のホモ二量体形成を促進してホモ二量体Ｆｃドメインを形成する、逆電荷のアミノ酸置換である。２つのＦｃドメイン単量体内の残基の２以上の相補的な対の両要素の電荷が反転していることによって、変異したＦｃドメイン単量体は同じ変異の配列のＦｃドメイン単量体に対して相補性を維持するが、こうした変異なしではＦｃドメイン単量体に対する相補性はより小さい。一実施形態では、Ｆｃドメインは、二重変異体である、Ｋ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋ、Ｋ３９２Ｄ／Ｄ３９９Ｋ、Ｅ３５７Ｋ／Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３５６Ｋ／Ｋ４３９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ／Ｄ３９９Ｋ、Ｋ３９２Ｅ／Ｄ３９９Ｋ、Ｅ３５７Ｋ／Ｋ３７０ＤまたはＤ３５６Ｋ／Ｋ４３９Ｅを含むＦｃ単量体を含む。別の実施形態では、Ｆｃドメインは、例えばＫ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋ／Ｅ３５７Ｋ／Ｋ３７０Ｅである二重変異体の任意の対を結合した四重変異体を含むＦｃドメイン単量体を含む。ホモ二量体形成選択モジュールの例を、表５および６にさらに示している。ホモ二量体形成Ｆｃドメインを使用して、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体上に対称分岐点を作ることができる。一実施形態では、本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、１個のホモ二量体形成Ｆｃドメインを有する。一実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、２つ以上のホモ二量体形成Ｆｃドメイン、例えば、２、３、４、または５つ以上のホモ二量体形成ドメインを有する。一実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、３個のホモ二量体形成Ｆｃドメインを有する。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、１個のホモ二量体形成選択モジュールを有する。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、２個以上のホモ二量体化選択性モジュール、例えば、２、３、４、または５個以上のホモ二量体化選択性モジュールを有する。

【０１６８】

さらなる実施形態では、（ｉ）少なくとも１つの逆電荷の変異と、（ｉｉ）少なくとも１つの改変された空洞または少なくとも１つの改変された突起とを含有するＦｃドメイン単量体を、（ｉ）少なくとも１つの逆電荷の変異と、（ｉｉ）少なくとも１つの改変された突起または少なくとも１つの改変された空洞とを含有する他のＦｃドメイン単量体と選択的に結合して、Ｆｃドメインを形成することができる。例えば、反転した電荷の変異Ｋ３７０Ｄと、改変された空洞Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖとを含有するＦｃドメイン単量体と、反転した電荷の変異Ｅ３５７Ｋと、改変された突起Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗとを含有する他のＦｃドメイン単量体とを選択的に結合して、Ｆｃドメインを形成する。

【０１６９】

こうしたＦｃドメインの形成は、C_H3抗体定常ドメイン内の適合するアミノ酸置換によって促される。C_H3－C_H3界面において、２つの二量体形成選択モジュールが適合しないアミノ酸置換を含有する場合、例えば、改変された空洞を両方が含有する、改変された突起を両方が含有する、または、同じ電荷をもつアミノ酸を両方が含有する場合は、ヘテロ二量体Ｆｃドメインの形成は促されない。

【０１７０】

ヘテロ二量体形成Ｆｃドメインの複数の対を使用して、複数の非対称分岐点、複数の非分岐点、または非対称分岐点および非分岐点の両方を有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を作ることができる。複数の異なるヘテロ二量体形成技術（例えば、表３および４を参照）が異なるＦｃドメインに組み込まれて、これらのＦｃドメイン含有構築体を組み立てる。ヘテロ二量体形成技術は、望ましくないＦｃ単量体の対形成に対して最小の会合（直交性）を有する。２つの異なるＦｃヘテロ二量体形成方法、例えば、ノブイントゥホール（表３）および静電的ステアリング（表４）を異なるＦｃドメインで使用して、所望の構築体へのポリペプチド鎖の組み立てを制御することができる。あるいは、ノブイントゥホールの２つの異なるバリアント（例えば、表３から選択される変異の２つの異なるセット）、または静電的ステアリングの２つの異なるバリアント（例えば、表４から選択される変異の２つの異なるセット）を異なるＦｃドメインで使用して、所望の構築体へのポリペプチド鎖の組み立てを制御することができる。非対称分岐は、異なるポリペプチド鎖、複

数のＦｃドメインを有するポリペプチド鎖上にヘテロ二量体形成ＦｃドメインのＦｃドメイン単量体を配置することにより作られ得る。非分岐点は、複数のＦｃドメインを有するポリペプチド鎖上にヘテロ二量体形成Ｆｃドメインの一方のＦｃドメイン単量体、および単一Ｆｃドメインを有するポリペプチド鎖上にヘテロ二量体形成Ｆｃドメインのもう一方のＦｃドメイン単量体を配置することにより作られ得る。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、直線状である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、分岐点を有しない。例えば、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、少なくとも２個のＦｃドメイン単量体が異なる（すなわち、異なるヘテロ二量体形成変異を有する）、２つ以上のＦｃドメイン単量体を有する１つの大きいペプチド、および各々が異なる単一Ｆｃドメイン単量体を有する２つ以上のより小さいペプチド（すなわち、異なるヘテロ二量体形成変異を有するＦｃドメイン単量体を有する２つ以上の小さいペプチド）から組み立てられ得る。本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、より小さい各ペプチドのＦｃドメイン単量体が、大きいペプチド上のその適合するＦｃドメイン単量体（複数可）と会合するように、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の適切な形成を促進するかまたは容易にする、互いに適合しない２つ以上の二量体形成選択モジュール、例えば、表３および／または４から選択される少なくとも２個の適合しない二量体形成選択モジュールを有することができる。いくつかの実施形態では、長いペプチド上の第１のＦｃドメイン単量体またはＦｃドメイン単量体の第１のサブセットは、第１の短いペプチドのＦｃドメイン単量体におけるアミノ酸置換により形成される第１の二量体形成選択モジュールの一部に適合する、第１の二量体形成選択モジュールの一部を形成するアミノ酸置換を含む。長いペプチド上の第２のＦｃドメイン単量体またはＦｃドメイン単量体の第２のサブセットは、第２の短いペプチドのＦｃドメイン単量体におけるアミノ酸置換により形成される第２の二量体形成選択モジュールの一部に適合する、第２の二量体形成選択モジュールの一部を形成するアミノ酸置換を含む。第１の二量体形成選択モジュールは、第１のＦｃドメイン単量体と第２の短いペプチドのＦｃドメイン単量体との間の結合を好まない一方で、第１の短いペプチドのＦｃドメイン単量体への長いペプチド上の第１のＦｃドメイン単量体（またはＦｃドメイン単量体の第１のサブセット）の結合を好む。同様に、第２の二量体形成選択モジュールは、第２のＦｃドメイン単量体と第１の短いペプチドのＦｃドメイン単量体との間の結合を好まない一方で、第２の短いペプチドのＦｃドメイン単量体への長いペプチド上の第２のＦｃドメイン単量体（またはＦｃドメイン単量体の第２のサブセット）の結合を好む。

【０１７２】

特定の実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、第１の二量体形成選択モジュールを有する第１のＦｃドメインと、第２の二量体形成選択モジュールを有する第２のＦｃドメインとを有することができる。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメインは、表３から選択される少なくとも１個の突起形成変異、および／または表４から選択される少なくとも１個の逆電荷変異を有する１個のＦｃ単量体（例えば、Ｆｃ単量体は、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異ならびにＥ３５７Ｋ逆電荷変異を有することができる）、ならびに表３から選択される少なくとも１個の空洞形成変異、および／または表４から選択される少なくとも１個の逆電荷変異を有する１個のＦｃ単量体（例えば、Ｆｃ単量体は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異、ならびにＫ３７０Ｄ逆電荷変異を有することができる）から組み立てられる。いくつかの実施形態では、第２のＦｃドメインは、表３から選択される少なくとも１個の突起形成変異、および／または表４から選択される少なくとも１個の逆電荷変異を有する１個のＦｃ単量体（例えば、Ｆｃ単量体は、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ逆電荷変異を有することができる）、ならびに表３から選択される少なくとも１個の空洞形成変異、および／または表４から選択される少なくとも１個の逆電荷変異を有する１個のＦｃ単量体（例えば、Ｆｃ単量体は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ逆電荷変異を有することができる）から組み立てられる

。

【０１７３】

さらに、画成されたＦｃドメイン単量体によるＦｃドメインの形成を促進するために用いる他の方法には、ヘテロ二量体の形成を可能にする、ロイシンジッパーの単量体α－ヘリックスのＦｃドメイン単量体それぞれに対するＣ末端融合を含むＬＵＺ－Ｙアプローチ（米国特許出願公開公報第ＷＯ２０１１０３４６０５号）のみならず、ＩｇＡおよびＩｇＧ C_H3配列の交互セグメントをそれぞれが含むヘテロ二量体のＦｃドメイン単量体によりＦｃドメインを生成する、ストランド交換改変ドメイン（ＳＥＥＤ（ｓｔｒａｎｄ－ｅｘｃｈａｎｇｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｄｏｍａｉｎ））体のアプローチ（Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．２３：１９５－２０２，２０１０）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７４】

Ｖ．改変された空洞および改変された突起

改変された空洞および改変された突起の使用（すなわち、「ノブイントゥホール（ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ）」ストラテジー）は、Ｃａｒｔｅｒおよびその協同研究者（Ｒｉｄｇｗａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．９：６１７－６１２，１９９６、Ａｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２７０：２６－３５，１９９７、Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：６７７－６８１，１９９８）によって記述されている。ノブとホールとの相互作用は、ヘテロ二量体形成を支持するが、一方、ノブ間およびホール間の相互作用は、立体的な不一致および好ましい相互作用の損失に起因してホモ二量体形成を妨げる。「ノブイントゥホール」技術は、米国特許第５，７３１，１６８号にも開示されている。

【０１７５】

本開示では、改変された空洞および改変された突起は、本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の調製に使用される。改変された空洞は、あるタンパク質中の本来のアミノ酸が、より低分子量の側鎖をもつ異なるアミノ酸で置換されたときに形成される空隙である。改変された突起は、あるタンパク質中の本来のアミノ酸が、より高分子量の側鎖をもつ異なるアミノ酸で置換されたときに形成される突起である。詳細には、置換されようとするアミノ酸は、Ｆｃドメイン単量体の C_H3抗体定常ドメイン内にあり、２つのＦｃドメイン単量体の二量体形成に関与する。いくつかの実施形態では、一方の C_H3抗体定常ドメイン内の改変された空洞は、もう一方の C_H3抗体定常ドメイン内の改変された突起を収納するように形成されるため、両 C_H3抗体定常ドメインが、２つのＦｃドメイン単量体の二量体形成を促進するまたは支持する二量体形成選択モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択モジュール）（上記に記載した）として機能する。他の実施形態では、一方の C_H3抗体定常ドメイン内の改変された空洞は、もう一方の C_H3抗体定常ドメイン内の本来のアミノ酸をより良好に収納するように形成されている。さらに他の実施形態では、一方の C_H3抗体定常ドメイン内の改変された突起は、もう一方の C_H3抗体定常ドメイン内の本来のアミノ酸とのさらなる相互作用を形成するように形成されている。

【０１７６】

改変された空洞は、チロシンまたはトリプトファン等のより長い側鎖を含有するアミノ酸を、アラニン、バリンまたはトレオニン等のより短い側鎖を含有するアミノ酸で置換することによって構築することが可能である。詳細には、一部の二量体形成選択モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択モジュール）（上記でさらに記載した）は、 C_H3抗体定常ドメイン内にＹ４０７Ｖ変異等の改変された空洞を含有する。同様に、改変された突起は、より短い側鎖を含有するアミノ酸を、より長い側鎖を含有するアミノ酸で置換することによって構築することが可能である。詳細には、一部の二量体形成選択モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択モジュール）（上記でさらに記載した）は、 C_H3抗体定常ドメイン内にＴ３６６Ｗ変異等の改変された突起を含有する。本開示では、改変された空洞および改変された突起はまた、ヘテロ二量体形成を促進する、 C_H3ドメイン間のジスルフィド結合改変と組み合わされる。一実施例では、改変された空洞Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３

６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖを含有するＦｃドメイン単量体は、改変された突起Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗを含有する他のＦｃドメイン単量体と選択的に結合して、Ｆｃドメインを形成することができる。別の実施例では、Ｙ３４９Ｃを追加することで改変された空洞を含有するＦｃドメイン単量体と、Ｓ３５４Ｃを追加することで改変された突起を含有するＦｃドメイン単量体が選択的に組み合わされて、Ｆｃドメインを形成してもよい。ジスルフィド結合改変または構造的計算のいずれかと組み合わせた（ＨＡ－ＴＦ混合）、他の改変された空洞および改変された突起を表３に示すが、これらに限定されない。

【０１７７】

（表３）Ｆｃヘテロ二量体形成方法（ノブイントゥホール）

方法	変異（鎖A） （Fcドメイン単量体1のCH3ドメイン）	変異（鎖B） （Fcドメイン単量体2のCH3ドメイン）	参照文献
ノブイントゥホール(Y-T)	Y407T	T336Y	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	Y407A	T336W	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	F405A	T394W	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	Y407T	T366Y	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	T394S	F405W	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	T394W, Y407T	T366Y, F406A	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	T394S, Y407A	T366W, F405W	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	T366W, T394S	F405W, T407A	US Pat. # 8,216,805
ノブイントゥホール	F405T	T394Y	
ノブイントゥホール	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
ノブイントゥホール(CW-CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Merchant et al., *Nat. Biotechnol.* 16(7):677-81, 1998
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952

注記：すべての残基はＥＵナンバリングスキームに従って番号付けされている（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，６３：７８－８５，１９６９）

【０１７８】

C_H3抗体定常ドメイン内の本来のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することは、本来のアミノ酸残基をコードする核酸を変更することによって達成することが可能である。置換することが可能である本来のアミノ酸残基の数の上限は、界面における十分な相互作用を維持したままにすることを考えれば、C_H3抗体定常ドメインの界面における残基の総数である。

【０１７９】

改変された空洞と改変された突起を、静電的ステアリングを用いて組み合わせる

静電的ステアリングを、ノブ－イン－ホール（ｋｎｏｂ－ｉｎ－ｈｏｌｅ）技術と組み合わせて、例えば、２つの異なるポリペプチド中のＦｃドメイン単量体間でのヘテロ二量

体形成を有利にすることができる。以下にさらに詳細に記載するが、静電的ステアリングは、より高次のタンパク質分子の形成を制御する、ペプチド、タンパク質ドメインおよびタンパク質内の反対の電荷をもつアミノ酸間の有益な静電的相互作用の利用である。静電的ステアリングを使用して、ホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成のいずれかを促進することができ、後者の場合にはノブ－イン－ホール技術と組み合わせることが有益な場合がある。ヘテロ二量体形成の場合、異なっているが、適合性のある変異を、ヘテロ二量体形成されるＦｃドメイン単量体の各々に導入する。ゆえに、Ｆｃドメイン単量体を改変して、以下の正電荷をもつアミノ酸置換、および負電荷をもつアミノ酸置換のうちの１つを含ませることができる：Ｄ３５６Ｋ、Ｄ３５６Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４３９ＤおよびＫ４３９Ｅ。例えば、１つのＦｃドメイン単量体、例えば、空洞（Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖ）を有するＦｃドメイン単量体も、Ｋ３７０Ｄ変異を含むことができ、そして他のＦｃドメイン単量体、例えば突起（Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ）を有するＦｃドメイン単量体もＥ３５７Ｋを含むことができる。

【０１８０】

より一般的には、以下の空洞変異のいずれか（または変異の組み合わせ）：Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ｔ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ：Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ：Ｌ３６８Ａ：Ｙ４０７Ｖ：Ｙ３４９Ｃ、およびＳ３３６４Ｈ：Ｆ４０５を、表４の変異と組み合わせることができる。そして以下の突起変異のいずれか（または変異の組み合わせ）：Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｆ４０５Ｗ、Ｔ３６６Ｙ：Ｆ４０５Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｓ３５４Ｃ、およびＹ３４９Ｔ：Ｔ３９４Ｆを、表４の変異と組み合わせることができ、これを空洞変異（または変異の組み合わせ）と組み合わせて使用される表４の変異と対形成させる。

【０１８１】

より一般的には、以下の空洞変異のいずれか（または変異の組み合わせ）：Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ｔ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ：Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ：Ｌ３６８Ａ：Ｙ４０７Ｖ：Ｙ３４９Ｃ、およびＳ３３６４Ｈ：Ｆ４０５は、表３の静電ステアリング変異と組み合わせることができ、以下の突起変異のうちのいずれか（または変異の組み合わせ）：Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｆ４０５Ｗ、Ｔ３６６Ｙ：Ｆ４０５Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ：Ｓ３５４Ｃ、およびＹ３４９Ｔ：Ｔ３９４Ｆは、表３の静電ステアリング変異と組み合わせることができる。

【０１８２】

ＶＩ．静電的ステアリング

静電的ステアリングは、より高次のタンパク質分子の形成を制御する、ペプチド、タンパク質ドメインおよびタンパク質内の反対の電荷をもつアミノ酸間の好ましい静電的相互作用の利用である。静電的ステアリングの効果を用いて、二重特異性抗体の生成の際のヘテロ二量体形成に有利に、ホモ二量体の形成を低減するように抗体ドメインの相互作用を変える方法が、米国特許出願公開公報第２０１４－００２４１１１号に開示されている。

【０１８３】

本開示では、静電的ステアリングを用いて、Ｆｃドメイン単量体の二量体形成およびＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の形成を制御する。特に、静電的ステアリングを用いてＦｃドメイン単量体の二量体形成を制御することは、C_H3－C_H3界面を形成する１つ以上のアミノ酸残基が、正電荷をもつかまたは負電荷をもつアミノ酸残基で置換されるため、導入された特定の電荷をもつアミノ酸に応じて、相互作用は静電的に好ましくなるかまたは好ましくないものとなる。いくつかの実施形態では、リシン、アルギニンまたはヒスチジン等、界面の正電荷をもつアミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸等の負電荷をもつアミノ酸で置換される。他の実施形態では、界面の負電荷をもつアミノ酸が、正電荷をもつアミノ酸で置換される。電荷をもつアミノ酸は、相互作用するC_H3抗体定常ドメインの一方または両方に導入され得る。相互作用するC_H3抗体定常ドメインに電荷を

もつアミノ酸を導入することによって、二量体形成選択モジュール（上記においてさらに説明した）が形成されるが、それは電荷をもつアミノ酸間の相互作用の結果としての静電的ステアリング効果で制御されるとおりに、Ｆｃドメイン単量体の二量体を選択的に形成することが可能である。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、静電的ステアリング効果で制御されるとおりにＦｃドメイン単量体の二量体を選択的に形成することが可能である、反転した電荷を含む二量体形成選択モジュールを形成するために、２つのＦｃドメイン単量体は、ヘテロ二量体形成またはホモ二量体形成を経て選択的に形成され得る。

【０１８５】

Ｆｃドメイン単量体のヘテロ二量体形成

Ｆｃドメイン単量体のヘテロ二量体形成は、限定するものではないが表４に含むような電荷残基対などである、２つのＦｃドメイン単量体内に異なるものであるが適合する変異を導入することによって促進することが可能である。いくつかの実施形態では、Ｆｃドメイン単量体は、以下の正電荷をもつアミノ酸置換および負電荷をもつアミノ酸置換のうちの１つ以上を含み得る：Ｄ３５６Ｋ、Ｄ３５６Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、およびＫ４３９Ｅ、例えば、Ｄ３５６Ｋ、Ｄ３５６Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、およびＫ４３９Ｅのうちの１、２、３、４、または５つ以上。一実施例では、正電荷をもつアミノ酸置換、例えばＤ３５６ＫまたはＥ３５７Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、負電荷をもつアミノ酸置換、例えばＫ３７０ＤまたはＫ３７０Ｅを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。別の実施例では、Ｅ３５７Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、Ｋ３７０Ｄを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。別の実施例では、Ｅ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋを含有するＦｃドメイン単量体と、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄを含有するＦｃドメイン単量体とが選択的に結合して、電荷をもつアミノ酸の好ましい静電的ステアリングを経てＦｃドメインを形成する。

【０１８６】

「ヘテロ二量体Ｆｃドメイン」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体のヘテロ二量体形成によって形成されるＦｃドメインを指すものであって、該２つのＦｃドメイン単量体は、これら２つのＦｃドメイン単量体の好ましい形成を促進する異なる逆電荷の変異（ヘテロ二量体形成選択モジュール）（例えば、表４の変異を参照）を含有する。一例において、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体では、３つのうち２つのＦｃドメインは、静電的ステアリング効果によって促進されるように、２つのＦｃドメイン単量体のヘテロ二量体形成によって形成され得る。

【０１８７】

（表４）Ｆｃヘテロ二量体形成方法（静電的ステアリング）

方法	変異（鎖A） （Fcドメイン単量体1のCH3ドメイン）	変異（鎖B） （Fcドメイン単量体2のCH3ドメイン）	参照文献
静電的ステアリング	K409D	D399K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K409D	D399R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K409E	D399K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K409E	D399R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K392D	D399K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K392D	D399R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K392E	D399K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K392E	D399R	US 2014/0024111
静電的ステアリング(DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010
静電的ステアリング	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	WO 2006/106905
ノブイントゥホール+静電的ステアリング	S354C, E357K, T366W	Y349C, T366S, L368A, K370D, Y407V	WO 2015/168643
静電的ステアリング	K370D	E357K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370D	E357R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370E	E357K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370E	E357R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370D	D356K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370D	D356R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370E	D356K	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370E	D356R	US 2014/0024111
静電的ステアリング	K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K	US 2014/0024111

注記：すべての残基はＥＵナンバリングスキームに従って番号付けされている（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，６３：７８－８５，１９６９）

【０１８８】

Ｆｃドメイン単量体のホモ二量体形成

Ｆｃドメイン単量体のホモ二量体形成は、対称的であるように両Ｆｃドメイン単量体内に、同一の静電的ステアリング変異（ホモ二量体形成選択モジュール）を導入することによって、促進することが可能である。いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体が、C_H3ドメイン間の界面における電荷をもつ残基の環内の少なくとも２つの位置では、同一の逆電荷の変異を含有するホモ二量体形成選択モジュールを含む。２つのＦｃドメイン単量体内の残基の２以上の相補的な対の両要素の電荷が反転していることによって

、変異したＦｃドメイン単量体は同じ変異の配列のＦｃドメイン単量体に対して相補性を維持するが、こうした変異なしではＦｃドメイン単量体に対する相補性はより小さい。Ｆｃドメイン単量体に導入されて、そのホモ二量体形成を促進し得る静電的ステアリング変異を、表５および６に示しているが、これらに限定されない。一実施形態では、Ｆｃドメインは、例えばＫ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋである二重の逆電荷の変異体（表５）をそれぞれ含む、２つのＦｃドメイン単量体を含む。別の実施形態では、Ｆｃドメインは、例えばＫ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋ／Ｋ３７０Ｄ／Ｅ３５７Ｋである四重の逆電荷の変異体（表６）をそれぞれ含む、２つのＦｃドメイン単量体を含む。

【０１８９】

例えば、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体において、３つのうち１つのＦｃドメインは、静電的ステアリング効果により促進される場合、２つのＦｃドメイン単量体のホモ二量体形成によって形成され得る。「ホモ二量体Ｆｃドメイン」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体のホモ二量体形成によって形成されるＦｃドメインを指すものであって、当該２つのＦｃドメイン単量体は、同一の逆電荷の変異（例えば、表５および６の変異を参照）を含有する。３つのＦｃドメイン、すなわち１つのカルボキシル末端の「幹」Ｆｃドメインと、２つのアミノ末端の「枝」Ｆｃドメインとを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体において、カルボキシ末端の「幹」Ｆｃドメインは、ホモ二量体のＦｃドメイン（「幹ホモ二量体Ｆｃドメイン」とも称される）となり得る。幹ホモ二量体Ｆｃドメインは、二重変異体Ｋ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋをそれぞれ含有する２つのＦｃドメイン単量体によって形成され得る。

【０１９０】

（表５）Ｆｃホモ二量体化方法

方法	変異（鎖AおよびB） (Fcドメイン単量体1および2の CH3ドメイン)	参照文献
野生型	なし	
静電的ステアリング (KD)	D399K, K409D	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	D399K, K409E	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	E357K, K370D	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	E357K, K370E	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	D356K, K439D	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	D356K, K439E	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	K392D, D399K	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	K392E, D399K	Gunasekaran et al., *J Biol Chem.* 285: 19637-46, 2010, WO 2015/168643
静電的ステアリング	D399R, K409D	
静電的ステアリング	D399R, K409E	
静電的ステアリング	D399R, K392D	
静電的ステアリング	D399R, K392E	
静電的ステアリング	E357K, K370D	
静電的ステアリング	E357R, K370D	
静電的ステアリング	E357K, K370E	
静電的ステアリング	E357R, K370E	
静電的ステアリング	D356K, K370D	
静電的ステアリング	D356R, K370D	
静電的ステアリング	D356K, K370E	
静電的ステアリング	D356R, K370E	

注記：すべての残基はＥＵナンバリングスキームに従って番号付けされている（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，６３：７８－８５，１９６９）

【０１９１】

（表６）Ｆｃホモ二量体化変異－４個の逆電荷

ホモ二量体Fcドメイン内の2個のFcドメイン単量体の各々のC_H3定常ドメインにおける逆電荷変異	ホモ二量体Fcドメイン内の2個のFcドメイン単量体の各々のC_H3ドメインにおける逆電荷変異
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R

ホモ二量体Fcドメイン内の2個のFcドメイン単量体の各々のC_H3定常ドメインにおける逆電荷変異	ホモ二量体Fcドメイン内の2個のFcドメイン単量体の各々のC_H3ドメインにおける逆電荷変異
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R
K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

注記：すべての残基はＥＵナンバリングスキームに従って番号付けされている（Ｅｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，６３：７８－８５，１９６９）

【０１９２】

他のヘテロ二量体形成方法

多くの他のヘテロ二量体形成技術が記載されている。これらの技術のうちの任意の１つ以上（表７）が、本明細書に記載される任意のノブイントゥホールおよび／または静電的ステアリングヘテロ二量体形成および／またはホモ二量体形成技術と組み合わされて、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を作製することができる。

【０１９３】

（表７）他のＦｃヘテロ二量体形成方法

方法	変異（鎖A）	変異（鎖B）	参照文献
ZW1 (VYAV-VLLW)	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein et al, MAbs, 5:646-54, 2013
IgG1ヒンジ/CH3電荷対 (EEE-RRR)	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop et al, J Mol Biol, 420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi et al, Mol Cancer Ther, 12:2748-59, 2013
EW-RVT$_{S-S}$	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi et al, Mol Immunol, 65:377-83, 2015
電荷導入 (DK Biclonic)	L351D	T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
電荷導入 (DEKK Biclonic)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, J Biol Chem, 292:14706-17, 2017
DuoBody (L-R)	F405L	K409R	Labrijn et al, Proc Natl Acad Sci USA, 110:5145-50, 2013
SEEDbody	IgG/A キメラ	IgG/A キメラ	Davis et al, Protein Eng Des Sel, 23:195-202, 2010
BEAT (A/B)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B min)	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B + Q)	Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
BEAT (A/B – T)	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R	Skegro et al, J Biol Chem, 292:9745-59, 2017
7.8.60 (DMA-RRVV)	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
20.8.34 (SYMV-GDQA)	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016

注記：すべての残基はＥＵナンバリングスキームに従って番号付けされている（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，６３：７８－８５，１９６９）

【０１９４】

ＶＩＩ．リンカー

本開示では、ポリペプチドまたはタンパク質ドメインおよび／または会合する非タンパク質部分間における結合または接続を説明するために、リンカーを用いる。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも２つのＦｃドメイン単量体間の結合または接続であり、それに対してリンカーが、第１のＦｃドメイン単量体のＣ$_{H}$３抗体定常ドメインのＣ

末端を、第２のＦｃドメイン単量体のヒンジドメインのＮ末端に対して、２つのＦｃドメイン単量体が互いに直列に連結するように接続するものである。他の実施形態では、リンカーは、Ｆｃドメイン単量体とそれに付加されるその他のタンパク質ドメインとの間の結合である。例えばリンカーは、Ｆｃドメイン単量体のＣ$_{H}$３抗体定常ドメインのＣ末端を、アルブミン結合ペプチドのＮ末端に付加させることが可能である。

【０１９５】

リンカーは、例えばペプチド結合である単純な共有結合、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーである合成ポリマー、または、例えば化学的複合体化である化学反応で形成した任意の種類の結合とすることが可能である。リンカーがペプチド結合である場合は、一方のタンパク質ドメインのＣ末端におけるカルボン酸基が、縮合反応でもう一方のタンパク質ドメインのＮ末端におけるアミノ酸と反応して、ペプチド結合を形成することが可能である。詳細には、ペプチド結合は、この技術分野で周知の従来の有機化学反応を経る合成手段により、または、宿主細胞からの自然な産生により形成することが可能であるものであって、例えば２つのＦｃドメイン単量体である、直列にしたタンパク質両方のＤＮＡ配列をコードするポリヌクレオチド配列を、宿主細胞内の、例えばＤＮＡポリメラーゼおよびリボソームである、必要な分子機械（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｍａｃｈｉｎｅｒｙ）によって両方のタンパク質をコードする隣接し合うポリペプチドへと直接転写または翻訳されることが可能である。

【０１９６】

リンカーが合成ポリマー、例えばＰＥＧポリマーである場合においては、該ポリマーは、各端部が反応性の化学官能基で官能化されて、２つのタンパク質の接続端にある末端アミノ酸と反応することが可能である。

【０１９７】

リンカー（上記に示したペプチド結合は除く）が化学反応により形成される場合においては、例えばアミン、カルボン酸、エステル、アジドまたはこの技術分野で通常用いられる他の官能基である化学官能基が、一方のタンパク質のＣ末端と、もう一方のタンパク質のＮ末端とのそれぞれに対して合成的に付加することが可能である。この２つの官能基はその後、合成化学手段を経て反応して化学結合を形成することによって、２つのタンパク質をひとつに接続することが可能である。こうした化学的複合体化の手順は、当業者にとってルーチンである。

【０１９８】

スペーサー

本開示では、２つのＦｃドメイン単量体間のリンカーは、３～２００のアミノ酸（例えば、３～２００、３～１８０、３～１６０、３～１４０、３～１２０、３～１００、３～９０、３～８０、３～７０、３～６０、３～５０、３～４５、３～４０、３～３５、３～３０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～２００、５～２００、６～２００、７～２００、８～２００、９～２００、１０～２００、１５～２００、２０～２００、２５～２００、３０～２００、３５～２００、４０～２００、４５～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００または１８０～２００のアミノ酸）を含むアミノ酸スペーサーとすることが可能である。いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のリンカーは、少なくとも１２のアミノ酸、例えば、１２～２００のアミノ酸（例えば、１２～２００、１２～１８０、１２～１６０、１２～１４０、１２～１２０、１２～１００、１２～９０、１２～８０、１２～７０、１２～６０、１２～５０、１２～４０、１２～３０、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１２～１７、１２～１６、１２～１５、１２～１４または１２～１３のアミノ酸）（例えば、１４～２００、１６～２００、１８～２００、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２００または１９０～２００のアミノ酸）を含有するアミノ酸スペーサー

である。いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のリンカーは、１２～３０のアミノ酸（例えば、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０のアミノ酸）を含有するアミノ酸スペーサーである。好適なペプチドスペーサーはこの分野において公知であり、例えば、グリシンおよびセリン等のフレキシブルなアミノ酸残基を含有するペプチドリンカーを含む。ある実施形態では、スペーサーは、例えば
GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO: 1), GGSG (SEQ ID NO: 2), または SGGG (SEQ ID NO: 3)
の、複数のモチーフまたは繰り返しモチーフであるモチーフを含有することが可能である。ある実施形態では、スペーサーは、
例えば,
GS, GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (SEQ ID NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7), または GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8)

である、ＧＳのモチーフを含む２～１２のアミノ酸を含有することが可能である。他のある実施形態では、スペーサーは、
例えば, GGS, GGSGGS (SEQ ID NO: 9),
GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 10), および GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11)
である、ＧＧＳのモチーフを含む３～１２のアミノ酸を含有することが可能である。さらに他の実施形態では、スペーサーは、
例えば, GGSGGGSG
(SEQ ID NO: 12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14), または GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 15)

である、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）のモチーフを含む４～２０のアミノ酸を含有することが可能である。他の実施形態では、スペーサーは、
例えば, GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16) または GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17)
である、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）のモチーフを含有することが可能である。ある実施形態では、スペーサーは、
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)
である。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、グリシン残基のみを含有し、例えば、少なくとも４つのグリシン残基（例えば、４～２００、４～１８０、４～１６０、４～１４０、４～４０、４～１００、４～９０、４～８０、４～７０、４～６０、４～５０、４～４０、４～３０、４～２０、４～１９、４～１８、４～１７、４～１６、４～１５、４～１４、４～１３、４～１２、４～１１、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６または４～５のグリシン残基）（例えば、４～２００、６～２００、８～２００、１０～２００、１２～２００、１４～２００、１６～２００、１８～２００、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２００、または１９０～２００のグリシン残基）を含有する。ある実施形態では、スペーサーは、４～３０のグリシン残基（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０のグリシン残基）を有する。いくつかの実施形態では、グリシン残基のみを含有するスペーサーは、グリコシル化（例えば、Ｏ－結合型グリコシル化、Ｏ－グリコシル化とも称する）されていないものであり得るか、または、例えば、１つ以上のセリン残基を含有するスペーサー
(例えば, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18))
と比較して、低減されたレベルのグリコシル化（例えば、低減されたレベルのＯ－グリコシル化）（例えば、キシロース、マンノース、シアル酸、フコース（Ｆｕｃ）および／ま

たはガラクトース（Ｇａｌ）等のグリカン（例えば、キシロース）による低減したレベルのＯ－グリコシル化）を有し得る。

【０２００】

いくつかの実施形態では、グリシン残基のみを含有するスペーサーは、Ｏ－グリコシル化（例えば、Ｏ－キシロシル化）されていないものであり得るか、または、例えば、１つ以上のセリン残基を含有するスペーサー
(例えば, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18))
と比較して、低減されたレベルのＯ－グリコシル化（例えば、低減されたレベルのＯ－キシロシル化）を有し得る。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、グリシン残基のみを含有するスペーサーは、タンパク質分解を受けないものであり得るか、または、例えば、１つ以上のセリン残基を含有するスペーサー
(例えば, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18))
と比較して、低減されたタンパク質分解速度を有し得る。

【０２０２】

ある実施形態では、スペーサーは、
例えば,
GGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22), または GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23)
である、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）のモチーフを含有することが可能である。ある実施形態では、スペーサーは、
例えば, GGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 25), または GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26)
である、ＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４）のモチーフを含有することが可能である。ある実施形態では、スペーサーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)
である。

【０２０３】

他の実施形態では、スペーサーはまた、グリシンおよびセリン以外のアミノ酸を含有すること、例えば
GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33), または
GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO: 34)
を含有することも可能である。

【０２０４】

本開示におけるある実施形態では、１２アミノ酸ペプチドスペーサーまたは２０アミノ酸ペプチドスペーサーを用いて、２つのＦｃドメイン単量体、それぞれ配列
GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 35) および SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)
からなる１２アミノ酸ペプチドスペーサーおよび２０アミノ酸ペプチドスペーサーが直列に接続される。他の実施形態では、配列
GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 36)
からなる１８アミノ酸ペプチドスペーサーを用いることができる。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、上述のＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～３６のいずれか１つの配列に対して少なくとも７５％同一（例えば、少なくとも７７％、７９％、８１％、８３％、８５％、８７％、８９％、９１％、９３％、９５％、９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有し得る。特定の実施

形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７、１８、２６、および２７のいずれか１つの配列に対して少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８２％、８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９７％、９９％、または９９．５％同一）である配列を有し得る。特定の実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８または２７の配列に対して少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８２％、８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９７％、９９％、または９９．５％）である配列を有し得る。

【０２０６】

特定の実施形態では、Ｆｃドメイン単量体のヒンジのアミノ末端と、同じポリペプチド内にあるＦｃ単量体のカルボキシ末端との間のリンカー（すなわち、リンカーは、第１のＦｃドメイン単量体のＣＨ３抗体定常ドメインのＣ末端を、第２のＦｃドメイン単量体のヒンジドメインのＮ末端に接続し、これにより、２個のＦｃドメイン単量体は、互いに直列に結合される）は、共有結合ではなく３つ以上のアミノ酸（例えば、３～２００個のアミノ酸（例えば、３～２００、３～１８０、３～１６０、３～１４０、３～１２０、３～１００、３～９０、３～８０、３～７０、３～６０、３～５０、３～４５、３～４０、３～３５、３～３０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～２００、５～２００、６～２００、７～２００、８～２００、９～２００、１０～２００、１５～２００、２０～２００、２５～２００、３０～２００、３５～２００、４０～２００、４５～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、もしくは１８０～２００個のアミノ酸）を有するスペーサー、または１２～２００個のアミノ酸（例えば、１２～２００、１２～１８０、１２～１６０、１２～１４０、１２～１２０、１２～１００、１２～９０、１２～８０、１２～７０、１２～６０、１２～５０、１２～４０、１２～３０、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１２～１７、１２～１６、１２～１５、１２～１４、もしくは１２～１３個のアミノ酸）など、少なくとも１２個のアミノ酸（例えば、１４～２００、１６～２００、１８～２００、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２００、もしくは１９０～２００個のアミノ酸））を含有するアミノ酸スペーサーである。

【０２０７】

スペーサーはまた、Ｆｃドメイン単量体のヒンジドメインのＮ末端と、ＣＤ３８結合ドメイン（例えば、ＣＤ３８重鎖結合ドメインのＣＨ１ドメインまたはＣＤ３８軽鎖結合ドメインのＣＬドメイン）のカルボキシ末端との間に存在してもよく、これにより、ドメインは、３つ以上のアミノ酸（例えば、３～２００個のアミノ酸（例えば、３～２００、３～１８０、３～１６０、３～１４０、３～１２０、３～１００、３～９０、３～８０、３～７０、３～６０、３～５０、３～４５、３～４０、３～３５、３～３０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～２００、５～２００、６～２００、７～２００、８～２００、９～２００、１０～２００、１５～２００、２０～２００、２５～２００、３０～２００、３５～２００、４０～２００、４５～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、もしくは１８０～２００個のアミノ酸）のスペーサー、または１２～２００個のアミノ酸（例えば、１２～２００、１２～１８０、１２～１６０、１２～１４０、１２～１２０、１２～１００、１２～９０、１２～８０、１２～７０、１２～６０、１２～５０、１２～４０、１２～３０、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１２～１７、１２～１６、１２～１５、１２～１４、もしくは１２～１３個のアミノ酸）など、少なくとも１２個のアミノ酸（例えば、１４～２００、１６～２００、１８～２００、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２０

０、もしくは１９０～２００個のアミノ酸））を含有するアミノ酸スペーサーによって結合される。

【０２０８】

ＶＩＩ．血清タンパク質結合ペプチド

血清タンパク質をペプチドに結合することで、タンパク質薬剤の薬物動態を向上させることが可能であり、特にここに記載するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、血清タンパク質結合ペプチドと融合し得る。

【０２０９】

一例として、ここに記載の方法および組成物に用いることが可能であるアルブミン結合ペプチドは、概して、この技術分野において公知である。一実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、配列ＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７）を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７の配列と、少なくとも８０％同一（例えば、８０％、９０％または１００％同一）である配列を有する。

【０２１０】

本開示では、アルブミン結合ペプチドは、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体内の特定のポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に付加され得る。一実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、抗原結合ドメインを含有するＦｃ構築体中の１つ以上のポリペプチドのＣ末端に付加され得る。別の実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、抗原結合ドメインを含有するＦｃ構築体中で直列に連続して連結された２つのＦｃドメイン単量体をコードするポリペプチドのＣ末端に融合されることが可能である。さらに別の実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、直列に接続した２つのＦｃドメイン単量体をコードするポリペプチド内の第２のＦｃドメイン単量体と連結するＦｃドメイン単量体Ｃ末端（例えば、図１のＦｃドメイン単量体１１４および１１６、図２のＦｃドメイン単量体２１４および２１６）に付加することが可能である。アルブミン結合ペプチドは、例えば化学的複合体化である化学的手段を介して、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体と遺伝的に融合、または、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に付加されることが可能である。所望であれば、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体とアルブミン結合ペプチドとの間にスペーサーを挿入することが可能である。学説には拘束されないが、本開示のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体中にアルブミン結合ペプチドが含まれることで、血清アルブミンと治療用タンパク質との結合を介して、治療用タンパク質の滞留延長がもたらされ得ることが期待される。

【０２１１】

ＶＩＩＩ．Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体

概して、本開示は、２～１０個のＦｃドメインと、１個以上の抗原結合ドメインが付加されたＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を特徴とする。これらは、Ｆｃ受容体の１つの野生型Ｆｃドメイン（例えばＦｃγＲＩＩＩａ）よりも高い結合アフィニティーおよび／またはアビディティを有し得る。この開示は、Ｆｃドメインの２つのＦｃドメイン単量体が互いと二量体を選択的に形成して、それによって望まない多量体または凝集の形成を回避するように、相互作用する２つのC_H3抗体定常ドメインの界面においてアミノ酸を改変する方法を開示する。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、偶数のＦｃドメイン単量体を含み、Ｆｃドメイン単量体の各対がＦｃドメインを形成する。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は最小で２つの機能性Ｆｃドメインと１つの抗原結合ドメインを含み、Ｆｃドメインは、４つのＦｃドメイン単量体の二量体から形成される。抗原結合ドメインは、例えばリンカー、スペーサー、ペプチド結合、化学結合または化学的部分で、Ｆｃドメインに結合され得る。いくつかの実施形態では、本開示は、Ｆｃドメインの２個のｃドメイン単量体の第１の対が、互いと二量体を選択的に形成し、Ｆｃドメインの２個のｃドメイン単量体の第２の対が、互いと二量体を選択的に形成し、したがって、望ましくない多量体または凝集の形成を回避するように、２個の相互作用するＣＨ３抗体定常ドメインの第１の対の界面において、表３および４から選択されるアミノ酸置換の１つのセットを改変し、かつ２個の相互作用するＣＨ３抗体定常ドメインの第２の対の界面において、アミノ酸置換の第１

のセットとは異なる、表３および４から選択されるアミノ酸置換の第２のセットを改変する方法に関する。

【０２１２】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、多くの方法で組み立てることができる。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、非対称に直列したＦｃドメインから組み立てることができる。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、単独分岐したＦｃドメインから組み立てることができ、この分岐点は、Ｎ末端Ｆｃドメインである。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、単独分岐したＦｃドメインから組み立てることができ、この分岐点は、Ｃ末端Ｆｃドメインである。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、単独分岐したＦｃドメインから組み立てることができ、この分岐点は、Ｎ末端ＦｃドメインでもＣ末端Ｆｃドメインでもない。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を、異なる抗原結合ドメイン配列を有する長鎖と短鎖を使用して組み立てて、二特異性構築体を形成させることができる。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を、異なるヘテロ二量体形成変異のセットと、異なる抗原結合ドメイン配列を有する鎖を使用して組み立てて、二特異性および三特異性の構築体を形成させることができる。二重特異性Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、２個の異なる抗原結合ドメインを含む。三特異性抗原結合ドメイン構築体は、３つの異なる抗原結合ドメインを含む。

【０２１３】

抗原結合ドメインは、多くの方法でＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合されることができる。抗原結合ドメインは、Ｆｃ鎖の融合タンパク質として発現されることができる。抗原結合ドメインの重鎖構成要素は、Ｆｃ鎖の融合タンパク質として発現され得、軽鎖構成要素は、別個のポリペプチドとして発現され得る（図１６Ａ）。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、抗原結合ドメインとして使用される。ｓｃＦｖは、長鎖Ｆｃの融合タンパク質として発現され得る（図１６Ｂ）。いくつかの実施形態では、長鎖構成要素と軽鎖構成要素は、別個に発現され、そしてＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に外因的に付加される。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、別個に発現され、後に化学結合を用いてＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合される（図１６Ｃ）。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体中の１つ以上のＦｃポリペプチドは、Ｃ末端リシン残基を欠く。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体中のすべてのＦｃポリペプチドは、Ｃ末端リシン残基を欠く。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体中の１つ以上のＦｃポリペプチドのＣ末端リシンの非存在は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えば、３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）の群の均質性を向上させ得る。例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％の均質性を有する３つのＦｃドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の群。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体中のＮ末端Ａｓｐは、Ｇｌｎに変異される。

【０２１６】

本明細書の実施例に記載される例示的なＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に関し、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体１～２８は、それぞれ、ノブアンドホールサブユニットにおいて、Ｅ３５７ＫおよびＫ３７０Ｄの電荷対を含み得る。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体２９～４２は、Ｅ３５７ＫとＫ３７０Ｄの対が含有され得る直交性の静電的ステアリング変異を使用することができ、そして追加のステアリング変異を含む場合もある。直交性のノブアンドホール（ｋｎｏｂｓ　ａｎｄ　ｈｏｌｅｓ）を有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体２９～４２について、静電的ステアリング変異は、１つを除くすべての直交性の対に必要であり、そしてすべての直交性の対に含まれ得る。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、２つの直交性のノブアンドホールが必要とされる場合、ノブ１に対する静電的ステアリング変異はＥ３５７Ｋであってもよく、ホール１に対する静電

的ステアリング変異はＫ３７０Ｄであってもよく、そしてノブ２に対する静電的ステアリング変異はＫ３７０Ｄであってもよく、ホール２に対する静電的ステアリング変異は、Ｅ３５７Ｋであってもよい。第３の直交性のノブアンドホールが必要な場合（例えば三特異性抗体）、静電的ステアリング変異のＥ３５７ＫとＤ３９９Ｋがノブ３に付加されて、静電的ステアリング変異のＫ３７０ＤとＫ４０９Ｄがホール３に付加されてもよく、または静電的ステアリング変異のＫ３７０ＤとＫ４０９Ｄがノブ３に付加されて、静電的ステアリング変異のＥ３５７ＫとＤ３９９Ｋがホール３に付加されてもよい。

【０２１８】

本明細書に記載される例示的Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えばＦｃ－抗原結合ドメイン構築体１～４２）のいずれか１つは、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、１つのＦｃドメインと抗原結合ドメインを有する構築体と比較して、エフェクター機能を増強することができ、または１つのＦｃドメインと抗原結合ドメインを有する構築体には呈されない生物活性を含むことができる。

【０２１９】

ＩＸ．宿主細胞およびタンパク質の産生

本開示では、宿主細胞は、本明細書に記載のポリペプチドまたは構築体を、それらの対応する核酸から発現するのに必要であるような、例えばオルガネラである、必要な細胞成分を含む担体を指す。核酸は、この技術分野で公知の従来の技術（形質転換、トランスフェクション、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、直接の微量注入等）によって宿主細胞内に導入されることが可能である核酸ベクター中に含まれ得る。宿主細胞は、哺乳動物起源、細菌起源、真菌起源または虫起源のものとすることが可能である。哺乳動物宿主細胞には、ＣＨＯ（またはＣＨＯ誘導細胞株、例えばＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＸＢ１１ ＣＨＯ－ＤＧ４４）、マウス宿主細胞（例えば、ＮＳ０、Ｓｐ２／０）、ＶＥＲＹ、ＨＥＫ（例えば、ＨＥＫ２９３）、ＢＨＫ、ＨｅＬａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３、３Ｔ３、Ｗ１３８、ＢＴ４８３、Ｈｓ５７８Ｔ、ＨＴＢ２、ＢＴ２０およびＴ４７Ｄ、ＣＲＬ７Ｏ３ＯならびにＨｓＳ７８Ｂｓｔの細胞が含まれるが、これらに限定されない。また、タンパク質構築体の発現を調節する、または所望の特定の手法でタンパク質産物を修飾およびプロセシングする、宿主細胞を選択することが可能である。様々な宿主細胞が、タンパク質産物の翻訳後プロセシングおよび修飾に関する特性および特異的な機序を有する。適切な株化細胞または宿主系を選択して、発現されたタンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確実にすることが可能である。

【０２２０】

タンパク質産物の、それらの対応するＤＮＡプラスミド構築体からの発現および分泌のために、宿主細胞が、プロモータ、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位および選択可能な標識を含む、この技術分野で公知である適切な発現制御要素によって制御されるＤＮＡで、トランスフェクトまたは形質転換され得る。治療用タンパク質の発現方法は、この技術分野で公知である。例えば、Ｐａｕｌｉｎａ Ｂａｌｂａｓ，Ａｒｇｅｌｉａ Ｌｏｒｅｎｃｅ（ｅｄｓ．）Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ｒｅｖｉｅｗｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；２ｎｄ ｅｄ．２００４ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｊｕｌｙ ２０，２００４）、Ｖｌａｄｉｍｉｒ Ｖｏｙｎｏｖ ａｎｄ Ｊｕｓｔｉｎ Ａ．Ｃａｒａｖｅｌｌａ（ｅｄｓ．）Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；２ｎｄ ｅｄ．２０１２ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｊｕｎｅ ２８，２０１２）を参照されたい。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、例えば、細胞培養上清中で、Ｆｃ構築体に組み立てられるポリペプチドをコードするＤＮＡプラスミド構築体でトランスフェクトされた宿主細胞により産生されたＦｃ－抗原結合ドメイン構築体のうちの少なくとも５０％が、（モル基準で

）構造的に同一であり、例えば、Ｆｃ構築体の５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、１００％が構造的に同一である。

【０２２２】

Ｘ．脱フコシル化

各Ｆｃ単量体は、Ａｓｎ　２９７においてＮグリコシル化部位を含む。グリカンは、所与のＦｃ単量体上で多数の異なる形態において存在し得る。本明細書に記載される抗体または抗原結合Ｆｃ構築体を含有する組成物において、グリカンは、非常に異種であり得、存在するグリカンの性質は、数ある中でも、抗体または抗原結合Ｆｃ構築体を産生するために使用される細胞の種類、細胞の増殖条件（増殖培地を含む）、および産生後の精製によって決まり得る。種々の場合において、本明細書に記載される構築体を含有する組成物は、少なくともある程度まで脱フコシル化される。例えば、組成物中に存在するグリカン（例えば、Ｆｃグリカン）の少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％が、フコース残基を欠いている。したがって、グリカンの５％～６０％、５％～５０％、５％～４０％、１０％～５０％、１０％～５０％、１０％～４０％、２０％～５０％、または２０％～４０％が、フコース残基を欠いている。少なくともある程度まで脱フコシル化される組成物は、１，３，４－トリ－Ｏ－アセチル－２－デオキシ－２－フルオロ－Ｌ－フコース阻害剤の存在下で抗体を産生する細胞を培養することによって産生され得る。本明細書に記載される構築体およびポリペプチドの比較的脱フコシル化された形態は、ＦＵＴ８の発現が低減されたか、または発現しない細胞で発現すること、およびベータ－１，４－マンノシル－糖タンパク質４－ベータ－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素（ＧｎＴ－ＩＩＩ）を過剰発現する細胞で発現することを含む、種々の他の方法を使用して産生され得る。

【０２２３】

ＸＩ．精製

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、タンパク質精製分野において公知の任意の方法、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー（例えばプロテインＡアフィニティー）およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製に関するその他の標準技術によって、精製することが可能である。例えば、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、プロテインＡカラム等のアフィニティーカラムを、適切に選択し、クロマトグラフィーカラム、ろ過、限外ろ過、塩析および透析手順と組み合わせることとによって、単離および精製することが可能である（例えば、Ｐｒｏｃｅｓｓ　Ｓｃａｌｅ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｕｗｅ　Ｇｏｔｔｓｃｈａｌｋ（ｅｄ．）Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，２００９、およびＳｕｂｒａｍａｎｉａｎ（ｅｄ．）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｖｏｌｕｍｅ　Ｉ－Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（２００４）を参照）。

【０２２４】

いくつかの例では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、１つ以上の精製用ペプチドに連結して、例えば全細胞溶解混合物からの、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の精製および単離を促進することが可能である。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドは、精製用ペプチドに対して特異的な親和性を有する別の部分と結合する。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドと特異的に結合するこうした部分は、基剤、樹脂またはアガロースビーズ等の固相支持体に付加する。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合され得る精製用ペプチドの例としては、ヘキサヒスチジンペプチド、ＦＬＡＧペプチド、ｍｙｃペプチドおよび赤血球凝集素（ＨＡ）ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。ヘキサヒスチジンペプチド（ＨＨＨＨＨＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８））は、マイクロモル親和性をもつニッケル官能性アガロースアフィニティーカラムと結合する。いくつかの実施形態では、ＦＬＡＧペプチドは、配列ＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９）を含む。い

くつかの実施形態では、ＦＬＡＧペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＤＹＫＤＤＤＤＫ、例えば３×ＤＹＫＤＤＤＤＫを含む。いくつかの実施形態では、ｍｙｃペプチドは、配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０）を含む。いくつかの実施形態では、ｍｙｃペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ、例えば３×ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬを含む。いくつかの実施形態では、ＨＡペプチドは、配列ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）を含む。いくつかの実施形態では、ＨＡペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ、例えば３×ＹＰＹＤＶＰＤＹＡを含む。ＦＬＡＧ、ｍｙｃまたはＨＡの精製用ペプチドに対して特異的に認識かつ結合する抗体は、この技術分野で周知であり、しばしば市販されている。これらの抗体により機能化された固相支持体（例えば、基剤、樹脂またはアガロースビーズ）を用いて、ＦＬＡＧ、ｍｙｃまたはＨＡペプチドを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製することができる。

【０２２５】

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に関し、精製方法としてプロテインＡカラムクロマトグラフィーを採用することができる。プロテインＡリガンドは、Ｆｃ領域を介してＦｃ－抗原結合ドメイン構築体と相互作用する。このために、プロテインＡクロマトグラフィーは、大半の宿主細胞タンパク質を除去することができる高度に選択的な捕捉方法となる。本開示では、実施例４～８に記載されるようにプロテインＡカラムクロマトグラフィーを用いて、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製してもよい。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヘテロ二量体形成および／またはホモ二量体形成ドメインの使用は、６０％以上の純度を有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の調製を可能にし、すなわち、細胞中で産生されるタンパク質構築体物質の６０％以上が、所望のＦｃ構築体構造を有し、例えば、調製物中のタンパク質構築体物質の６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、所望の構築体構造を有する。いくつかの実施形態では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の調製物中のタンパク質構築体物質の３０％未満が、望ましくないＦｃ構築体構造（例えば、実施例１に記載される構築体の高次種）を有し、例えば、調製物中のタンパク質構築体物質の３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ以下が、望ましくないＦｃ構築体構造を有する。いくつかの実施形態では、１つ以上の既知の精製方法（例えば、プロテインＡアフィニティー精製）を使用したさらなる精製後の、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の最終純度は、８０％以上であり得、すなわち、精製されたタンパク質構築体物質の８０％以上が、所望のＦｃ構築体構造を有し、例えば、調製物中のタンパク質構築体物質の８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、所望のＦｃ構築体構造を有する。いくつかの実施形態では、１つ以上の既知の精製方法（例えば、プロテインＡアフィニティー精製）を使用してさらに精製されたＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の調製物中のタンパク質構築体物質の１５％未満が、望ましくないＦｃ構築体構造（例えば、実施例１に記載される構築体の高次種）を有し、例えば、調製物中のタンパク質構築体物質の１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ以下が、望ましくないＦｃ構築体構造を有する。

【０２２７】

ＸＩＩ．薬学的組成物／製剤

本開示は、本明細書に記載の１つ以上のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を含む薬学的組成物を特徴とする。一実施形態では、薬学的組成物は、構造が同一または実質的に同一であるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む。様々な例では、薬学的組成物は、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体１～４２のいずれか１つの実質的に均質な群を含む。

【０２２８】

例えば本明細書に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（例えば、３つのＦｃドメイン

を有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体）などの本開示の治療用タンパク質構築体を、薬学的組成物内に組み込むことが可能である。治療用タンパク質を含む薬学的組成物は、当業者に公知である方法によって調製することが可能である。薬学的組成物は、水または他の薬学的に許容される液体の滅菌溶液または懸濁液を含む注射製剤で非経口投与することが可能である。例えば、薬学的組成物は、注射用蒸留水（ＷＦＩ）、生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、サーファクタント、安定剤、希釈剤、結合剤、賦形剤等の薬学的に許容される担体または溶媒とＦｃ－抗原結合ドメイン構築体とを好適に組み合わせて、次いで通常許容される薬務で求められる単位用量形態で混合することによって、調製することが可能である。医薬製剤に含まれる活性成分の量は、指定される範囲内で好適な用量が与えられるようなものとする。

【０２２９】

注射用の滅菌組成物は、従来の薬務に従って、担体として注射用蒸留水を用いて調製することが可能である。例えば、グルコースと、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等の他の添加とを含有する生理食塩水または等張液を、任意に、好適な可溶化剤、例えばこの技術分野で通常知られる、エタノール等のアルコールおよびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコール等のポリアルコール、およびポリソルベート８０（商標）、ＨＣＯ－５０等の非イオン性界面活性剤と組み合わせて、注射用水溶液として用いることができる。治療用タンパク質産物の調製方法は、この技術分野で公知であり、例えば、Ｂａｎｇａ（ｅｄ．）Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ，Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（２ｄ ｅｄ．）Ｔａｙｌｏｒ ＆ Ｆｒａｎｃｉｓ Ｇｒｏｕｐ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ（２００６）を参照されたい。

【０２３０】

ＸＩＩＩ．治療方法および投与量

本明細書に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、様々な癌（例えば、悪性および固形腫瘍）および自己免疫疾患を治療するために使用され得る。薬学的組成物は、投与形態と互換性のある手法で、治療効果があるような量で投与されて、症状の改善または治療をもたらす。薬学的組成物は、例えば、静脈内投与形態、皮下投与形態、摂取可能な溶液、薬剤放出カプセル等の経口投与形態である、種々の投与形態で投与される。個々の対象に適切な用量は、治療目的、投与経路、および患者の状態に依存する。概して、組換えタンパク質は、１～２００ｍｇ／ｋｇ、例えば、１～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば、２０～１００ｍｇ／ｋｇで投与される。したがって、最適な治療効果を得るために求められるとおりに、医療提供者が、用量を誂えて、決定し（ｔｉｔｅｒ）、投与経路を調整することが必要となる。

【０２３１】

ＸＩＶ．補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）

本開示に記載されるＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、様々なＦｃ受容体介在性エフェクター機能を活性化することができる。免疫系の構成要素の１つは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）システムである。これは自然免疫系の一部であり、抗体と貪食細胞の能力を増強し、外来性病原体を除去する。古典的補体経路、副補体経路、そしてレクチン経路の３つの生化学的経路が、補体系を活性化する。それら経路すべてが、複雑な活性化とシグナル伝達カスケードのセットを伴っている。

【０２３２】

古典的補体経路では、ＩｇＧまたはＩｇＭが補体活性化のトリガーを引く。抗原に抗体が結合した後、それら抗体にＣ１ｑタンパク質が結合し、Ｃ１複合体を形成させる。この複合体がＣ１ｓエステラーゼを生成し、これがＣ４およびＣ２タンパク質を、Ｃ４ａとＣ４ｂ、およびＣ２ａとＣ２ｂに切断して、活性化する。次いで、Ｃ２ａ断片とＣ４ｂ断片が、Ｃ３転換酵素と呼ばれるタンパク質複合体を形成し、Ｃ３をＣ３ａとＣ３ｂに切断して、シグナルを増幅させ、細胞膜障害複合体を形成させる。

【０２３３】

本開示のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、免疫系によるＣＤＣ活性を増強することができる。

【０２３４】

ＣＤＣは、抗原発現細胞（例えば、Ｒａｊｉ細胞（ＡＴＣＣ））が連続希釈された抗体、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体、またはＩＶＩｇでコーティングされる比色分析アッセイを使用して評価され得る。すべてのウェルにヒト血清補体（Ｑｕｉｄｅｌ社）を２５％ｖ／ｖで添加し、３７℃で２時間インキュベートしてもよい。細胞を、ＷＳＴ－１細胞増殖試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社）を添加した後で、３７℃で１２時間インキュベートしてもよい。次いでプレートを振とう機に２分間置き、４５０ｎｍの吸光度を測定してもよい。

【０２３５】

ＸＶ．抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）

本開示のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、免疫系による抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性を増強することもできる。ＡＤＣＣは能動免疫系の一部であり、抗体は外来病原体の表面抗原に結合し、それらを死に至らしめる。ＡＤＣＣには、抗体によるナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の活性化が含まれる。ＮＫ細胞はＦｃ受容体を発現し、これが例えばＩｇＧおよびＩｇＭなどの抗体のＦｃ部分に結合する。抗体が病原体に感染した標的細胞の表面に結合すると、その後に引き続いてＮＫ細胞に結合し、活性化させる。ＮＫ細胞は、例えばＩＦＮ－γなどのサイトカイン、例えばパーフォリンおよびグランザイムなどのタンパク質を放出する。パーフォリンは、カルシウムの存在下で多量体形成する孔形成サイトリシンである。グランザイムは、標的細胞中でプログラム化細胞死を誘導するセリンプロテアーゼである。ＮＫ細胞に加えて、マクロファージ、好中球、および好酸球もＡＤＣＣを介在することができる。

【０２３６】

ＡＤＣＣは、発光アッセイを使用して評価してもよい。ヒト初代ＮＫエフェクター細胞（Ｈｅｍａｃａｒｅ社）を溶解させ、$５ｘ１０^{５}$／ｍＬで、リンパ球増殖培地－３（Ｌｏｎｚａ社）中、３７℃で一晩、そのままの状態にさせておく。次の日、ヒトリンパ芽球様細胞株のＲａｊｉ標的細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を回収し、アッセイ培地（フェノールレッドフリーのＲＰＭＩ、１０％ＦＢＳΔ、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標））中に再懸濁させ、様々な濃度の対象の各プローブの存在下で３０分間、３７℃で播種する。次いで休ませたＮＫ細胞を回収し、アッセイ培地中に再懸濁させ、抗ＣＤ２０をコートしたＲａｊｉ細胞を含有するプレートに添加する。エフェクター細胞と標的細胞の最終比率を５：１（$５ｘ１０^{４}$ＮＫ細胞：$１ｘ１０^{４}$　Ｒａｊｉ細胞）として、３７℃で６時間、プレートをインキュベートする。

【０２３７】

ＣｙｔｏＴｏｘ－Ｇｌｏ（商標）細胞傷害アッセイキット（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して、ＡＤＣＣ活性を決定する。ＣｙｔｏＴｏｘ－Ｇｌｏ（商標）アッセイは、発光性ペプチド基質を使用して、膜の完全性が失われた細胞、例えば溶解したＲａｊｉ細胞によって放出される死細胞プロテアーゼ活性を測定する。６時間のインキュベーション期間後、調製された試薬（基質）をプレートの各ウェルに加え、室温で１５分間オービタルプレート振盪機上に置く。発光は、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　Ｆ５プレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ社）を使用して測定される。データは、対照条件（ＮＫ細胞＋Ｒａｊｉのみ）からの読取値を、試験条件からの読み取り値から差し引いて、バックグラウンドを除去した後に分析される。

【０２３８】

ＸＶＩ．抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）

本開示のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、免疫系による抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）活性を増強することもできる。ＡＤＣＰは抗体オプソニン化としても知られており、このプロセスによって、病原体は、貪食細胞による摂食と除去の目印を付けられる。貪食細胞は、有害な外来病原体と、死んだ細胞または死にゆく細胞を摂食することによって身

体を保護する細胞である。このプロセスは、病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰＳ）によって活性化され、ＮＦ－ｋＢの活性化へと繋がっていく。次いで例えばＣ３ｂと抗体などのオプソニンが標的病原体に付加され得る。標的がオプソニンでコーティングされると、Ｆｃドメインは、そのＦｃ受容体を介して貪食細胞を引き付ける。次いで貪食細胞がその細胞を包み込み、摂食された物質のファゴソームが、リソソームと融合する。次いで、結果としてできたファゴリソソームが、細胞物質をタンパク質分解的に消化する。

【０２３９】

ＡＤＣＰは、生物発光アッセイを使用して評価してもよい。抗体依存性細胞介在性貪食（ＡＤＣＰ）は、治療用抗体の重要な作用機序である。ＡＤＣＰは、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、およびＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）を介して、単球、マクロファージ、好中球および樹状細胞により介在されることができる。３つすべての受容体が、ＡＤＣＰを生じさせる抗体認識、免疫受容体のクラスタリングおよびシグナル伝達事象に関与し得る。しかし、阻害実験から、ＦｃγＲＩＩａがこのプロセスに関与する主要Ｆｃγ受容体であることが示唆されている。

【０２４０】

ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ　ＡＤＣＰレポーターバイオアッセイは、生物発光細胞系アッセイであり、これを使用して、ＦｃγＲＩＩａに特異的に結合および活性化する抗体、ならびにＦｃドメインを有する他の生物物質の有効性と安定性を測定することができる。アッセイは、アミノ酸１３１位でヒスチジン（Ｈ）を含有する、高アフィニティーヒトＦｃγＲＩＩａ－Ｈバリアント、およびＮＦＡＴ－応答要素（ＮＦＡＴ－ＲＥ）により駆動されるルシフェラーゼレポーターを発現する遺伝子改変Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞株からなる。

【０２４１】

標的細胞と関連抗体を共培養したとき、ＦｃγＲＩＩａ－Ｈエフェクター細胞が抗体のＦｃドメインに結合し、ＦｃγＲＩＩａシグナル伝達とＮＦＡＴ－ＲＥ－介在性ルシフェラーゼ活性が生じる。生物発光シグナルを検出し、ルシフェラーゼアッセイおよび標準光度計を用いて定量する。

【実施例】

【０２４２】

以下の実施例は、本明細書において特許請求される方法および化合物をどのように実施するか、作製するか、そして評価するかについて、当分野の当業者に完全な開示と解説を提供する目的で提示されており、本発明者らが、その開示とみなす範囲を限定する意図はない。

【０２４３】

実施例１　直線状Ｆｃ－抗原ドメイン含有ポリペプチドの組み立てを制御するための直交性ヘテロ二量体形成ドメインの使用

Ｆｃドメイン間のペプチドリンカーの有無にかかわらないタンデムＦｃ構築体の産生におけるものを含む、Ｆｃドメインを抗体のＣ末端に付加するための種々のアプローチが記載されている（例えば、Ｎａｇａｓｈｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ，４５：２７５２－６３，２００８、およびＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．ＭＡｂｓ，９：３９３－４０３，２０１７を参照）。しかしながら、複数のＦｃドメインを有する抗体構築体を作製するための科学文献に記載されている方法は、これらの方法が多数の望ましくない種のＦｃドメイン含有タンパク質の産生をもたらすため、それらの有効性が限られている。これらの種は、分子量のはしごをもたらす生成物産生中のポリペプチド鎖の制御されないオフレジスター会合に起因する、異なる分子量を有する（例えば、Ｎａｇａｓｈｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ，４５：２７５２－６３，２００８、およびＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．ＭＡｂｓ，９：３９３－４０３，２０１７を参照）。図１および図２は、２個のタンデムＦｃ単量体（図１）または３個のタンデムＦｃ単量体（図３）を含むポリペプチドの型崩れ会合によって生成され得る様々な分子量の複数のＦｃドメインを有するタンパク質種のいくつかの例を概略的に示す。これらの既存のアプローチを使用して定義された分子量を有する複数のＦｃドメインを有する所望のＦｃ－抗原結合ドメイン構

築体を一貫して達成することは、より大きい分子量を有する高次種（ＨＯＳ）の除去を必要とし、これは、所望の構築体の収率を大幅に低減する。

【０２４４】

直交性ヘテロ二量体化ドメインの使用は、大量の高次種（ＨＯＳ）も生成することなくタンデムＦｃ拡張を伴う構造の生成を可能にする。図３Ａおよび３Ｂは、複数のＦｃドメイン単量体を有する１個の長いポリペプチドを、各々が単一Ｆｃ単量体を有する２個の異なる短いポリペプチドに結合させることによって産生される、２個のＦｃドメイン（図３Ａ）または３個のＦｃドメイン（図３Ｂ）を有する直交性直線状Ｆｃ－抗原ドメイン結合構築体の例を示す。これらの例では、各構築体の１個のＦｃドメインは、ＦｃドメインのＣＨ３－ＣＨ３界面における逆電荷変異、および１個の他のＦｃドメイン（図３Ａ）または２個の他のＦｃドメイン（図３Ｂ）のいずれかのＣＨ３－ＣＨ３界面における２個の逆電荷変異と組み合わせて、ノブイントゥホール変異を含む。２個の逆電荷変異を有するＦｃ単量体を有する短いポリペプチド鎖は、突起形成変異および単一逆電荷変異を有する長鎖Ｆｃ単量体に対してより低い親和性を有し、２個の適合する逆電荷変異を有する長鎖Ｆｃ単量体（複数可）に結合する可能性がはるかに高い。逆電荷変異と組み合わせて空洞形成変異を有するＦｃ単量体を有する短いポリペプチド鎖は、適合する逆電荷変異と組み合わせて突起形成変異を有する長鎖Ｆｃ単量体に結合する可能性がはるかに高い。

【０２４５】

実施例２　直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用して生成され得るＦｃ構築体のタイプ

ノブイントゥホールならびに／または表３および４から選択される静電逆電荷変異を有する直交性ヘテロ二量体化ドメインは、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のアセンブリ中に複数の抗原結合ドメインおよびＦｃドメインの位置付けを制御するために、異なるポリペプチド鎖に組み込まれ得る。変化する構造の多種のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体は、少なくとも２個の直交性ヘテロ二量体化ドメインを、構築体にアセンブリするポリペプチド鎖に組み込む設計原理を使用して生成され得る。

【０２４６】

図４は、直交性ヘテロ二量体化技術を使用してアセンブリされる直鎖タンデムＦｃ構築体のいくつか例を示す。これらの構造の例は、３個のタンデムＦｃドメインを有する構築体に沿った様々な特定の位置で複数の抗原結合度会陰の位置付けを制御するための、ヘテロ二量体化変異（ＦｃドメインＡおよびＢ）の１つの群のＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセット、およびＦｃドメイン（ＣおよびＤ）の別の群のＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセット）の２個の異なるセットの使用を示す。実施例４、５、および６は、図４Ａ、４Ｂ、および４Ｄの概略図に示される構造に対応する直交性直鎖Ｆｃ－抗原ドメイン結合構築体の生成を記載する。抗ＣＤ２０または抗ＰＤ－Ｌ１ドメインのいずれかを有する構造物４５、４６、および４７は、最少の所望でない高次種で生成され、ＣＤＣ、ＡＤＣＰ、およびＡＤＣＣアッセイを使用する官能性について試験された。

【０２４７】

直交性ヘテロ二量体化技術はまた、ポリペプチド鎖の非対称配置を使用した、抗原結合ドメインおよびＦｃドメインの対称的分布を有する分岐Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を生成するために使用され得る。図５は、これらのＦｃ構築体のいくつかの例を示す。構築体は、ヘテロ二量体化変異のセット（ＣおよびＤのヘテロ二量体化対）を使用して１個のＦｃドメインで一緒に結合された２個の長いポリペプチド鎖を有する。ヘテロ二量体化変異の別のセット（ＡおよびＢのヘテロ二量体化対）は、小さい鎖ポリペプチド上の適合可能なＦｃドメイン単量体を含む長い鎖ポリペプチドの追加のＦｃドメイン単量体の会合を促進する。これらの分岐構築体は、単一ホモ二量体化Ｆｃドメインを使用して生成され得る対称的な分岐構築体に構造的に類似している。

【０２４８】

非対称分岐Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体もまた、直交性ヘテロ二量体化技術を使用して生成され得る。図６は、非対称分岐Ｆｃ構築体のいくつかの例を示す。構築体は、ヘテロ二量体化変異の１つのセットを使用して、１個のＦｃドメインで異なる数のＦｃ単量体

を有する異なる長さの２個のポリペプチド鎖（例えば、３個のＦｃドメインおよび２個のＦｃドメインを含むポリペプチド鎖）を結合することによって生成される。ヘテロ二量体化変異の異なるセット（ＡおよびＢのヘテロ二量体化対）は、小さい鎖ポリペプチド上の適合可能なＦｃドメイン単量体を含むこれらのポリペプチド鎖上の追加のＦｃドメイン単量体の会合を促進する。代替的には、図７は、分子上に非対称に分布された奇数の抗原結合ドメインを有するヘテロ二量体化変異の１個のセット（ＣおよびＤのヘテロ二量体化対）を使用して、１個のＦｃドメインで２個の長いポリペプチド鎖を結合することによって生成された非対称分岐Ｆｃ構築体の例を示す。

【０２４９】

実施例３　非対称分岐Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の調製

２つの異なるＦｃ含有構築体を設計し、細胞中で生成して、非対称分岐Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体が直交性ヘテロ二量体化技術を使用して効果的に生成され得るかどうかを試験した。２つの異なるＦｃ構築体（図８および図０）はそれぞれ、３個のＦｃドメインを有し、ヘテロ二量体化ドメイン変異の２個のセットを使用して３個の異なるポリペプチドからアセンブリされた。両方の構築体は、ポリペプチド鎖の非対称配置を使用するＦｃドメインの対称分布を有する分岐Ｆｃ構築体であり、各々は、構築体上で非対称的に分布された単一抗ＣＤ２０　Ｆａｂドメインを有していた。図８は、３個のＦｃドメインを有するＦｃ構築体を示し、Ｆｃドメインのうちの２個は、静電ステアリング変異（Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異とＥ３５７Ｋ逆電荷変異とを有する一方のＦｃ単量体、ならびにＫ３７０Ｄ逆電荷変異と組み合わせてＹ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異を有するもう一方のＦｃ単量体）と組み合わせたノブイントゥホール変異を有し、Ｆｃドメインのうちの１個は、静電ステアリング変異（Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ逆電荷変異を有する一方のＦｃ単量体、ならびにＫ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ逆電荷変異を有するもう一方のＦｃ単量体）を有していた。図９は、図８の構造に対して逆構造を有するＦｃ構築体を示し、すなわち、図９のＦｃ構造が、静電ステアリング変異と組み合わせてノブイントゥホール変異を含む１個のＦｃドメイン、および静電ステアリング変異のみを含む２個のＦｃドメインを有していたことを除いて、同じヘテロ二量体化変異を使用してアセンブリされる。表８は、これらの構築体の配列を示す。

【０２５０】

（表８）図８および９に示される構築体の配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc （抗CD20 VHおよびCH1 を有する）	第2の長鎖Fc （抗CD20 VHおよびCH1 なし）	短鎖Fc
図8の 構築体 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRKE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGQ	SEQ ID NO: DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYDTTPPVLDSDGSFF LYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	SEQ ID NO: DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

10

20

図9の構築体 (CD-20)	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRKE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLKSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGQ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

【０２５１】

各構築体は、ＨＥＫ細胞中で発現され、培地はＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析された。図１０は、図８に示される構築体の優位型タンパク質バンドが、所望の生成物について予期されるように、２００ｋＤａであったことを示す。２００ｋＤａの生成物を生成し得るこの構築体を生成するために使用される４個のアミノ酸配列の唯一の他の組み合わせは、自己会合からの鎖におけるヘテロ二量体化変異の両方に失敗した、Ｆａｂ　ＶＨおよびＣＨ１ドメインとともに直列に２個のＦｃドメインを含む長鎖の２個のコピーを含むＦａｂ軽鎖の２個のコピーの組み合わせである。しかしながら、ヘテロ二量体化Ｆｃ配列のこの自己会合は、対応するＦａｂの少ない構築体については観察されなかった（データに示されず）。同様に、図１１は、図９に示される構築体の優位型タンパク質バンドが、この生成物について予期された重量である２００ｋＤａよりもわずかに高かった分子量を有していたことを示す。２００ｋＤａの生成物を生成し得るこの構築体を生成するために使用される４個のアミノ酸配列の唯一の他の組み合わせは、自己会合からの鎖におけるヘテロ二量体化変異の両方に失敗した、Ｆａｂ　ＶＨおよびＣＨ１ドメインとともに直列に２個のＦｃドメインを含む長鎖の２個のコピーを含むＦａｂ軽鎖の２個のコピーの組み合わせである。しかしながら、ヘテロ二量体化Ｆｃ配列のこの自己会合は、対応するＦａｂの少ない構築体については観察されなかった（データに示されず）。

【０２５２】

実施例４　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４５の設計および精製

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、フォールディング効率を上昇させ、望ましくない高

分子量オリゴマーおよび多量体を生成し得るサブユニットの非制御的な会合を最小化させるよう設計され、そして実質的に均質な（例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％均質な）医薬用途用組成物が作製されるように設計される。これらの目的を踏まえて、タンデムＦｃドメイン（図１２）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製された。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４５（ＣＤ２０）および構築体４５（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（抗ＣＤ２０長鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３９）または抗ＰＤ－Ｌ１長鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４０）のいずれか；抗ＣＤ２０短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７）または抗ＰＤ－Ｌ１短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８）である第１の短鎖Ｆｃのコピー；および第２の短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３）２個のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの２個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、３個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、Ｎ末端で抗原結合ドメインとともに直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット、および／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第１のＦｃドメイン単量体は、第２および第３のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗原結合ドメインを含む。第２の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第２のセット、および／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第１の短鎖Ｆｃ中の変異の第１のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【０２５３】

この場合、長鎖Ｆｃは、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異を有する２個のＦｃドメイン単量体と直列に連続したＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ電荷変異とＥ３５７Ｋ電荷変異とを有する１個のＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗ＣＤ２０　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４５（ＣＤ２０））またはＮ末端で抗ＰＤ－Ｌ１　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４５（ＰＤ－Ｌ１））のいずれかを含む。短鎖Ｆｃは、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗ＣＤ２０　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４５（ＣＤ２０））またはＮ末端で抗ＰＤ－Ｌ１　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４５（ＰＤ－Ｌ１））のいずれかを含む。短鎖のＦｃ鎖は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異、ならびにＫ３７０Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体を含む。

【０２５４】

（表９）構築体４５（ＣＤ２０）および構築体４５（ＰＤ－Ｌ１）の配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CD20または抗PD-L1のVH、およびCH1を有する)	第1の短鎖Fc (抗CD20または抗PD-L1のVH、およびCH1を有する)	第2の短鎖Fc
構築体 45 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 239 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRD KLTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVE	SEQ ID NO: 247 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

10 20 30

		VHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRKELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLKSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGQ		
構築体 45 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGSPGQSITIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSST RVFGTGTKVTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	SEQ ID NO: 240 EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIKL GTVTTVDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTV	SEQ ID NO: 248 EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIKL GTVTTVDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYDTTPPV LDSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
		LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRKELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLKSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG Q		

【０２５５】

細胞培養

ＤＮＡ配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、ｐｃＤＮＡ３．４哺乳動物発現ベ

クター内にクローニングされた。ＤＮＡプラスミド構築体はリポソームを介して、ヒト胎生腎（ＨＥＫ）２９３細胞にトランスフェクトされた。短鎖Ｆｃおよび長鎖Ｆｃのアミノ酸配列を複数のプラスミドによってコードした。

【０２５６】

タンパク質精製

発現されたタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ　ＭａｂＣａｐｔｕｒｅ　Ａ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）カラムを使用したプロテインＡ系のアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。捕捉したＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を、ロードした後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．０）で洗浄し、中間洗浄緩衝液の５０ｍＭのクエン酸緩衝液（ｐＨ５．５）でさらに洗浄して、さらなるプロセスに関する不純物を除去した。結合したＦｃ構築体物質を、１００ｍＭのグリシン、ｐＨ３で溶離し、１ＭのＴＲＩＳ　ｐＨ７．４を添加することによって溶離液をすばやく中和し、次いで遠心分離して、０．２μｍのフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２５７】

Ｐｏｒｏｓ　ＸＳ樹脂（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を使用したイオン交換クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに分取した。カラムは、５０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ６（緩衝液Ａ）で予め平衡化して、サンプルは、ロードのために平衡用緩衝液で希釈した（１：３）。溶離緩衝液として５０ｍＭのＭＥＳ（１００％　Ａ）から、４００ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ６（１００％　Ｂ）の１２～１５ＣＶの線形勾配を使用して、サンプルを溶離した。溶離中に収集したすべての画分を、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって分析し、標的の画分をプールして、精製されたＦｃ構築体物質を精製した。

【０２５８】

イオン交換の後、標的の画分を、接線流ろ過システム上で、３０ｋＤａカットオフポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）膜カートリッジを使用して、１Ｘ－ＰＢＳ緩衝液に緩衝液交換した。サンプルをおよそ１０～１５ｍｇ／ｍＬに濃縮して、０．２μｍフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２５９】

非還元ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

サンプルを、Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（４％ＳＤＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）中で、９５℃で１０分間、変性させた。サンプルを、Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸ　ｓｔａｉｎ－ｆｒｅｅゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）で電気泳動にかけた。タンパク質のバンドは、ＵＶ照射またはクマシーブルー染色で可視化した。ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）でゲルを画像化した。Ｉｍａｇｅｌａｂ　４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いて、バンドの定量化を行った。

【０２６０】

実施例５　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４６の設計および精製

タンデムＦｃドメイン（図１３）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製された。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４６（ＣＤ２０）および構築体４６（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（長鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４１）；第１の短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３６）のコピー；および抗ＣＤ２０短鎖ＦＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６７）または抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ短鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６８）である第２の短鎖Ｆｃの２個のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの２個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、３個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット、および／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第１のＦｃド

メイン単量体は、第２および第３のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。第２の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異および／または表４から選択される１つ以上の逆電荷変異の第２のセット（変異は、第１の短鎖Ｆｃにおける変異の第１のセットとは異なる）、ならびにＮ末端における抗原結合ドメインを有する、Ｆｃドメイン単量体を含有する。

【０２６１】

この場合、長鎖Ｆｃは、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異およびＥ３５７Ｋ電荷変異を有する２個のＦｃドメイン単量体とともに直列に連続して、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ電荷変異を有する１個のＦｃドメイン単量体を含む。第１の短鎖Ｆｃは、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体を含有する。第２の短鎖Ｆｃは、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異ならびにＫ３７０Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗ＣＤ２０　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４６（ＣＤ２０））またはＮ末端で抗ＰＤ－Ｌ１　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４６（ＰＤ－Ｌ１））のいずれかを含む。

【０２６２】

（表１０）構築体４６（ＣＤ２０）および構築体４６（ＰＤ－Ｌ１）の配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc	第1の短鎖Fc	第2の短鎖Fc （抗CD20または抗PD-L1のVH、およびCH1を有する）
構築体 46 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ	SEQ ID NO: 241 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	SEQ ID NO: 67 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP

	SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKLTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGQ	EWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVDG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
構築体 46 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGSPGQSITIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSST RVFGTGTKVTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	SEQ ID NO: 241 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKLTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESN	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 68 EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIKL GTVTTVDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVDGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRW

10 20 30 40

		GQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGQ		QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

【０２６３】

細胞培養

ＤＮＡ配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、ｐｃＤＮＡ３．４哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。ＤＮＡプラスミド構築体はリポソームを介して、ヒト胎生腎（ＨＥＫ）２９３細胞にトランスフェクトされた。短鎖Ｆｃおよび長鎖Ｆｃのアミノ酸配列を複数のプラスミドによってコードした。

【０２６４】

タンパク質精製

発現されたタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ　ＭａｂＣａｐｔｕｒｅ　Ａ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）カラムを使用したプロテインＡ系のアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。捕捉したＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を、ロードした後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．０）で洗浄し、中間洗浄緩衝液の５０ｍＭのクエン酸緩衝液（ｐＨ５．５）でさらに洗浄して、さらなるプロセスに関する不純物を除去した。結合したＦｃ構築体物質を、１００ｍＭのグリシン、ｐＨ３で溶離し、１ＭのＴＲＩＳ　ｐＨ７．４を添加することによって溶離液をすばやく中和し、次いで遠心分離して、０．２μｍのフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２６５】

Ｐｏｒｏｓ　ＸＳ樹脂（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を使用したイオン交換クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに分取した。カラムは、５０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ６（緩衝液Ａ）で予め平衡化して、サンプルは、ロードのために平衡用緩衝液で希釈した（１：３）。溶離緩衝液として５０ｍＭのＭＥＳ（１００％　Ａ）から、４００ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ６（１００％　Ｂ）の１２～１５ＣＶの線形勾配を使用して、サンプルを溶離した。溶離中に収集したすべての画分を、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって分析し、標的の画分をプールして、精製されたＦｃ構築体物質を精製した。

【０２６６】

イオン交換の後、標的の画分を、接線流ろ過システム上で、３０ｋＤａカットオフポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）膜カートリッジを使用して、１Ｘ－ＰＢＳ緩衝液に緩衝液交換した。サンプルをおよそ１０～１５ｍｇ／ｍＬに濃縮して、０．２μｍフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２６７】

非還元ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

サンプルを、Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（４％ＳＤＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）中で、９５℃で１０分間、変性させた。サンプルを、Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸ　ｓｔａｉｎ－ｆｒｅｅゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）で電気泳動にかけた。タンパク質のバンドは、ＵＶ照射またはクマシーブルー染色で可視化した。Ｃｈ

ｅｍｉＤｏｃ　ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）でゲルを画像化した。Ｉｍａｇｅｌａｂ　４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いて、バンドの定量化を行った。

【０２６８】

実施例６　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の設計および精製

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、フォールディング効率を上昇させ、望ましくない高分子量オリゴマーおよび多量体を生成し得るサブユニットの非制御的な会合を最小化させるよう設計され、そして実質的に均質な（例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％均質な）医薬用途用組成物が作製されるように設計される。これらの目的を踏まえて、タンデムＦｃドメイン（図１４）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製された。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７（ＣＤ２０）および構築体４７（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（長鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４３）；抗ＣＤ２０短鎖ＦＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７）または抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ短鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８）である第１の短鎖Ｆｃの２個のコピー；および第２の短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３）のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの２個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、３個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット（ヘテロ二量体化変異）および／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第３のＦｃドメイン単量体は、第１および第２のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗原結合ドメインを含む。第２の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第２のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第１の短鎖Ｆｃ中の変異の第１のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【０２６９】

この場合、長鎖Ｆｃは、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々がＳ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異およびＥ３５７Ｋ電荷変異を有する２個のＦｃドメイン単量体とともに直列に連続して、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ電荷変異を有する。短鎖Ｆｃは、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗ＣＤ２０　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４７（ＣＤ２０））またはＮ末端で抗ＰＤ－Ｌ１　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４７（ＰＤ－Ｌ１））のいずれかを含む。短鎖のＦｃ鎖は、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異、ならびにＫ３７０Ｄ電荷変異を有するＦｃドメイン単量体を含む。

【０２７０】

（表１１）構築体４７（ＣＤ２０）および構築体４７（ＰＤ－Ｌ１）の配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc	第1の短鎖Fc (抗CD20または抗PD-L1のVH、およびCH1を有する)	第2の短鎖Fc
構築体 47 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 243 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLKSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGQKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSKL	SEQ ID NO: 247 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

10 20 30

		TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGQ		
構築体 47 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGSPGQSITIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSST RVFGTGTKVTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	SEQ ID NO: 243 EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIKL GTVTTVDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 248 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

【０２７１】

細胞培養

ＤＮＡ配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、ｐｃＤＮＡ３．４哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。ＤＮＡプラスミド構築体はリポソームを介して、ヒト胎生腎（ＨＥＫ）２９３細胞にトランスフェクトされた。短鎖Ｆｃおよび長鎖Ｆｃのアミノ酸配列を複数のプラスミドによってコードした。

【０２７２】

タンパク質精製

発現されたタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ　ＭａｂＣａｐｔｕｒｅ　Ａ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）カラムを使用したプロテインＡ系のアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。捕捉したＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を、ロードした後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．０）で洗浄し、中間洗浄緩衝液の５０ｍＭのクエン酸緩衝液（ｐＨ５．５）でさらに洗浄して、さらなるプロセスに関する不純物を除去した。結合したＦｃ構築体物質を、１００ｍＭのグリシン、ｐＨ３で溶離し、１ＭのＴＲＩＳ　ｐＨ７．４を添加することによって溶離液をすばやく中和し、次いで遠心分離して、０．２μｍのフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２７３】

Ｐｏｒｏｓ　ＸＳ樹脂（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を使用したイオン交換クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに分取した。カラムは、５０ｍＭのＭ

ＥＳ、ｐＨ６（緩衝液Ａ）で予め平衡化して、サンプルは、ロードのために平衡用緩衝液で希釈した（１：３）。溶離緩衝液として５０ｍＭのＭＥＳ（１００％　Ａ）から、４００ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ６（１００％　Ｂ）の１２～１５ＣＶの線形勾配を使用して、サンプルを溶離した。溶離中に収集したすべての画分を、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって分析し、標的の画分をプールして、精製されたＦｃ構築体物質を精製した。

【０２７４】

イオン交換の後、標的の画分を、接線流ろ過システム上で、３０ｋＤａカットオフポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）膜カートリッジを使用して、１Ｘ－ＰＢＳ緩衝液に緩衝液交換した。サンプルをおよそ１０～１５ｍｇ／ｍＬに濃縮して、０．２μｍフィルターを通して滅菌ろ過した。

【０２７５】

非還元ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

サンプルを、Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（４％ＳＤＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）中で、９５℃で１０分間、変性させた。サンプルを、Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸ　ｓｔａｉｎ－ｆｒｅｅゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）で電気泳動にかけた。タンパク質のバンドは、ＵＶ照射またはクマシーブルー染色で可視化した。ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）でゲルを画像化した。Ｉｍａｇｅｌａｂ　４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いて、バンドの定量化を行った。

【０２７６】

実施例７　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の設計および精製

タンデムＦｃドメイン（図１５）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製される。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８（ＣＤ２０）および構築体４８（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（長鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ａ）；抗ＣＤ２０短鎖ＦＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）または抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ短鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）である第１の短鎖Ｆｃの４個のコピー；および第２の短鎖Ｆｃの１個のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの４個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、５個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット（ヘテロ二量体化変異）、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第１、第２、第３、および第４のＦｃドメイン単量体は、第５のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセット、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗原結合ドメインを含む。第２の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第２のセット、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第１の短鎖Ｆｃ中の変異の第１のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【０２７７】

この場合、長鎖Ｆｃは、Ｅ３５７Ｋ電荷変異、ならびにＳ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異（ヘテロ二量体形成を促進する）を有する４個のＦｃドメイン単量体を、Ｋ４０９ＤおよびＤ３９９Ｋ電荷変異（ヘテロ二量体形成を促進する）を有する１個のＦｃドメイン単量体とともに直列に連続して含む。第１の短鎖Ｆｃは、Ｋ３７０Ｄ電荷変異ならびにＹ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖの空洞形成変異（ヘテロ二量体形成を促進する）を有するＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗ＣＤ２０　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４８（ＣＤ２０））、またはＮ末端で抗ＰＤ－Ｌ１　ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体４８（ＰＤ

－Ｌ１））のいずれかを含む。第２の短鎖Ｆｃは、Ｋ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋ電荷変異（ヘテロ二量体化を促進する）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【０２７８】

細胞培養

ＤＮＡ配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、ｐｃＤＮＡ３．４哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。ＤＮＡプラスミド構築体はリポソームを介して、ヒト胎生腎（ＨＥＫ）２９３細胞にトランスフェクトされる。短鎖Ｆｃおよび長鎖Ｆｃのアミノ酸配列は、複数のプラスミドによってコードされる。

【０２７９】

タンパク質精製

発現されたタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ　ＭａｂＣａｐｔｕｒｅ　Ａ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）カラムを使用したプロテインＡ系のアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製する。捕捉したＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を、ロードする前にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．０）で洗浄し、中間洗浄緩衝液５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．５）でさらに洗浄して、さらなるプロセスに関する不純物を除去する。結合したＦｃ構築体物質を、１００ｍＭのグリシン、ｐＨ３で溶離し、１ＭのＴＲＩＳ　ｐＨ７．４を添加することによって溶離液をすばやく中和し、次いで遠心分離して、０．２μｍのフィルターを通して滅菌ろ過する。

【０２８０】

Ｐｏｒｏｓ　ＸＳ樹脂（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を使用したイオン交換クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに分取する。カラムは、５０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ６（緩衝液Ａ）で予め平衡化して、試料は、ロードする前に平衡用緩衝液で希釈（１：３）する。溶離緩衝液として５０ｍＭのＭＥＳ（１００％Ａ）から４００ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ６（１００％Ｂ）の１２～１５ＣＶの直線勾配を用いて、試料を溶離する。溶離中に収集したすべての画分を、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって分析され、標的の画分はプールされ、精製されたＦｃ構築体物質を精製した。

【０２８１】

イオン交換の後、標的の画分は、接線流ろ過システム上で、３０ｋＤａをカットオフするポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）膜カートリッジを使用して、１倍ＰＢＳ緩衝液に緩衝液交換される。試料をおよそ１０～１５ｍｇ／ｍＬに濃縮して、０．２μｍフィルターを通して滅菌ろ過する。

【０２８２】

非還元ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

サンプルを、Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（４％ＳＤＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）中で、９５℃で１０分間、変性させる。サンプルを、Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸ　ｓｔａｉｎ－ｆｒｅｅゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）で電気泳動にかける。タンパク質のバンドは、ＵＶ照射またはクマシーブルー染色で可視化する。ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）でゲルを画像化する。Ｉｍａｇｅｌａｂ　４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いて、バンドの定量化を行う。

【０２８３】

実施例９　Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を特徴解析するために使用される実験的アッセイ

ペプチドおよびグリコペプチドの液体クロマトグラフィー－ＭＳ／ＭＳ

タンパク質（Ｆｃ構築体）を、６Ｍのグアニジン（Ｓｉｇｍａ社）中で１μｇ／μＬに希釈した。ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を濃度１０ｍＭまで加えて、６５℃で３０分間、変性条件下でジスルフィド結合を減らした。氷冷後、サンプルを、暗闇中で１時間、３０ｍＭのヨードアセトアミド（ＩＡＭ）とともにインキュベートして、遊離チオールをアルキル化（カルバミドメチル化（ｃａｒｂａｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌａｔｅ））した。その

後タンパク質を、１０－ｋＤａ膜を介して２５ｍＭの炭酸水素アンモニウム緩衝液（ｐＨ７．８）中に透析し、ＩＡＭ、ＤＴＴおよびグアニジンを除去した。タンパク質は、Ｂａｒｏｃｙｃｌｅｒ（ＮＥＰ　２３２０、Ｐｒｅｓｓｕｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）中で、トリプシンで消化した。圧力は、３７℃で、２０，０００ｐｓｉと周囲圧力との間を１時間に合計３０サイクルで循環させた。ペプチドのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析は、Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００（Ｄｉｏｎｅｘ）クロマトグラフィーシステムとＱ－Ｅｘａｃｔｉｖｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）質量分析計とで行った。ペプチドは、移動相として０．１％ＦＡ水溶液および０．１％ＦＡアセトニトリル溶液を用いて、ＢＥＨ　ＰｅｐＭａｐ（Ｗａｔｅｒｓ社）カラムで分離した。

【０２８４】

インタクト質量分析

５０μｇのタンパク質（Ｆｃ構築体）を、１μｇ／μＬの濃度まで、１０ｋＤａスピンフィルター（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して、５０ｍＭの炭酸水素アンモニウム（ｐＨ　７．８）に緩衝液交換した。３０単位のＰＮＧａｓｅ　Ｆ（Ｐｒｏｍｅｇａ）をサンプルに添加し、３７℃で５時間インキュベートした。水中０．１％　ＦＡおよびアセトニトリル中０．１％　ＦＡを移動相として使用して、Ｗａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｃ４　ＢＥＨカラム（１ｘ１００ｍｍ、粒径１．７ｕｍ、孔径３００Ａ）上で分離を行った。Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００（Ｄｉｏｎｅｘ）クロマトグラフィーシステムおよびＱ－Ｅｘａｃｔｉｖｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）質量分析計上でＬＣ－ＭＳを行った。Ｂｉｏｐｈａｒｍａ　Ｆｉｎｄｅｒのデフォルトの ＲｅＳｐｅｃｔ方法（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、スペクトルをデコンボリュートした。

【０２８５】

キャピラリー電気泳動－ドデシル硫酸ナトリウム（ＣＥ－ＳＤＳ）アッセイ

サンプルを１ｍｇ／ｍＬに希釈して、ＨＴタンパク質発現変性緩衝液（ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ｄｅｎａｔｕｒｉｎｇ　ｂｕｆｆｅｒ）（パーキンエルマー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）社）と混合した。混合物を４０℃で２０分間インキュベートした。サンプルを７０μＬの水で希釈して、９６ウェルプレートに移した。サンプルは、ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＬａｂＣｈｉｐ（パーキンエルマー社）を備えたＣａｌｉｐｅｒ　ＧＸＩＩ機器（パーキンエルマー社）で分析した。蛍光強度を用いて、各サイズの変異体の相対存在度を計算した。

【０２８６】

非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

サンプルを、Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（４％ＳＤＳ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）中で、９５℃で１０分間、変性させる。サンプルを、Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ　ＴＧＸ　ｓｔａｉｎ－ｆｒｅｅゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）で電気泳動にかける。タンパク質のバンドは、ＵＶ照射またはクマシーブルー染色で可視化する。ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）でゲルを画像化する。Ｉｍａｇｅｌａｂ　４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いて、バンドの定量化を行う。

【０２８７】

相補依存細胞毒性（ＣＤＣ）

ＣＤＣは、連続希釈されたリツキシマブ、Ｆｃ構築体またはＩＶＩｇでＲａｊｉ細胞（ＡＴＣＣ）がコーティングした比色分析アッセイで評価した。すべてのウェルにヒト血清補体（Ｑｕｉｄｅｌ社）を２５％ｖ／ｖで添加し、３７℃で２時間インキュベートした。細胞は、ＷＳＴ－１細胞増殖試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社）を添加した後で、３７℃で１２時間インキュベートした。プレートを振とう機に２分間移し、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

【０２８８】

実施例１０．抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体による補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性化

抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体が、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体であるオビヌツズマブと比較して、ＣＤＣ活性を増強する度合いを検証するためのＣＤＣアッセイを開発した。ガザイバのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成された。それぞれの抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体、およびオビヌツズマブモノクローナル抗体は、以下のように実施されるＣＤＣアッセイにおいて検証された。

【０２８９】

１０％の熱非働化ＦＢＳを補充したＲＰＭＩ－１６４０中で増殖させたＤａｕｄｉ細胞を沈殿させ、氷冷ＰＢＳで１回洗浄し、１ｍＬ当たり１．０ｘ１０^{6}個の生細胞の濃度で、０．１％ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０中に再懸濁させた。この細胞懸濁液５０マイクロリットルを、９６ウェルプレートのすべてのウェル（プレートの端を除く）に加えた。プレートは、すべての添加が行われるまで氷上に保持された。被験物質を、ＲＰＭＩ－１６４０＋ＢＳＡ中で、４５０ｎＭの開始濃度から４倍連続希釈した。各被験物質に対し、総数で１０の濃度を検証した。播種されたＤａｕｄｉ細胞に対し、それぞれ５０マイクロリットルを加えた。正常またはＣ１ｑ枯渇ヒト補体血清（Ｑｕｉｄｅｌ社、カリフォルニア州サンディエゴ）を、ＲＰＭＩ－１６４０＋ＢＳＡ中、１：５に希釈した。播種されたＤａｕｄｉ細胞に対し、それぞれ５０マイクロリットルを加えた。６個の正常血清対照ウェルには、細胞、培地のみ（処置なし）、および１／５正常血清（正常バックグラウンド）を入れた。これらウェルのうち３個には、１６．５μＬのＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｐｒｏｍｅｇａ社、ウィスコンシン州マディソン）（正常溶解対照）も入れた。Ｃ１ｑ枯渇バックグラウンドおよび溶解対照も同様に調製した。ＰＢＳをすべてのプレート端のウェルに入れた。２時間、３７℃でプレートをインキュベートした。２時間後、予め温めたＡｌａｍａｒブルー（Ｔｈｅｒｍｏ社、マサチューセッツ州ウォルサム）５０μＬを全ウェルに加えた（プレート端を除く）。プレートをインキュベーターに一晩戻した（１８時間、３７℃）。１８時間後、蛍光を、ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ　３で測定した。プレートは、５４４／５９０　Ｅｘ／Ｅｍフィルターおよび自動カットオフを使用して最高点を読み取った。正常なバックグラウンド、正常な溶解対照、Ｃ１ｑ枯渇バックグラウンド、およびＣ１ｑ枯渇溶解対照のウェルに対し、平均値が算出された。細胞溶解の百分率を以下のように計算した：

細胞溶解％＝（ＲＦＵ試験－ＲＦＵバックグラウンド）／（ＲＦＵ溶解対照－ＲＦＵバックグラウンド）×１００。各構築体に対して、ＥＣ５０（ｎＭ）が決定された。

【０２９０】

表１２に示されるように、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体は、Ｄａｕｄｉ細胞においてＣＤＣを誘導し、より低いＥＣ５０値によって証されるように、オビヌツズマブモノクローナル抗体と比較して細胞傷害を増強する能力がより高いことを示した。

【０２９１】

（表１２）Ｄａｕｄｉ細胞における、ＣＤＣを誘導する抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体の能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	5	38－65	47	11
S3L-AA2-OBI 構築体 45 (抗CD20)	2	0.50－0.57	0.54	0.046
S3L-0AA2-OBI 構築体 46 (抗CD20)	4	0.20－0.25	0.23	0.025
S3L-0A22-OBI2 構築体 47 (抗CD20)	4	0.16－0.21	0.18	0.027

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカーを含んだ。

【０２９２】

実施例１１．抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体による補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性化

抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体であるアベルマブ（ａｖｅｌｕｍａｂ）（バベンチオ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ））と比較して、ＣＤＣ活性を増強する度合いを検証するためのＣＤＣアッセイを開発した。アベルマブのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成されたした。各抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体、ならびにフコシル化および脱フコシル化されたアベルマブモノクローナル抗体を、以下のとおりに実施されたＣＤＣアッセイにおいて試験した。

【０２９３】

ヒトＰＤ－Ｌ１遺伝子を安定的に発現するようトランスフェクトされたヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）細胞株（ＣｒｏｗｎＢｉｏ社）を、ＤＭＥＭ、１０％ＦＢＳ、および選択マーカーとして２μｇ／ｍＬのピューロマイシンにおいて培養した。細胞を回収し、ゲネテシン（ｇｅｎｅｔｅｃｉｎ）またはフェノールレッドを含まないＸ－Ｖｉｖｏ－１５培地（Ｌｏｎｚａ社）において希釈した。６ｘ１０^{5}細胞／ｍＬのＨＥＫ－ＰＤ－Ｌ１細胞１００μｌを、９６ウェルの組織培養処理平底プレート（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ社）に播種した。Ｆｃ構築体および抗体に、Ｘ－ＶＩＶＯ－１５培地中で１：３の連続希釈を行った。希釈された構築体５０μＬを、ウェルへ、標的細胞の上部に添加した。５０μｌの非希釈のヒト血清補体（Ｑｕｉｄｅｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、各ウェルに添加した。次いで、アッセイプレートを３７℃で２時間インキュベートした。２時間インキュベートした後、２０μＬのＷＳＴ－１細胞増殖試薬（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｃｏｒｐ）を各ウェルに加え、３７℃で一晩インキュベートした。翌日の朝、アッセイプレートをプレート振とう器上に２～５分間置いた。吸光度は、分光光度計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳＰＥＣＴＲＡｍａｘ　Ｍ２）上、６００ｎｍで補正を行い、４５０ｎｍで測定した。各構築体に対して、ＥＣ５０（ｎＭ）が決定された。

【０２９４】

表１３に示されるように、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体４７は、ヒトＰＤ　Ｌ１を発現す

るＨＥＫ細胞においてＣＤＣを誘導したが、残りの抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体およびアベルマブモノクローナル抗体は、このアッセイを使用してＣＤＣを誘導するように見えなかった。

【０２９５】

（表１３）ＰＤ－Ｌ１発現ＨＥＫ細胞においてＣＤＣを誘導する抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体の能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	7	CDC活性 なし[2]	CDC活性 なし[2]	N/A
IgG1抗体、 脱フコシル化	1	CDC活性 なし2	CDC活性 なし2	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体45 (抗PD-L1)	1	CDC活性 なし[2]	CDC活性 なし[2]	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体46 (抗PD-L1)	1	決定されず	決定されず	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体47 (抗PD-L1)	2	1.4－2.7	1.6	1.1

[1] すべての構築体は、特に記載がない限りＧ２０リンカーを含んでいた。

[2] 構築体は、アッセイ条件下で測定可能なＣＤＣを生成しなかった。

【０２９６】

実施例１２．抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体による抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）活性化ＡＤＣＰレポーターアッセイ

抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体が、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体のオビヌツズマブ（ガザイバ）と比較して、ＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を活性化し、それによりＡＤＣＰ活性を増強する度合いを検証するためのＡＤＣＰレポーターアッセイを開発した。ガザイバのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成された。各抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体、ならびにフコシル化および脱フコシル化されたオビヌツズマブモノクローナル抗体を、以下のとおり実施されたＡＤＣＣレポーターアッセイにおいて検証した。

【０２９７】

Ｒａｊｉ標的細胞（１．５ｘ１０[4]細胞／ウェル）およびＪｕｒｋａｔ／ＦｃγＲＩＩａ－Ｈエフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ社）（３．５ｘ１０[4]細胞／ウェル）を、４％低ＩｇＧ血清（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中に再懸濁し、連続希釈した抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体を含む９６ウェルプレートに播種した。５％CO_2中、

３７℃、６時間のインキュベーションを行った後、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳ照度計（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、製造業者のプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して発光を測定した。

【０２９８】

表１４に示されるように、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体は、ＡＤＣＰレポーターアッセイにおいてＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導し、より低いＥＣ５０値によって証されるように、オビヌツズマブモノクローナル抗体と比較してＡＤＣＰ活性を増強する能力がより高いことを示した。

【０２９９】

（表１４）ＡＤＣＰレポーターアッセイにおける、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	6	4.5 - 10.8	7.1	2.2
IgG1抗体、脱フコシル化	3	5.5 - 6.1	5.8	0.3
S3L-AA2-OBI 構築体 45 (抗CD20)	1	0.13	0.13	N/A
S3L-0AA2-OBI 構築体 46 (抗CD20)	1	0.17	0.17	N/A
S3L-0A22-OBI2 構築体 47 (抗CD20)	1	0.08	0.08	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカーを含んだ。

【０３００】

実施例１３．抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体による抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）活性化ＡＤＣＰレポーターアッセイ

抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体のアベルマブ（ａｖｅｌｕｍａｂ）（バベンシオ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ））と比較して、ＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を活性化し、それによりＡＤＣＰ活性を増強する度合いを検証するためのＡＤＣＰレポーターアッセイを開発した。アベルマブのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成されたした。各抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体、ならびにフコシル化および脱フコシル化されたアベルマブモノクローナル抗体を、以下のとおり実施されたＡＤ

ＣＣレポーターアッセイにおいて検証した。

【０３０１】

標的ＨＥＫ－ＰＤ－Ｌ１細胞（１．５ｘ１０^{4}細胞／ウェル）およびＪｕｒｋａｔ／ＦｃγＲＩＩａ－Ｈエフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ社）（３．５ｘ１０^{4}細胞／ウェル）を、４％低ＩｇＧ血清（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中に再懸濁し、連続希釈した抗ＰＤ－Ｌ１構築体を含む９６ウェルプレートに播種した。５％ＣＯ２中、３７℃、６時間のインキュベーションを行った後、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳ照度計（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、製造業者のプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して発光を測定した。

【０３０２】

表１５に示されるように、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体は、ＡＤＣＰレポーターアッセイにおいてＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導した。

【０３０３】

（表１５）ＡＤＣＰレポーターアッセイにおける、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体番号[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	6	効果なし[2]	効果なし[2]	N/A
IgG1抗体、 脱フコシル化	1	効果なし[2]	効果なし[2]	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体45 (抗PD-L1)	1	0.031	0.031	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体46 (抗PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体47 (抗PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A

[1] すべての構築体は、特に記載がない限りＧ２０リンカーを含んでいた。

[2] 構築体は、アッセイ条件下で測定可能なＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導しなかった。

【０３０４】

実施例１４．抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体による抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）の活性化

ＡＤＣＣレポーターアッセイ

抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体が、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体のオビヌツズマブ（ガザイバ）と比較して、ＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導し、ＡＤＣＣ活性を増強する度合いを検証するためのＡＤＣＣレポーターアッセイを開発した。ガザイバのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成された。各抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体、およびフコシル化オビヌツズマブモノクローナル抗体を、以下のとおりに実施されたＡＤＣＣレポーターアッセイにおいて試験した。

【０３０５】

Ｒａｊｉ標的細胞（１．２５ｘ１０^{4}細胞／ウェル）およびＪｕｒｋａｔ／ＦｃγＲＩＩａ－Ｈエフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ社）（７．４５ｘ１０４細胞／ウェル）を、４％低ＩｇＧ血清（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中に再懸濁し、連続希釈した抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体を含む９６ウェルプレートに播種した。５％ＣＯ２中、３７℃、６時間のインキュベーションを行った後、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳ照度計（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、製造業者のプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して発光を測定した。

【０３０６】

表１６に示されるように、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体は、ＡＤＣＣレポーターアッセイにおいてＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導した。

【０３０７】

（表１６）ＡＤＣＣレポーターアッセイにおける、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	6	0.039-0.15	0.08	0.04
S3L-AA2-OBI 構築体 45 (抗CD20)	1	0.055	0.055	N/A
S3L-0AA2-OBI 構築体 46 (抗CD20)	1	0.09	0.09	N/A
S3L-0A22-OBI2 構築体 47 (抗CD20)	1	0.043	0.043	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカーを含んだ。

【０３０８】

実施例１５．抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体による抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）の活性化

ＡＤＣＣレポーターアッセイ

抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体が、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体のアベルマブ（ａｖｅ

ｌｕｍａｂ）（バベンシオ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ））と比較して、ＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導し、ＡＤＣＣ活性を増強する度合いを検証するためのＡＤＣＣレポーターアッセイを開発した。アベルマブのＦａｂ配列（ＶＬ＋ＣＬ、ＶＨ＋ＣＨ１）を有する抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体４５、４６、および４７は、実施例４、５、および６に記載されるように生成されたした。各抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体、ならびにフコシル化および脱フコシル化されたアベルマブモノクローナル抗体を、以下のとおり実施されたＡＤＣＣレポーターアッセイにおいて検証した。

【０３０９】

標的ＨＥＫ－ＰＤ－Ｌ１細胞（１．２５ｘ１０^{4}細胞／ウェル）およびＪｕｒｋａｔ／ＦｃγＲＩＩＩａエフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ社）（７．４５ｘ１０^{4}細胞／ウェル）を、４％低ＩｇＧ血清（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中に再懸濁し、連続希釈した抗ＰＤ－Ｌ１構築体を含む９６ウェルプレートに播種した。５％ＣＯ２中、３７℃、６時間のインキュベーションを行った後、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳ照度計（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ社）を使用し、製造業者のプロトコールに従って、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を使用して発光を測定した。

【０３１０】

表１７に示されるように、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体のうちのいくつかは、ＡＤＣＣレポーターアッセイにおいてＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導した。ＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達の誘導は、このアッセイを使用して、Ｆｃ構築体４４、４５、および４７、ならびに脱フコシル化モノクローナル抗体について決定することができなかった。

【０３１１】

（表１７）ＡＤＣＣレポーターアッセイにおける、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体番号[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	5	0.037 - 0.056	0.049	0.008
IgG1抗体、脱フコシル化	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体 45 (抗PD-L1)	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体 46 (抗PD-L1)	1	0.029	0.029	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体 47 (抗PD-L1)	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカーを含んだ。

[2] データは、４パラメーターロジスティック（４ＰＬ）曲線に確実にはフィットすることができなかった。

【０３１２】

実施例１６：代替的な非対称分岐Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体

図８および図９の２つの異なるＦｃ構築体はそれぞれ、３個のＦｃドメインを有し、ヘテロ二量体化ドメイン変異の２個のセットを使用して３個の異なるポリペプチドからアセンブリされた。両方の構築体は、ポリペプチド鎖の非対称配置を使用するＦｃドメインの対称分布を有する分岐Ｆｃ構築体であり、各々は、構築体上で非対称的に分布される単一抗ＣＤ２０　Ｆａｂドメインを有する。図１８および１９は、静電ステアリング変異と組み合わせたノブイントゥホール変異を有するＦｃドメイン（複数可）と、静電ステアリング変異のみを有するＦｃドメイン（複数可）の相対位置が交換される、図８および９の構築体に対する代替物をそれぞれ示す。図２０および２１は、ポリペプチドの配列を表す。

【０３１３】

他の実施形態

この明細書中に記載したすべての公開公報、特許および特許出願は、あたかも独立の公開公報または特許出願それぞれが特別にかつ個別に示されて参照によって組み入れられるかのように、同じ程度まで参照することによってここに組み入れるものとする。

【０３１４】

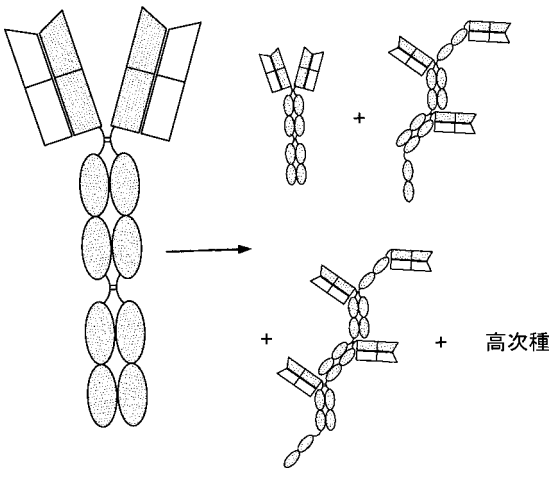
この開示について、その特定の実施形態に関連して説明したが、さらなる変形が可能であることと、この出願は、概してこの開示の原則に従い、かつ、この開示が関係する技術分野の範囲内で公知または通例である範囲にあり、先に述べた本質的な特徴に応用することができるような、この開示からの逸脱を含んだ、この開示の任意のバリエーション、使

用または適応を網羅することを意図し、請求項の範囲に従うものであることとが理解されるであろう。

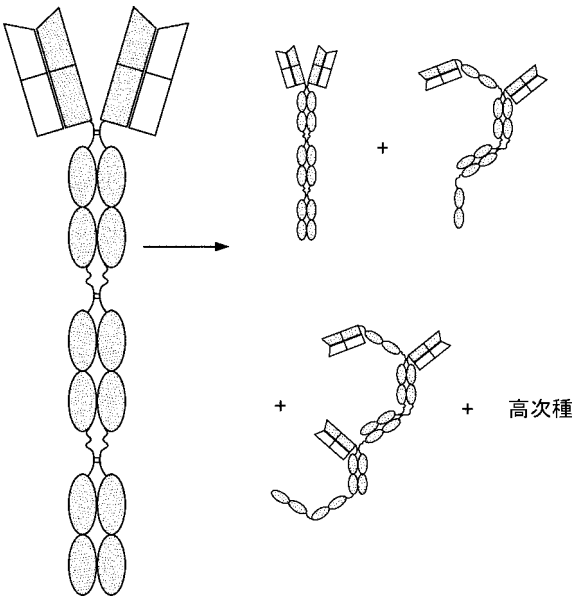
【０３１５】

他の実施形態は、特許請求の範囲の範囲内とする。

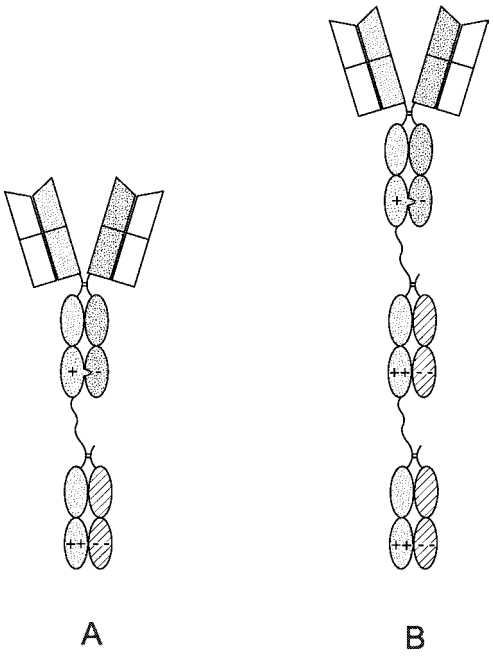
【図１】



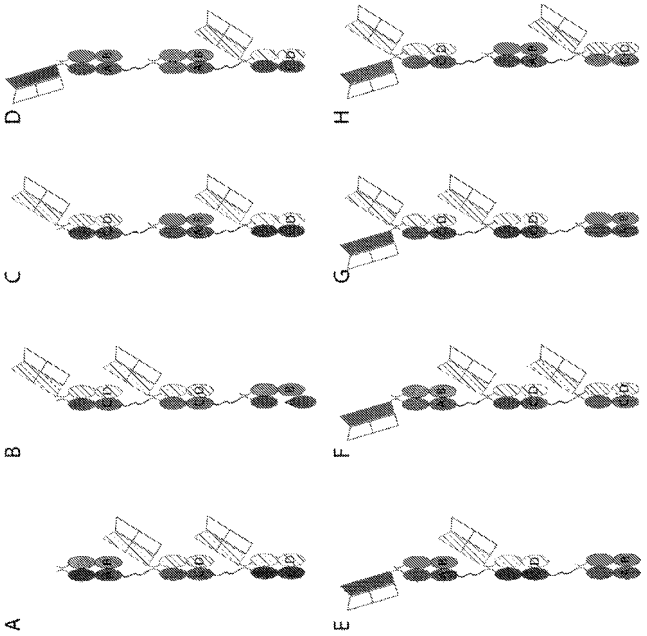
【図２】



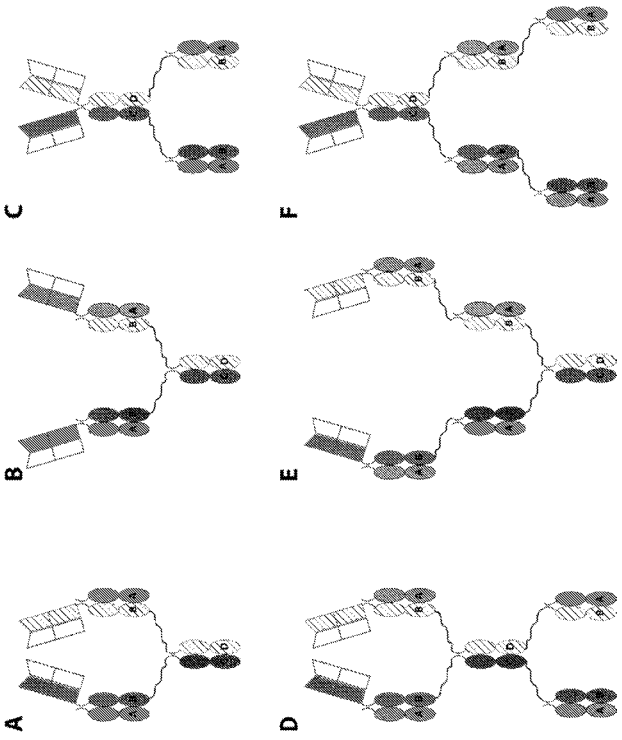
【図３】



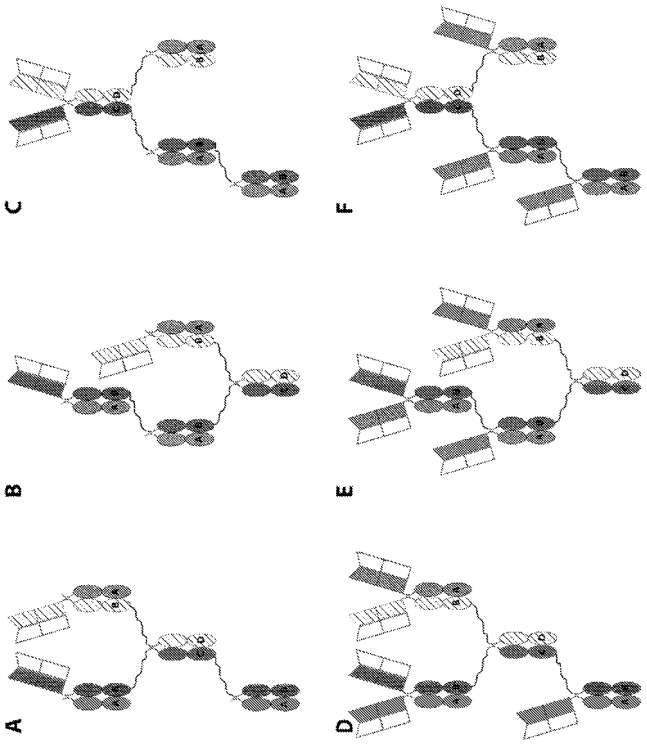
【図４】



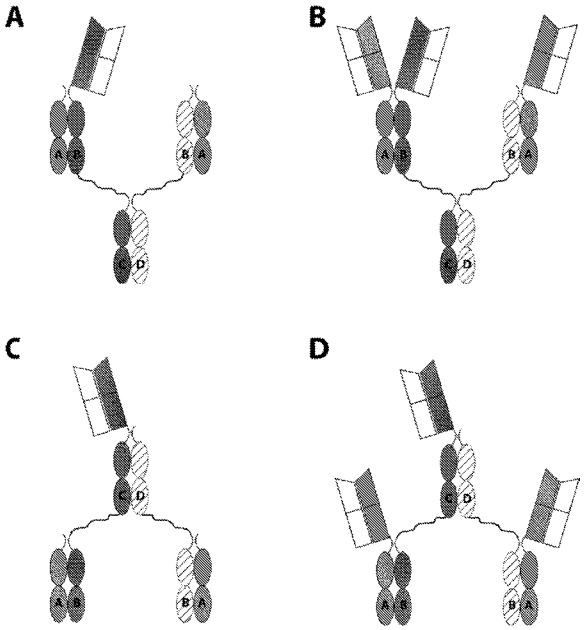
【図５】



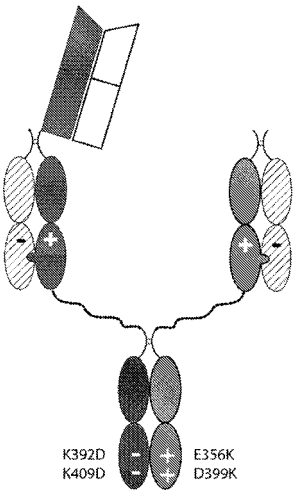
【図６】



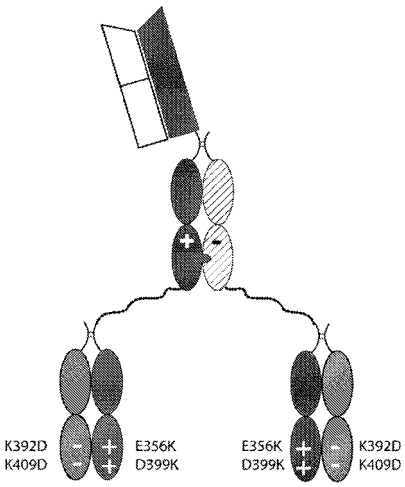
【図７】


A
B
C
D

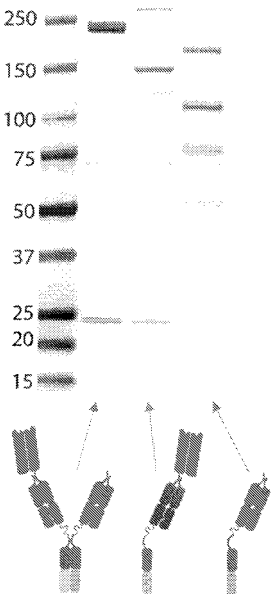
【図８】


K392D
K409D
E356K
D399K

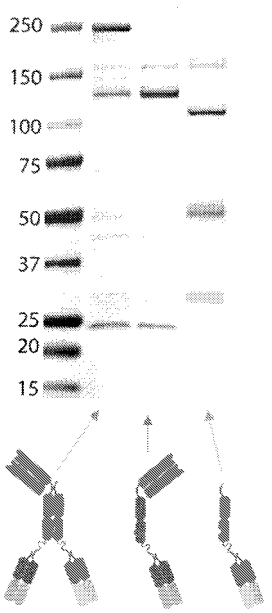
【図９】


K392D
K409D
E356K
D399K
E356K
D399K
K392D
K409D

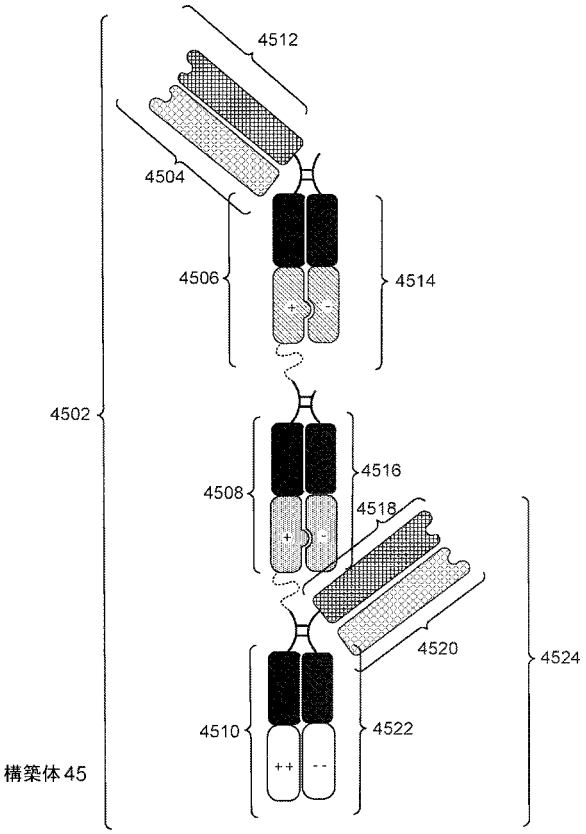
【図１０】


250
150
100
75
50
37
25
20
15

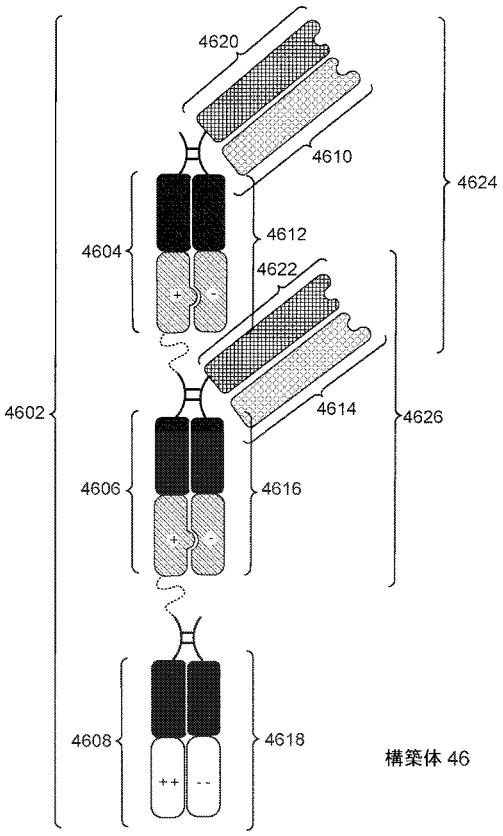
【図１１】



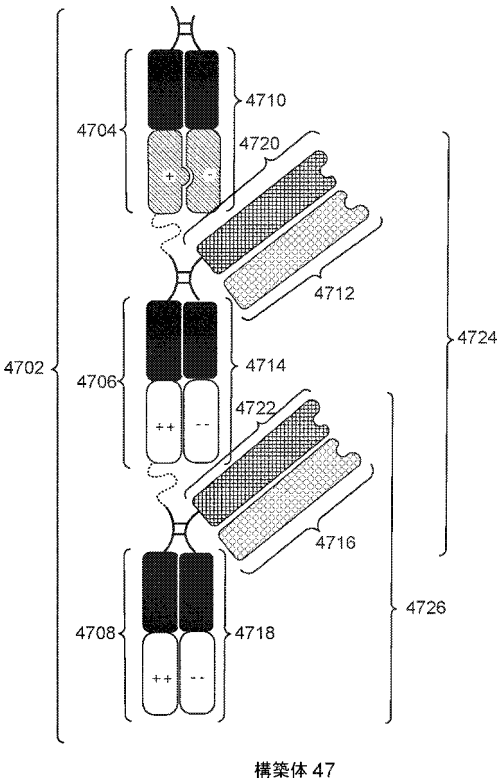
【図１２】



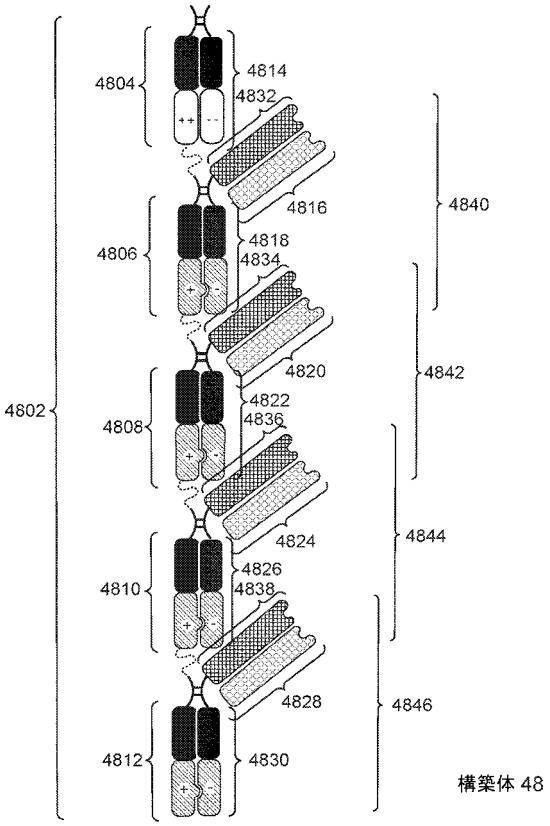
【図１３】



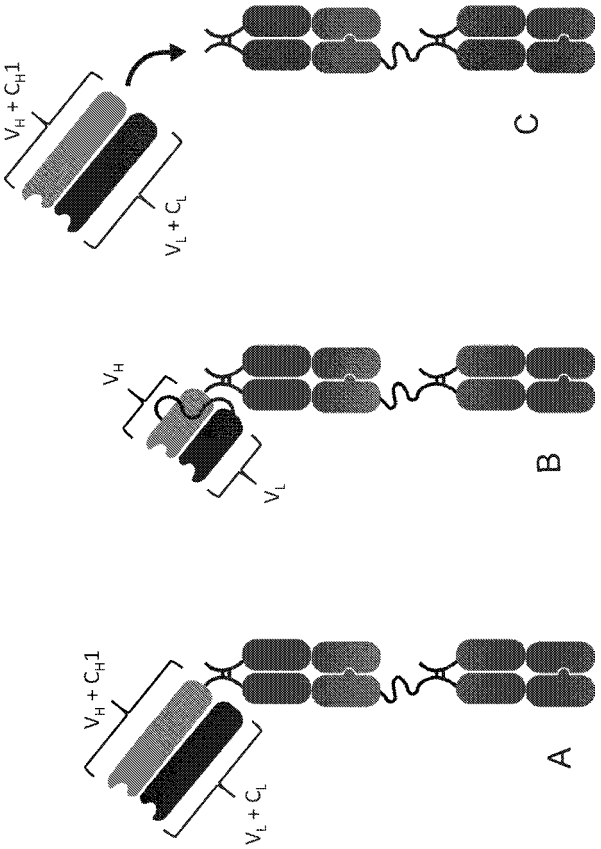
【図１４】



【図１５】

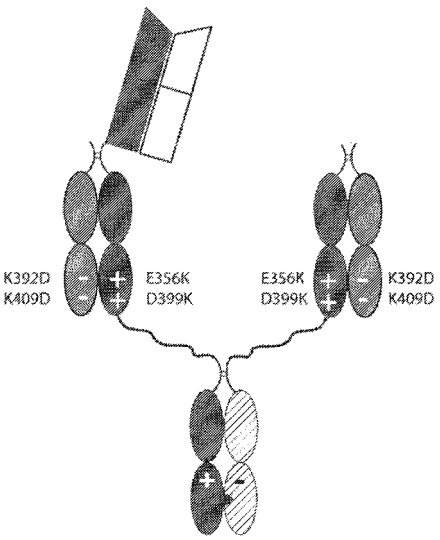


【図１６】



【図１７】

【図１８】



【図１９】

【図２０】

- HC1: Obi-356-Knb
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWVLVY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGQKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

- HC2: 356-hol
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGQKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

- SC1: 392
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG

- Obi LC:
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図２１】

- HC1: Obi-356-Knb
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY
WLVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGQKGGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

- HC2: 392-Knb
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

- ホール
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

- Obi LC:
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

【手続補正書】
【提出日】令和3年10月5日(2021.10.5)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第２のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第３のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む、ポリペプチドであって、
少なくとも１つのＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、
少なくとも１つの他のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個、２個、または３個の逆電荷変異を含む、
前記ポリペプチド。
【請求項２】
前記抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
前記抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項８】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項９】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、少

なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
第３のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＩｇＧ１ドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の突起形成変異を有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の逆電荷変異を有する、請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まない前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記逆電荷変異とは異なる逆電荷変異を含む、請求項１４に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
改変された突起を形成する前記変異、および前記逆電荷変異が、前記ＣＨ３ドメインにある、請求項１～１５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記変異が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１６に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１～１７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、ＧＧＧ

Ｓ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２０】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、グリシンスペーサーである、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２１】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが独立して、４～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０）、４～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５１）、８～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２）、８～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５３）、１２～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５４）または１２～３０個（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５）のグリシン残基からなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２２】

前記第２のリンカーおよび前記任意選択の第３のリンカーが、２０個のグリシン残基（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）からなる、請求項１に記載のポリペプチド。

【請求項２３】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む、請求項１～２２に記載のポリペプチド。

【請求項２４】

ＥＵのＩ２５３位の各アミノ酸変異が独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される、請求項２３に記載のポリペプチド。

【請求項２５】

Ｉ２５３位の各アミノ酸変異が、Ｉ２５３Ａである、請求項２４に記載のポリペプチド。

【請求項２６】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２７】

ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異が独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される、請求項２６に記載のポリペプチド。

【請求項２８】

Ｒ２９２位の各アミノ酸変異が、Ｒ２９２Ｐである、請求項２７に記載のポリペプチド。

【請求項２９】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６）およびＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１～２８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３０】

前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列

ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）

を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。

【請求項３１】

前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５８）
を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。
【請求項３２】
前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５８）
を有し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する、請求項２９に記載のポリペプチド。
【請求項３３】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３４】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３５】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３６】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３７】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３８】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ

ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４０】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４１】
前記単一アミノ酸置換が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される、請求項３３～４０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４３】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインにおける逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項４２に記載のポリペプチド。
【請求項４４】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項４２に記載のポリペプチド。
【請求項４５】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４６】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１、４～１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４７】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１～４６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４８】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１～４６のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項４９】
前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５０】
前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５１】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５２】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５３】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５４】
前記抗原結合ドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５５】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５６】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除く前記ＶＨドメイン配列および前記ＶＬドメイン配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５７】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む、請求項４８に記載のポリペプチド。
【請求項５８】
前記抗原結合ドメインが、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む、請求項１～４６に記載のポリペプチド。
【請求項５９】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる、請求項１～４６に記載のポリペプチド。
【請求項６０】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている請求項１～５９のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第２のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結

合されている、
前記ポリペプチド複合体。
【請求項６１】
前記第２のポリペプチド単量体が、改変された空洞を形成する変異を含む、請求項６０に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６２】
前記改変された空洞を形成する前記変異が、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される、請求項６１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６３】
前記第２のポリペプチド単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項６１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６４】
前記少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項６３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６５】
前記ポリペプチド複合体が、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドにさらに結合され、前記ポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第３のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、前記第２および第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合している、請求項６０～６４のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６６】
前記第３のポリペプチド単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項６５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６７】
前記少なくとも２個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項６６に記載のポリペプチド複合体。
【請求項６８】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２および第３のポリペプチド単量体が、異なる逆電荷変異を含む、請求項６５に記載のポリペプチド。
【請求項６９】
前記第２のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項６０～６８のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７０】
前記第３のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項６５～６９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７１】

前記ポリペプチドが、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む、請求項６０～６９にいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７２】
前記Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体が、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む、請求項７１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７３】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７４】
前記第２のポリペプチドが、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む、請求項７３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７５】
前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７６】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項６５～６７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７７】
単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む、請求項６０～７６のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項７８】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；第１のリンカー；ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体；任意選択の第２のリンカー；ならびにヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む任意選択の第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む、ポリペプチドであって、
少なくとも１つのＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、
少なくとも１つの他のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個、２個、または３個の逆電荷変異を含む、
前記ポリペプチド。
【請求項７９】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８０】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８１】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８２】
前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。
【請求項８３】

第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項８４】

第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項８５】

第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項８６】

第２のリンカーおよび第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含み、前記第１のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体および前記第２のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の両方が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＩｇＧ１ドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項８７】

改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドのＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の突起形成変異を有する、請求項７８～８６のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項８８】

逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が各々、同一の逆電荷変異を有する、請求項７８～８７のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項８９】

改変された突起を形成する変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項７８～８８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項９０】

改変された突起を形成する変異および少なくとも１個の逆電荷変異を含む前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、逆電荷変異を含むが突起形成変異を含まない前記ポリペプチドの前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記逆電荷変異とは異なる逆電荷変異を含む、請求項１４に記載のポリペプチド。

【請求項９１】

改変された突起を形成する前記変異、および前記逆電荷変異が、前記ＣＨ３ドメインにある、請求項７８～９０のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項９２】

前記変異が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項９１に記載のポリペプチド。

【請求項９３】

前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項７８～９２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項９４】

前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：

１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項９５】

前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、グリシンスペーサーである、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項９６】

前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが独立して、４～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０）、４～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５１）、８～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２）、８～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５３）、１２～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５４）、または１２～３０個（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５）のグリシン残基からなる、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項９７】

前記第１のリンカーおよび前記任意選択の第２のリンカーが、２０個のグリシン残基（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）からなる、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項９８】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＩ２５３位で単一アミノ酸変異を含む、請求項７８～９７に記載のポリペプチド。

【請求項１００】

ＥＵのＩ２５３位の各アミノ酸変異が独立して、Ｉ２５３Ａ、Ｉ２５３Ｃ、Ｉ２５３Ｄ、Ｉ２５３Ｅ、Ｉ２５３Ｆ、Ｉ２５３Ｇ、Ｉ２５３Ｈ、Ｉ２５３Ｉ、Ｉ２５３Ｋ、Ｉ２５３Ｌ、Ｉ２５３Ｍ、Ｉ２５３Ｎ、Ｉ２５３Ｐ、Ｉ２５３Ｑ、Ｉ２５３Ｒ、Ｉ２５３Ｓ、Ｉ２５３Ｔ、Ｉ２５３Ｖ、Ｉ２５３Ｗ、およびＩ２５３Ｙからなる群から選択される、請求項９８に記載のポリペプチド。

【請求項１０１】

Ｉ２５３位の各アミノ酸変異が、Ｉ２５３Ａである、請求項１００に記載のポリペプチド。

【請求項１０２】

前記Ｆｃドメイン単量体のうちの少なくとも１個が、ＥＵのＲ２９２位で単一アミノ酸変異を含む、請求項７８～１０１のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１０３】

ＥＵのＲ２９２位の各アミノ酸変異が独立して、Ｒ２９２Ｄ、Ｒ２９２Ｅ、Ｒ２９２Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｒ２９２Ｑ、Ｒ２９２Ｒ、Ｒ２９２Ｔ、およびＲ２９２Ｙからなる群から選択される、請求項１０２に記載のポリペプチド。

【請求項１０４】

Ｒ２９２位の各アミノ酸変異が、Ｒ２９２Ｐである、請求項１０３に記載のポリペプチド。

【請求項１０５】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６）およびＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項７８～１０４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０６】
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０７】
前記第１のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０８】
前記第１のＦｃドメイン単量体、前記第２のＦｃドメイン単量体、および前記第３のＦｃドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する、請求項１０６に記載のポリペプチド。
【請求項１０９】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１０】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１１】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１２】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ２ドメインが、同一であり、
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１３】
各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う

ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１４】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１５】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１６】

各Ｆｃドメイン単量体の前記ＣＨ３ドメインが独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ
ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１７】

前記単一アミノ酸置換が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ａ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から選択される、請求項１０９～１１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１８】

前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項７８～１０８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項１１９】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインにおける逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項１１８に記載のポリペプチド。

【請求項１２０】

前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１１８に記載のポリペプチド。

【請求項１２１】

改変された突起を形成する前記変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項７８に記載のポリペプチド。

【請求項１２２】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項７８～９１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１２３】
ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドに結合されている請求項７８～１２２のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第２のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合されている、
前記ポリペプチド複合体。
【請求項１２４】
前記第２のポリペプチド単量体が、改変された空洞を形成する変異を含む、請求項１２３に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２５】
前記改変された空洞を形成する前記変異が、Ｙ４０７Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｆ４０５Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｙ３４９Ｃ、Ｓ３６４Ｈ／Ｆ４０５Ａからなる群から選択される、請求項１２４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２６】
前記第２のポリペプチド単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１２４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２７】
前記少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１２６に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２８】
前記ポリペプチド複合体が、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドにさらに結合され、前記ポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの前記第１、第２、または第３のＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内および前記第３のポリペプチドの前記ヒンジドメイン内のシステイン残基間のジスルフィド結合により結合され、前記第２および第３のポリペプチドが、前記ポリペプチドの異なるＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体に結合する、請求項１２３～１２７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１２９】
前記第３のポリペプチド単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１２８に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３０】
前記少なくとも２個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１２９に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３１】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される少なくとも１個の逆電荷変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋからなる群から

選択される少なくとも２個の逆電荷変異を含み、前記第２および第３のポリペプチド単量体が、異なる逆電荷変異を含む、請求項１２８に記載のポリペプチド。
【請求項１３２】
前記第２のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１２３～１３１のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３３】
前記第３のポリペプチドが、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１２８～１３２のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３４】
前記ポリペプチドが、Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体、ならびにＤ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体を含む、請求項１２３～１３２にいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３５】
前記Ｓ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ変異を含む少なくとも１個のＦｃ単量体が、Ｅ３５７Ｋ変異をさらに含む、請求項１３４に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３６】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３７】
前記第２のポリペプチドが、Ｋ３７０Ｄ変異をさらに含む、請求項１３６に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３８】
前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１３９】
前記第２のポリペプチド単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含み、前記第３のポリペプチド単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１２８～１３０のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４０】
前記第２のポリペプチドが、抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２８～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４１】
前記第３のポリペプチドが、抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２８～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４２】
前記抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４３】
前記抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４４】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４５】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４６】

前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４７】
前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４８】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１４９】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５０】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５１】
前記抗原結合ドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５２】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットからのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５３】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメイン、ならびに表２に記載される抗体のＶＬ配列のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の配列を除く前記ＶＨドメイン配列および前記ＶＬドメイン配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列およびＶＬ配列に対して少なくとも９５％または９８％同一である、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５４】
前記抗原結合ドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列のセットを含む、請求項１４５に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５５】
前記抗原結合ドメインが、ＩｇＧ　ＣＬ抗体定常ドメインおよびＩｇＧ　ＣＨ１抗体定常ドメインを含む、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５６】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含み、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含むポリペプチドに結合してＦａｂを形成することができる、請求項１４０または１４１に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５７】
前記第２のポリペプチドが、第１の抗原結合ドメインをさらに含み、前記第３のポリペプチドが、第２の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１２３～１３９のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５８】
単一Ｆｃドメインおよび少なくとも１個の抗原結合ドメインを有するポリペプチド複合体と比較して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイ、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣ

Ｐ）、および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイにおいて、増強されたエフェクター機能を含む、請求項１２３～１５７のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。
【請求項１５９】
請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、核酸分子。
【請求項１６０】
請求項１５９に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。
【請求項１６１】
請求項１５９に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。
【請求項１６２】
請求項１６０に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１６３】
請求項１６１または請求項１６２に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現する条件下で培養する工程を含む、請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドを生成する方法。
【請求項１６４】
抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６５】
抗体ＶＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１６６】
抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６７】
抗体ＶＬドメインおよび抗体ＣＬドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１６８】
１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６１に記載の宿主細胞。
【請求項１６９】
１０個以下の単一アミノ酸変異を有するＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体を含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項１６２に記載の宿主細胞。
【請求項１７０】
前記ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン単量体が、前記ＣＨ３ドメイン中に１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下の単一アミノ酸変異を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１６８または１６９に記載の宿主細胞。
【請求項１７１】
請求項１～１５８のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項１７２】
前記ポリペプチドの４０％未満、３０％未満、２０％未満、１０％未満、５％未満、２％未満が、Ｆｃドメイン単量体上の少なくとも１個のフコース修飾を有する、請求項１７１に記載の薬学的組成物。
【請求項１７３】
（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに

（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第１のポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、
前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７４】
前記リンカーが、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２２）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１７３に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７５】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１７３に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７６】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１７５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７７】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１７８】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有する

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１７９】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項１７８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８０】

前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項１７９に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８１】

前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８２】

少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１７５および１７６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８３】

前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項１７５～１８２のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８４】

前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項１７５～１８３のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８５】

前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１７５～１８４のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８６】

前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８７】

前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８８】

前記抗原結合ドメインが、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む、請求項１７３～１８５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１８９】

前記抗原結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９０】

V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項１９１】

前記V_Hドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン

構築体。
【請求項１９２】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９３】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記V_H配列が、表２に記載される抗体の前記V_H配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９４】
前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列を含む、請求項１８８に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９５】
（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに
（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第１のポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、
前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９６】
前記リンカーが、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧ

ＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１９５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９７】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、改変された突起を形成する変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、少なくとも２個の逆電荷変異を含む、請求項１９５に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９８】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が、少なくとも１個の逆電荷変異をさらに含む、請求項１９７に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項１９９】
前記変異が、単一アミノ酸変化である、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２００】
前記Ｆｃドメイン単量体の各々が独立して、最大で１０個の単一アミノ酸置換を有するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２、４３、４５、および４７のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０１】
前記単一アミノ酸置換のうちの最大で６個が、前記ＣＨ３ドメインの逆電荷変異であるか、または改変された突起を形成する変異である、請求項２００に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０２】
前記単一アミノ酸置換が、ＥＵのＧ３４１位～ＥＵのＫ４４７位の両端を含む配列内にある、請求項２０１に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０３】
前記改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも１個が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０４】
少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項１９７および１９８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０５】
前記第１および第２のＦｃドメイン単量体が各々、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第３のＦｃドメイン単量体が、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項１９５～２０４のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０６】
前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項１９５～２０５のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０７】

前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項１９５～２０６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０８】
前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２０９】
前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１０】
前記抗原結合ドメインが、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む、請求項１９５～２０７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１１】
前記抗原結合ドメインが、ＶＬドメインをさらに含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１２】
ＶＬドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１３】
前記ＶＨドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１４】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１５】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記ＶＨ配列が、表２に記載される抗体の前記ＶＨ配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１６】
前記ＶＨドメインが、表２に記載される抗体のＶＨ配列を含む、請求項２１０に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１７】
（ａ）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、ならびに
（ｉｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（ｄ）前記第３のポリペプチドに結合されている抗原結合ドメインと
を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、
前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、

前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成する、
前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２１８】
前記リンカーが、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ

Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３９４Ｙ、Ｆ４０５Ｗ、Ｓ３５４Ｃ、Ｙ３４９Ｔ、およびＴ３９４Ｆからなる群から選択される、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２２６】

少なくとも１個の逆電荷変異が、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｋ３７０Ｄ、Ｋ３７０Ｅ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｒ、Ｅ３５７Ｋ、Ｅ３５７Ｒ、およびＤ３５６Ｋから選択される、請求項２１９および２２０のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２２７】

前記第１のＦｃドメイン単量体が、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、およびＥ３５７Ｋ変異を含み、前記第２および第３のＦｃドメイン単量体が各々、Ｄ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ変異を含む、請求項２１９～２２６のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２２８】

前記第４のＦｃドメイン単量体が、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖ、およびＫ３７０Ｄ変異を含む、請求項２１９～２２７のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２２９】

前記第５のＦｃドメイン単量体が、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ変異を含む、請求項２１９～２２８のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３０】

前記抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３１】

前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖである、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３２】

前記抗原結合ドメインが、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含む、請求項２１７～２２９のいずれか一項に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３３】

前記抗原結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３４】

V_Lドメインを含む第４のポリペプチドを含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３５】

前記V_Hドメインが、表１Ａおよび１Ｂに記載されるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列のセットを含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３６】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体の配列を含むＶＨドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３７】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３を含み、前記ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、およびＣＤＲ－Ｈ３の配列を除く前記V_H配列が、表２に記載される抗体の前記V_H配列に対して少なくとも９５％同一である、請求項２３２に記載のＦｃ－抗原結合ドメイン構築体。

【請求項２３８】

前記V_Hドメインが、表２に記載される抗体のV_H配列を含む、請求項２３２に記載の

Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体。
【請求項２３９】
以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；
前記抗原結合ドメインが、前記第１のポリペプチドおよび前記第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４０】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２３９に記載の方法。
【請求項２４１】
以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；
前記抗原結合ドメインが、前記第１のポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４２】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２４１に記載の方法。
【請求項２４３】

以下の工程を含む、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を製造する方法：
（ａ）（１）（ｉ）第１のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉ）第２のＦｃドメイン単量体、
（ｉｉｉ）第３のＦｃドメイン単量体、
（ｉｖ）前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第２のＦｃドメイン単量体を連結するリンカー、
（ｖ）前記第２のＦｃドメイン単量体を前記第３のＦｃドメイン単量体に連結するリンカー
を含む、第１のポリペプチドと、
（２）第４のＦｃドメイン単量体を含む第２のポリペプチドと、
（３）第５のＦｃドメイン単量体を含む第３のポリペプチドと、
（４）抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養する工程であって、
前記第１のＦｃドメイン単量体および前記第４のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第１のＦｃドメインを形成し、前記第２のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第２のＦｃドメインを形成し、前記第３のＦｃドメイン単量体および前記第５のＦｃドメイン単量体が組み合わされて第３のＦｃドメインを形成し；
前記抗原結合ドメインが、前記第３のポリペプチドに連結され、それによりＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を形成する、工程；ならびに
（ｂ）前記細胞培養上清から前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製する工程。
【請求項２４４】
前記細胞培養上清中の前記Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも５０％が、構造的に同一である、請求項２４３に記載の方法。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００１】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その内容を参照により本明細書に組み込む。前記ＡＳＣＩＩコピーは２０１９年８月３０日に作成され、その名前は「１４１３１－０１８３ＷＯ１＿ＳＬ．ｔｘｔ」であり２５１，４３５バイトのサイズである。
開示の背景
多くの治療用抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ：ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ）、および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ：ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）など、Ｆｃドメインのエフェクター機能を介して自然免疫系の因子をリクルートすることにより機能する。治療用タンパク質の改善に対するニーズは未だ存在する。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１４
【補正方法】変更
【補正の内容】

【００１４】
いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、グリシンスペーサーである。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは独立して、４～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０）、４～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５１）、８～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２）、８～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５３）、１２～２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５４）または１２～３０個（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５）のグリシン残基からなる。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび任意選択の第３のリンカーは、２０個のグリシン残基（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）からなる。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１７】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のヒンジは独立して、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６）およびＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５８）
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列

ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５８）
を有し、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１８】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１９】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥ

ＱＩＤＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３６】
いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーは、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱＩＤＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーは、グリシンスペーサーである。いくつかの実施形態では、第１のリンカーおよび任意選択の第２のリンカーが独立して、４～３０（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５０）、４～２０（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５１）、８～３０（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５２）、８～２０（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５３）、１２～２０（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５４）または１２～３０個（ＳＥＱＩＤＮＯ：２５５）のグリシン残基からなる。いくつかの実施形態では、第２のリンカーおよび

任意選択の第３のリンカーは、２０個のグリシン残基（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）からなる。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３９】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のヒンジは独立して、
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６）およびＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、第２のＦｃドメイン単量体および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン単量体、第２のＦｃドメイン単量体、および第３のＦｃドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７）
を有する。
【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４０】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは独立して、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、２個以下の単一アミノ酸の置換を伴う
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ２ドメインは、同一であり、
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）
のアミノ酸配列を含む。

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４１】
いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、１０個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、８個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、６個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、各Ｆｃドメイン単量体のＣＨ３ドメインは独立して、５個以下の単一アミノ酸置換を伴う
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）
のアミノ酸配列を含む。

【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６１】
いくつかの実施形態では、リンカーは、
ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎ

Ｏ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６８】
いくつかの実施形態では、リンカーは、
ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７４】
いくつかの実施形態では、リンカーは、
ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３）、ＧＧＧＧＳ

（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３）、ＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４）、ＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７）、ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８）、ＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１０）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４９）、ＧＥＮＬＹＦＱＳＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８）、ＳＡＣＹＣＥＬＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９）、ＲＳＩＡＴ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０）、ＲＰＡＣＫＩＰＮＤＬＫＱＫＶＭＮＨ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１）、ＧＧＳＡＧＧＳＧＳＧＳＳＧＧＳＳＧＡＳＧＴＧＴＡＧＧＴＧＳＧＳＧＴＧＳＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３２）、ＡＡＡＮＳＳＩＤＬＩＳＶＰＶＤＳＲ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３）、ＧＧＳＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＥＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５）、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８）、ＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６）、ＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９）、ＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０）、ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２１）およびＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２２）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８６】
定義：
本明細書に使用される場合、「Ｆｃドメイン単量体」という用語は、少なくともヒンジドメイン、ならびに第２および第３の抗体定常ドメイン（C_H2およびC_H3）、またはそれらの機能性断片（例えば、少なくともヒンジドメインまたはその機能性断片、ＣＨ２ドメインまたはその機能性断片、およびＣＨ３ドメインまたはその機能性断片）（例えば、（ｉ）別のＦｃドメイン単量体と二量体形成してＦｃドメインを形成し、そして（ｉｉ）Ｆｃ受容体に結合することができる断片）を含むポリペプチド鎖を指す。好ましいＦｃドメイン単量体は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、ＩｇＧ１ヒンジ、ＩｇＧ１ ＣＨ２ドメインおよびＩｇＧ１ ＣＨ３ドメインの少なくとも一部分を含む。したがって、Ｆｃドメイン単量体、例えば、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃドメイン単量体は、Ｅ３１６～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｐ３１７～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３１８～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３１８～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｓ３１９～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｃ３２０～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｄ３２１～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３２２～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｔ３２３～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｋ３２３～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｈ３２４～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、Ｔ３２５～Ｇ４４６もしくはＫ４４７、またはＣ３２６～Ｇ４４６もしくはＫ４４７にわたることができる。Ｆｃドメイン単量体は、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはＩｇＤを含む、任意の免疫グロブリン抗体アイソタイプとすることが可能である（例えば、ＩｇＧ）。さらに、Ｆｃドメイン単量体は、ＩｇＧサブタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）であり得る（例えば、ヒトＩｇＧ１）。ヒトＩｇＧ１ Ｆｃドメイン単量体が、本明細書に記載される実施例において使用される。ヒトＩｇＧ１の完全ヒンジドメインは、ＥＵナンバリングＥ３１６～Ｐ２３０またはＬ２３５にわたり、ＣＨ２

ドメインは、Ａ２３１またはＧ２３６～Ｋ３４０にわたり、ＣＨ３ドメインは、Ｇ３４１～Ｋ４４７にわたる。ヒンジドメインの最後のアミノ酸の位置については異なる見解がある。それは、Ｐ２３０またはＬ２３５のいずれかである。本明細書の多くの実施例では、ＣＨ３ドメインはＫ３４７を含まない。ゆえにＣＨ３ドメインは、Ｇ３４１～Ｇ４４６であってもよい。本明細書の多くの実施例では、ヒンジドメインは、Ｅ２１６～Ｌ２３５を含み得る。これは、例えば、ヒンジがＣＨ１ドメインまたはＣＤ３８結合ドメインに対してカルボキシ末端であるときに当てはまる。例えばヒンジがポリペプチドのアミノ末端であるときなどのいくつかの例では、ＥＵナンバリング２２１のＡｓｐは、Ｇｌｎに変異される。Ｆｃドメイン単量体は、抗原認識領域、例えば可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）として機能することが可能である、免疫グロブリンの部分を何も含まない。Ｆｃドメイン単量体は、野生型（例えば、ヒト）Ｆｃドメイン単量体配列からの変更を１０程度（例えば、１～１０、１～８、１～６、１～４のアミノ酸置換、付加、または欠失）含有することが可能であり、該変更は、ＦｃドメインとＦｃ受容体との間の相互作用を変える。Ｆｃドメイン単量体は、野生型Ｆｃドメイン単量体配列（例えば、１～１０、１～８、１～６、１～４のアミノ酸置換、付加または欠失）からの変更（例えば、単一アミノ酸置換）を１０程度含有することが可能であり、当該変更は、Ｆｃドメイン単量体間の相互作用を変える。特定の実施形態では、以下のヒトＩｇＧ１　ＣＨ３ドメイン配列と比較して、ＣＨ３ドメイン上に、最大で１０、８、６または５個の単一アミノ酸置換が存在する：ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６０）。好適な変更の例は、この技術分野で公知である。

【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０９】
本明細書で使用される場合、「グリシンスペーサー」という用語は、２つのＦｃドメイン単量体を直列に連結する、グリシンのみを含有するリンカーを指す。グリシンスペーサーは、少なくとも４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９）、８（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０）、または１２個（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）のグリシン（例えば、４～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０）、８～３０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２）、または１２～３０個のグリシン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５）、例えば、１２～３０個（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０）、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０個のグリシン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５０））を含有し得る。いくつかの実施形態では、グリシンスペーサーは、
ＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７）
の配列を有する。本明細書で使用される場合、「アルブミン結合ペプチド」という用語は、血清アルブミンに対する親和性および血清アルブミンを結合する機能を有する１２～１６のアミノ酸のアミノ酸配列を指す。アルブミン結合ペプチドは、例えばヒト、マウスまたはラットである様々な起源のものとすることが可能である。本開示のいくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドが、Ｆｃドメイン単量体のＣ末端に融合され、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の血清半減期が増加する。アルブミン結合ペプチドは、直接またはリンカーを介して、Ｆｃドメイン単量体のＮ末端またはＣ末端と融合することが可能である。

【手続補正１６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２９】
【図１】（同一のポリペプチド鎖を一緒に結合させることにより形成される）２個のＦｃドメインを有するタンデム構築体、およびタンデムＦｃ配列のオフレジスター（ｏｆｆ－ｒｅｇｉｓｔｅｒ）会合により生成された結果として生じる種の一部を示す概略図である。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。
【図２】（同一のポリペプチド鎖を一緒に結合させることにより形成される）ペプチドリンカーにより接続される３個のＦｃドメインを有するタンデム構築体、およびタンデムＦｃ配列のオフレジスター会合により生成された結果として生じる種の一部を示す概略図である。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。
【図３】図３Ａおよび３Ｂは、リンカーにより接続され、直交性ヘテロ二量体形成ドメインを使用して組み立てられた、２個のＦｃドメイン（図３Ａ）または３個のＦｃドメイン（図３Ｂ）を有するＦｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ノブおよび空洞を示して、ノブイントゥホール対を示すために、突起を有するＣＨ３楕円形が示される。プラスおよび／またはマイナス印は、ＣＨ３ドメイン中の静電的ステアリング変異を示すために使用される。
【図４】図４Ａ～Ｈは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用してアセンブリされた、タンデムな複数のＦｃドメインを含むＦｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。
【図５】図５Ａ～Ｆは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の対称的に分布されたＦｃドメインを含む分岐Ｆｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。
【図６】図６Ａ～Ｆは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の非対称的に分布されたＦｃドメインを含む分岐Ｆ

ｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図７】図７Ａ～Ｄは、直交性ヘテロ二量体化ドメインを使用するポリペプチド鎖の非対称配置によってアセンブリされる複数の対称的に分布されたＦｃドメインおよび非対称的に分布されたＦａｂ（複数可）を含む分岐Ｆｃ構築体の概略図である。固有のポリペプチド鎖の各々は、異なる陰影が付けられている。Ｆａｂ部分（ＶＨ＋ＶＬ）の可変ドメインは、平行四辺形として示され、Ｆａｂ部分の定常ドメイン（ＣＨ１＋ＣＬ）は、矩形として示され、Ｆｃ部分のドメイン（ＣＨ２およびＣＨ３）は、楕円形として示され、リンカーは、破線として示され、ヒンジジスルフィドは、平行線の対として示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第１のセットを利用するＦｃドメインは、ＡおよびＢと示される。ドメインのＦｃ単量体中のヘテロ二量体化変異の第２のセットを利用するＦｃドメインは、ＣおよびＤと示される。

【図８】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む分岐工ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図９】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図１０】図８のＦｃ構築体にアセンブリするポリペプチドをコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示す。最も左のレーン（レーン１）内の２００ｋＤａのバンドの存在は、意図されるＦｃ構築体の形成を示す。

【図１１】図９のＦｃ構築体にアセンブリするポリペプチドをコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示す。２００ｋＤａよりもわずかに高い分子量を有する最も左のレーン（レーン１）内のバンドの存在は、意図されるＦｃ構築体の形成を示す。

【図１２】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインと含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４５）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４５０２）は、C_H3荷電アミノ酸置換（４５１０）の第１のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体と、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H3荷電アミノ酸置換（複数可）（４５０８および４５０６）の第２のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換を有し、Ｎ末端でV_Hドメイン（４５１２）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２のポリペプチド（４５２４）は、荷電アミノ酸置換（４５１０）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）（４５２２）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４５１８）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第３および第４のポリペプチド（４５１６および４５１４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４５０８および４５０６）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H3荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４５０４および４５２０）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１３】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４６）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４６０２）は、C_H3荷電アミノ酸置換（４６０８）の第１のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体と、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H3荷電アミノ酸置換（複数可）（４６０６および４６０４）の第２のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換を有し、直列に連続してスペーサ

ーによって結合される。第２のポリペプチド（４６１８）は、荷電アミノ酸置換（４６０８）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含む。第３および第４のポリペプチド（４６２６および４６２４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４６０６および４６０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４６２２および４６２０）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。V_L含有ドメイン（４６１４および４６１０）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１４】３個のＦｃドメインおよび２個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４７）の説明図である。構築体は、４個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４７０２）は、２個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、C_H３荷電アミノ酸置換（４７０８および４７０６）の第１のセットと、任意にC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）（４７０４）の第２のセットを含む突起形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体とを含み、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２および第３のポリペプチド（４７２６および４７２４）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４７０８および４７０６）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４７２２および４７２０）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第４のポリペプチド（４７１０）は、荷電アミノ酸置換（４７０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４７１２および４７１６）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１５】５個のＦｃドメインおよび４個の抗原結合ドメインを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体（構築体４８）の説明図である。構築体は、６個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。第１のポリペプチド（４８０２）は、４個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、任意にC_H３荷電アミノ酸置換（複数可）（４８１２、４８１０、４８０８、および４８０６）の第１のセットを含む同じ突起形成アミノ酸置換と、C_H３荷電アミノ酸置換（４８０４）の第２のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体とを含み、直列に連続してスペーサーによって結合される。第２、第３、第４、および第５のポリペプチド（４８４６、４８４４、４８４２、および４８４０）はそれぞれ、荷電アミノ酸置換（４８１２、４８１０、４８０８、および４８０６）の第１のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進するＣＨ３荷電アミノ酸置換（複数可）（４８３０、４８２６、４８２２、および４８１８）のセットを任意に含む、空洞形成アミノ酸置換を有する１個のＦｃドメイン単量体を含み、Ｎ末端でV_Hドメイン（４８３８、４８３６、４８３４、および４８３２）を含む抗原結合ドメインに、直列に連続して結合される。第６のポリペプチド（４８１４）は、荷電アミノ酸置換（４８０４）の第２のセットを含む第１のポリペプチドのＦｃドメイン単量体との好ましい静電相互作用を促進する荷電アミノ酸置換（複数可）のセットを含む１個のＦｃドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（４８１６、４８２０、４８２４、および４８２８）は、各V_Hドメインに結合される。

【図１６】図１６Ａ～Ｃは、抗原結合ドメインがＦｃ構築体のＦｃドメインに結合され得る３つの例示的な方法の概略図である。図１６Ａは、抗原結合ドメインの重鎖構成要素が、Ｆｃ鎖の融合タンパク質として発現され得ることと、軽鎖構成要素が、別個のポリペプチドとして発現され得ることを示す。図１６Ｂは、長鎖Ｆｃの融合タンパク質として発現されるｓｃＦｖを示す。図１６Ｃは、別個に発現され、外因的に付加され、化学結合でＦｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合される重鎖構成要素および軽鎖構成要素を示す。

【図１７】図１７Ａは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きである。図１７Ｂは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）を示す。両端を含むＥ２１６～Ｃ２２０を欠いたヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きであり、Ｋ４４７を欠く。図１７Ｃは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きであり、そして４４７Ｋを欠く。図１７Ｄは、ＥＵナンバリングを用いたヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２）を示す。両端を含むＥ２１６～Ｃ２２０を欠いたヒンジ領域は二重下線によって示され、ＣＨ２ドメインは下線がなく、そしてＣＨ３領域は下線付きである。

【図１８】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図１９】非対称的分岐Ｆｃ構築体の発現を示すために使用される、単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体の概略図である。

【図２０】図１８に示されるものなどの単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体を作成するために使用され得るポリペプチドのアミノ酸配列（記載の順に、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２５～３２６、２３６、および６１）を示す。

【図２１】図１８に示されるものなどの単一の非対称的に分布されたＦａｂを含む代替的な分岐抗ＣＤ２０構築体を作成するために使用され得るポリペプチドのアミノ酸配列（記載の順に、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２５、３２７、４８、および６１）を示す。

【手続補正１７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１４５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１４５】
（表１Ｂ）可変ドメイン配列

抗体	VH/CH1	VL
アテゾリズマブ（Atezolizumab） PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVA WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARRHW PGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:261）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV STAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC（SEQ ID NO:266）
デュバルマブ（Durvalumab） PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:262）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC（SEQ ID NO:267）
トレメリムマブ（Tremelimumab） CTLA-4	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIN SYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFN RGEC（SEQ ID NO:268）

抗体	VH/CH1	VL
	GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K（SEQ ID NO:263）	
イサツキシマブ（Isatuximab） CD38	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKAS GYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIG TIYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKS SKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGDY YGSNSLDYWGQGTSVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO:264）	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDV STVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGV PDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYY CQQHYSPPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC（SEQ ID NO:269）
MOR 202 CD38	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVS GISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLP LVYTGFAYWGQGTLVTV （SEQ ID NO:265） (VH のみ)	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHY YVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC QTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ（SEQ ID NO:270）

【手続補正１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１９９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１９９】
いくつかの実施形態では、２つのＦｃドメイン単量体間のスペーサーは、グリシン残基のみを含有し、例えば、少なくとも４つのグリシン残基（例えば、４～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７１）、４～１８０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７２）、４～１６０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７３）、４～１４０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７４）、４～４０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７５）、４～１００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７６）、４～９０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７７）、４～８０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７８）、４～７０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７９）、４～６０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８０）、４～５０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８１）、４～４０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７５）、４～３０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５０）、４～２０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５１）、４～１９（

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８２）、４～１８（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８３）、４～１７（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８４）、４～１６（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８５）、４～１５（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８６）、４～１４（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８７）、４～１３（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８８）、４～１２（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８９）、４～１１（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９０）、４～１０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９１）、４～９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９２）、４～８（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９３）、４～７（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９４）、４～６（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９５）または４～５（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９６）グリシン残基）（例えば、４～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２７１）、６～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９７）、８～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９８）、１０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９９）、１２～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３００）、１４～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０１）、１６～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０２）、１８～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０３）、２０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０４）、３０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０５）、４０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０６）、５０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０７）、６０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０８）、７０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３０９）、８０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１０）、９０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１１）、１００～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１２）、１２０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１３）、１４０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１４）、１６０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１５）、１８０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１６）、または１９０～２００（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１７）のグリシン残基）を含有する。ある実施形態では、スペーサーは、４～３０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５０）のグリシン残基（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５０）のグリシン残基）を有する。いくつかの実施形態では、グリシン残基のみを含有するスペーサーは、グリコシル化（例えば、Ｏ～結合型グリコシル化、Ｏ～グリコシル化とも称する）されていないものであり得るか、または、例えば、１つ以上のセリン残基を含有するスペーサー（例えば、ＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８））と比較して、低減されたレベルのグリコシル化（例えば、低減されたレベルのＯ－グリコシル化）（例えば、キシロース、マンノース、シアル酸、フコース（Ｆｕｃ）および／またはガラクトース（Ｇａｌ）等のグリカン（例えば、キシロース）による低減したレベルのＯ－グリコシル化）を有し得る。

【手続補正１９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２２４】
いくつかの例では、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、１つ以上の精製用ペプチドに連結して、例えば全細胞溶解混合物からの、Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体の精製および単離を促進することが可能である。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドは、精製用ペプチドに対して特異的な親和性を有する別の部分と結合する。いくつかの実施形態では、精製用ペプチドと特異的に結合するこうした部分は、基剤、樹脂またはアガロースビーズ等の固相支持体に付加する。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体に結合され得る精製用ペプチドの例としては、ヘキサヒスチジンペプチド（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３８）、ＦＬＡＧペプチド、ｍｙｃペプチドおよび赤血球凝集素（ＨＡ）ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。ヘキサヒスチジンペプチド（ＨＨＨＨＨＨ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３８））は、マイクロモル親和性をもつニッケル官能性アガロースアフィニティーカラムと結合する。いくつかの実施形態では、ＦＬＡＧペプチドは、配列ＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＳＥＱ

ＩＤ　ＮＯ：３９）を含む。いくつかの実施形態では、ＦＬＡＧペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９）、例えば３×ＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１８）を含む。いくつかの実施形態では、ｍｙｃペプチドは、配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０）を含む。いくつかの実施形態では、ｍｙｃペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０）、例えば３×ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１９）を含む。いくつかの実施形態では、ＨＡペプチドは、配列ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）を含む。いくつかの実施形態では、ＨＡペプチドは、直列にした、整数倍にした配列ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）、例えば３×ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２０）を含む。ＦＬＡＧ、ｍｙｃまたはＨＡの精製用ペプチドに対して特異的に認識かつ結合する抗体は、この技術分野で周知であり、しばしば市販されている。これらの抗体により機能化された固相支持体（例えば、基剤、樹脂またはアガロースビーズ）を用いて、ＦＬＡＧ、ｍｙｃまたはＨＡペプチドを含むＦｃ－抗原結合ドメイン構築体を精製することができる。

【手続補正２０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２５０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２５０】
（表８）図８および９に示される構築体の配列

構築体	軽鎖	長鎖 Fc (抗 CD20VH および CH1 を有する)	第 2 の長鎖 Fc (抗 CD20 VH および CH1 なし)	短鎖 Fc
図 8 の構築体 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 321 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRKE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGQ	SEQ ID NO: 322 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYDTTPPVLDSDGSFF LYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	SEQ ID NO: 48 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
図 9 の構築体 (CD-20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL	SEQ ID NO: 321 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA	SEQ ID NO: 323 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL	SEQ ID NO: 236 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYDTTPPVL

	SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRKE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGQ	DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLKSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGQ	DSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

【手続補正２１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２６８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２６８】
実施例６　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４７の設計および精製
　Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体は、フォールディング効率を上昇させ、望ましくない高分子量オリゴマーおよび多量体を生成し得るサブユニットの非制御的な会合を最小化させるよう設計され、そして実質的に均質な（例えば少なくとも８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％均質な）医薬用途用組成物が作製されるように設計される。これらの目的を踏まえて、タンデムＦｃドメイン（図１４）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製された。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４７（ＣＤ２０）および構築体４７（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（長鎖Ｆｃ（それぞれ、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２４および２４３）；抗ＣＤ２０短鎖ＦＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７）または抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ短鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４３）である第１の短鎖Ｆｃの２個のコピー；および第２の短鎖Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３）のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの２個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、３個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット（ヘテロ二量体化変異）および／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第３のＦｃドメイン単量体は、第１および第２のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗原結合ドメインを含む。第２の

短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第２のセットおよび／または表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第１の短鎖Ｆｃ中の変異の第１のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【手続補正２２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２７０】
（表１１）構築体４７（ＣＤ２０）および構築体４７（ＰＤ－Ｌ１）の配列

構築体	長鎖	長鎖 Fc	第 1 の短鎖 Fc (抗 CD20 または抗 PD-L1 VH および CH1 を有する)	第 2 の短鎖 Fc
構築体 47 (CD20)	SEQ ID NO: 61 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: <u>324</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLKSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGQKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRKELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGQ	SEQ ID NO: 247 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
構築体 47 (PD-L1)	SEQ ID NO: 49 QSALTQPASVSGSPGQSITIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSNRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSST RVFGTGTKVTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVC	SEQ ID NO: 243 EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARIKL GTVTTVDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG	SEQ ID NO: <u>63</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT	SEQ ID NO: 63 DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT

	LISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSDLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	KNQVSLSCAVDGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

【手続補正２３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２７６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２７６】
実施例７　抗ＣＤ２０抗原結合ドメインまたは抗ＰＤ－Ｌ１抗原結合ドメインを有するＦｃ－抗原結合ドメイン構築体４８の設計および精製
タンデムＦｃドメイン（図１５）から形成された非分岐構築体は、以下に記載されるように作製される。Ｆｃ－抗原結合ドメイン構築体４８（ＣＤ２０）および構築体４８（ＰＤ－Ｌ１）は各々、３個の別個のＦｃ単量体含有ポリペプチド（長鎖Ｆｃ；抗ＣＤ２０短鎖ＦＣまたは抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ短鎖である第１の短鎖Ｆｃの４個のコピー；および第２の短鎖Ｆｃの１個のコピー）、および抗ＣＤ２０軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６１）または抗ＰＤ－Ｌ１軽鎖ポリペプチド（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）のいずれかの４個のコピーをそれぞれ含む。長鎖Ｆｃは、５個のＦｃドメイン単量体を含み、各々が、直列で連続して、表３から選択される突起形成変異のセット（ヘテロ二量体化変異）、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異を含む（第１、第２、第３、および第４のＦｃドメイン単量体は、第５のＦｃドメイン単量体とは異なるヘテロ二量体形成変異のセットを有する）。第１の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第１のセット、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第２の短鎖Ｆｃ中の変異の第２のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体、ならびにＮ末端で抗原結合ドメインを含む。第２の短鎖Ｆｃは、表３から選択される空洞形成変異の第２のセット、および任意に表４から選択される１個以上の逆電荷変異（変異は第１の短鎖Ｆｃ中の変異の第１のセットとは異なる）を含むＦｃドメイン単量体を含む。

【手続補正２４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９１】
（表１２）Ｄａｕｄｉ細胞における、ＣＤＣを誘導する抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体の能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	5	38－65	47	11
S3L-AA2-OBI 構築体 45 (抗CD20)	2	0.50－0.57	0.54	0.046
S3L-0AA2-OBI 構築体 46 (抗CD20)	4	0.20－0.25	0.23	0.025
S3L-0A22-OBI2 構築体 47 (抗CD20)	4	0.16－0.21	0.18	0.027

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んだ。

【手続補正２５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９５】
（表１３）ＰＤ－Ｌ１発現ＨＥＫ細胞においてＣＤＣを誘導する抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体の能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	7	CDC活性 なし[2]	CDC活性 なし[2]	N/A
IgG1抗体、 脱フコシル化	1	CDC活性 なし2	CDC活性 なし2	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体45 (抗PD-L1)	1	CDC活性 なし[2]	CDC活性 なし[2]	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体46 (抗PD-L1)	1	決定されず	決定されず	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体47 (抗PD-L1)	2	1.4－2.7	1.6	1.1

[1] すべての構築体は、特に記載がない限りＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んでいた。

[2] 構築体は、アッセイ条件下で測定可能なＣＤＣを生成しなかった。

【手続補正２６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２９９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２９９】
（表１４）ＡＤＣＰレポーターアッセイにおける、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	6	4.5 - 10.8	7.1	2.2
IgG1抗体、 脱フコシル化	3	5.5 - 6.1	5.8	0.3
S3L-AA2-OBI 構築体45 (抗CD20)	1	0.13	0.13	N/A
S3L-0AA2-OBI 構築体46 (抗CD20)	1	0.17	0.17	N/A
S3L-0A22-OBI2 構築体47 (抗CD20)	1	0.08	0.08	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んだ。

【手続補正２７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０３】
（表１５）ＡＤＣＰレポーターアッセイにおける、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体番号[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	6	効果なし[2]	効果なし[2]	N/A
IgG1抗体、 脱フコシル化	1	効果なし[2]	効果なし[2]	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体45 (抗PD-L1)	1	0.031	0.031	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体46 (抗PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体47 (抗PD-L1)	1	0.03	0.03	N/A

[1] すべての構築体は、特に記載がない限りＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んでいた。

[2] 構築体は、アッセイ条件下で測定可能なＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導しなかった。

【手続補正２８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３０７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３０７】
（表１６）ＡＤＣＣレポーターアッセイにおける、抗ＣＤ２０　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、 フコシル化	6	0.039-0.15	0.08	0.04
S3L-AA2-OBI 構築体45 (抗CD20)	1	0.055	0.055	N/A
S3L-0AA2-OBI 構築体46 (抗CD20)	1	0.09	0.09	N/A
S3L-0A22-OBI2 構築体47 (抗CD20)	1	0.043	0.043	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んだ。

【手続補正２９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１１】
（表１７）ＡＤＣＣレポーターアッセイにおける、抗ＰＤ－Ｌ１　Ｆｃ構築体のＦｃγＲＩＩＩａシグナル伝達を誘導する能力

構築体番号[1]	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
IgG1抗体、フコシル化	5	0.037 - 0.056	0.049	0.008
IgG1抗体、脱フコシル化	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A
S3L-AA2-AVE 構築体 45 (抗PD-L1)	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A
S3L-AA2-2AVE 構築体 46 (抗PD-L1)	1	0.029	0.029	N/A
S3L-A22-2AVE 構築体 47 (抗PD-L1)	1	決定されず[2]	決定されず[2]	N/A

[1] 別段の記載がない限り、すべての構築体はＧ２０リンカー（配列番号２３）を含んだ。

[2] データは、４パラメーターロジスティック（４ＰＬ）曲線に確実にはフィットすることができなかった。

【手続補正３０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2021531757000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41492

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/395; C07K 14/435, 16/46 (2019.01)

CPC - A61K 39/395; C07K 14/435, 16/46

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)
See Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2014/138449 A1 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC., et al.) 12 September 2014; paragraphs [0009], [000280], [000288], [000342], [000343], [000381], [000400]; Table 5; Claim 18	1-4, 19, 45, 78-79, 94, 121 ---- 20-22
X -- Y	WO 2017/205434 A1 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.) 30 November 2017; page 2, lines 7-9, lines 29-32	78, 95-97 ---------- 20-22
P, X	WO 2018/129397 A1 (MOMENTA PHARMAECUTALS, INC.) 12 July 2018; entire document	1-4, 19-22, 45, 78-79, 94-97, 121

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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 November 2019 (20.11.2019)	06 DEC 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41492

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 13-18, 23-44, 46-77, 88-93, 98, 100-120, 122-172, 177-194, 199-216, 221-238
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-12, 19-22, 45, 78-87, 94-97, 121, a polypeptide encompassing a first IgG1 Fc domain monomer comprising a S345C mutation forming a protuberance, and a second IgG1 Fc domain comprising to reverse charge mutations (polypeptide) are directed toward polypeptides comprising Fc domain monomers comprising a hinge domain, a CH2 domain, and a CH3 domain.

-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 19-22, 45, 78-79, 94-97, 121; a polypeptide encompassing a first IgG1 Fc domain monomer comprising a S345C mutation forming a protuberance, and a second IgG1 Fc domain comprising reverse charge mutations (polypeptide)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41492

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

The polypeptides will be searched to the extent they encompass a polypeptide encompassing a first IgG1 Fc domain monomer comprising a S345C mutation forming a protuberance, and a second IgG1 Fc domain comprising to reverse charge mutations (first exemplary polypeptide). Applicant is invited to elect additional polypeptide(s), with, where applicable, specified substitution(s) at specified site(s) in the Fc monomer(s) thereof, such that each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-4 (each in-part), 19-22 (each in-part), 45 (in-part), 78-79 (each in-part), 94-97 (each in-part), and 121 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a polypeptide encompassing first IgG1 Fc domain monomer comprising a S345C mutation forming a protuberance, a second IgG1 Fc domain comprising to reverse charge mutations (polypeptide). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a polypeptide encompassing a first IgG1 Fc domain monomer comprising a S345C mutation forming a protuberance, and a second IgG1 Fc domain comprising to reverse charge mutations, a third linker, and a third IgG1 Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (polypeptide).

Group II, Claims 173-176, 239, and 240 are directed toward an Fc-antigen binding domain construct comprising three polypeptides, wherein the antigen binding domain is joined to the first and third polypeptides; and a method of manufacturing the construct.

Group III, Claims 195-198, 241, and 242 are directed toward an Fc-antigen binding domain construct comprising three polypeptides, wherein the antigen binding domain is joined to the first and second polypeptides; and a method of manufacturing the construct.

Group IV, Claims 217-220, 243, and 244 are directed toward an Fc-antigen binding domain construct comprising three polypeptides, wherein the antigen binding domain is joined to the third polypeptide, and the second and fifth Fc domain monomers form an Fc domain; and a method of manufacturing the construct.

The inventions listed as Groups I+ and II-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a hinge domain, a CH2 domain, and a CH3 domain, not present in any other Groups; the special technical features of Group II include an antigen binding domain joined to the first polypeptide and to the third polypeptides, not present in any other Group; the special technical features of Group III include an antigen binding domain joined to the first polypeptide and to the second polypeptide, not present in any other Groups; the special technical features of Group IV include wherein the second Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, not present in any other Groups.

Groups I+ and II-IV share the technical features including: Fc-antigen binding domain construct comprising: a) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer, ii) a second Fc domain monomer, a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; and an antigen-binding domain. Groups II-IV share the technical features including: an Fc-antigen binding domain construct comprising: a) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer, ii) a second Fc domain monomer, iii) a third Fc domain monomer, iii) a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; and iv) a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer; b) a second polypeptide comprising a fourth Fc domain monomer; c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; and d) an antigen binding domain joined to at least one polypeptide; wherein the first Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain; and wherein the third Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain; and a method of manufacturing an Fc-antigen binding domain construct, the method comprising: a) culturing a host cell expressing: (1) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer, ii) a second Fc domain monomer, iii) a third Fc domain monomer, iv) a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; v) a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer; (2) a second polypeptide comprising a fourth Fc domain monomer; (3) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; and (4) an antigen binding domain; wherein the first Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain, and the third Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain; wherein the antigen binding domain is joined to at least one polypeptide, thereby forming an Fc-antigen binding domain construct; and b) purifying the Fc-antigen binding domain construct from the cell culture supernatant. Groups II and III share the technical features including: wherein the antigen-binding domain is joined to the first polypeptide; and wherein the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain. Groups II and IV share the technical features including: wherein the antigen-binding domain is joined to the third polypeptide.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2017/205434 A1 to Momenta Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter 'Momenta') in view of WO 2018/107082 A1 to Gliknik, Inc. (hereinafter 'Gliknik').

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41492

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

Momenta discloses an Fc-antigen binding domain construct (an Fc-domain construct comprising an antigen-recognition region (an Fc-antigen binding domain construct); page 1, lines 15-17, page 28, lines 22-25) comprising: a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer (comprising: a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 2, lines 7-9), ii) a second Fc domain monomer (a second Fc domain monomer; page 2, lines 7-9), a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer (a glycine spacer (linker) joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer page 2, lines 7-9); and an antigen-binding domain (an antigen-binding domain; page 28, lines 22-25, page 31, lines 19-20); an Fc-antigen binding domain construct (an Fc-domain construct comprising an antigen-recognition region (an Fc-antigen binding domain construct); page 1, lines 15-17, page 28, lines 22-25) comprising: a) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer (comprising: a) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), ii) a second Fc domain monomer (a second Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), iii) a third Fc domain monomer (a third Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), iii) a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer (a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; page 9, lines 6-9); and iv) a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer (a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer; page 9, lines 6-9); b) an additional polypeptide comprising an additional Fc domain monomer (a third (additional) polypeptide comprising a seventh (additional) Fc domain monomer; page 9, lines 11-12); c) a further polypeptide comprising a further Fc domain monomer (a fourth (further) polypeptide comprising an eighth (further) Fc domain monomer; page 9, lines 12-13); and d) an antigen binding domain (an antigen-binding domain; page 28, lines 22-25, page 31, lines 19-20); wherein the first Fc domain monomer and the seventh Fc domain monomers combine to form a first Fc domain (wherein A (the first Fc domain monomer) and the seventh Fc domain monomers combine to form a first Fc domain; page 9, lines 14-15); and wherein the third Fc domain monomer and the eighth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain (wherein C (the third Fc domain monomer) and the eighth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain; page 9, lines 15-16); and a method of manufacturing an Fc-antigen binding domain construct (a method of manufacturing an Fc domain construct comprising an antigen-binding region (an Fc-antigen binding domain construct); page 28, lines 19-22; page 28, lines 22-25), the method comprising: a) culturing a host cell expressing (the method comprising: a) culturing a host cell expressing; page 26, lines 19-22): a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), ii) a second Fc domain monomer (a second Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), iii) a third Fc domain monomer (a third Fc domain monomer; page 9, lines 6-9), iii) a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer (a linker joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; page 9, lines 6-9); and iv) a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer (a linker joining the second Fc domain monomer to the third Fc domain monomer; page 9, lines 6-9); b) an additional polypeptide comprising an additional Fc domain monomer (a third (additional) polypeptide comprising a seventh (additional) Fc domain monomer; page 9, lines 11-12); c) a further polypeptide comprising a further Fc domain monomer (a fourth (further) polypeptide comprising an eighth (further) Fc domain monomer; page 9, lines 12-13); and d) an antigen binding domain (an antigen-binding domain; page 28, lines 22-25, page 31, lines 19-20), thereby forming an Fc-antigen binding domain construct (thereby forming an Fc-domain construct comprising an antigen binding domain (an Fc-antigen binding domain construct); page 26, lines 19-22; page 28, lines 22-25); and b) purifying the Fc-antigen binding domain construct from the cell culture supernatant (recovering (purifying) purifying the Fc-domain construct comprising an antigen-binding domain (Fc-antigen binding domain construct) from the cell culture supernatant; page 26, lines 19-22; page 81, line 3). Momenta further illustrates non-linked chain termination regions (non-linked chain termination regions; illustrated as non-connected chain extensions of elements 1604, 1612, 1618, 1620, 1622, and 1624 in Figure 16, for example).

Momenta does not disclose b) a second polypeptide comprising a fourth Fc domain monomer; c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; an antigen binding domain joined to at least one polypeptide; wherein the first Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain; and wherein the third Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain; wherein the antigen-binding domain is joined to the first polypeptide; wherein the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain; wherein the antigen-binding domain is joined to the third polypeptide.

Gliknik discloses a multi-Fc construct (a multi-Fc construct; paragraph [0015]), comprising a first polypeptide comprising more than one Fc domain monomers (comprising a first polypeptide comprising a first and a second (more than one) Fc domain monomers; paragraph [0015]), a second polypeptide chain comprising a further, individual, Fc domain monomer (a second polypeptide chain comprising a third (further, individual) Fc domain monomer; paragraph [0015]), and a third polypeptide comprising an additional, individual, Fc domain monomer (a third polypeptide comprising a fourth (additional, individual) Fc domain monomer; paragraph [0015]); wherein the first Fc domain monomer combines with the third Fc domain monomer to form an Fc domain (wherein the first Fc domain monomer combines with the third Fc domain monomer to form an Fc domain; paragraph [0015]), and the second Fc domain monomer combines with the fourth Fc domain monomer to form a second Fc domain (second Fc domain monomer combines with the fourth Fc domain monomer to form a second Fc domain; paragraph [0015]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Momenta to have provided wherein the antigen binding region was attached or joined to one or more free chain termination ends on any of the Fc domain constructs, based on the disclosure of Momenta, in order to more readily produce a functional binding domain either by single attachment, or multiple attachment points with the corresponding association of binding domain chains (e.g. antibody heavy and light chains) to produce a construct with a functional antigen binding domain, and desired Fc-domains having, or lacking, desired effector functions, to produce effective immune modulation. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Momenta to have provided a single polypeptide comprising a plurality of Fc-domains, such as three, as disclosed by Momenta, in combination with additional polypeptides, each comprising only one corresponding Fc domain monomer, as disclosed by Gliknik, in order to produce Fc domains using specific pairs, such as the first domain and fourth domain, the second domain, and the fourth domain or fifth domain, and the third domain and the fifth domain, in order to modulate the composition of the Fc domains to alter receptor affinity or effector functions, to produce effective immune modulation.

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41492

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

Groups I+ share the technical features including: a polypeptide comprising an antigen binding domain; a linker; a first IgG1 Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; a second linker; a second IgG1 Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain, wherein at least one Fc domain monomer comprises mutations forming an engineered protuberance, and wherein at least one other Fc domain monomer comprises at least one, two or three reverse charge mutations.

However, these shared technical features are previously disclosed by Momenta, as above.

Momenta discloses a polypeptide comprising an antigen binding domain (a polypeptide comprising an antigen binding domain; page 9, lines 6-9; page 28, lines 22-25); a linker (page 9, lines 6-9); a first IgG1 Fc domain monomer (a first IgG1 Fc domain monomer; page 2, lines 38-39, page 3, lines 1-2; page 9, lines 6-9) comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 2, lines 38-39, page 3, lines 1-2; page 9, lines 6-9); a second linker (a second linker; page 9, lines 6-9); a second IgG1 Fc domain monomer (a second IgG1 Fc domain monomer; page 2, lines 38-39, page 3, lines 1-2; page 9, lines 6-9) comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 2, lines 38-39, page 3, lines 1-2; page 9, lines 6-9), wherein at least one Fc domain monomer comprises mutations forming an engineered protuberance (wherein at least one Fc domain monomer comprises mutations forming an engineered protuberance; page 8, lines 22-28), and wherein at least one other Fc domain monomer comprises at least one, two or three reverse charge mutations (wherein at least one other Fc domain monomer comprises at least one, two or three reverse charge mutations; page 9, lines 31-37).

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II-IV inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Momenta and Gliknik references, unity of invention is lacking.

Claim 99 is objected to under PCT Rule 66.2(a)(iii) as containing the following defect(s) in the form or contents thereof: there is no claim in the application enumerated as Claim 99.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｃ０７Ｋ	*1/14*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	1/14		
Ａ６１Ｋ	*47/68*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	

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

(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　ランシング　ジョナサン　シー.
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ビニー　ストリート　３０１
(72)発明者　オルティス　ダニエル
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ビニー　ストリート　３０１
(72)発明者　グプタ　アビナブ
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ビニー　ストリート　３０１

Ｆターム(参考)　4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C076 AA95 EE41 EE59
4C085 AA14 AA15 CC23 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA76 EA20 FA74 GA22 GA23
GA26