

(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2021-532085

(P2021-532085A)

(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)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C O 8 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 333 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-500801 (P2021-500801)	(71) 出願人	508134441
(86) (22) 出願日	令和1年7月11日 (2019.7.11)		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
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月10日 (2021.3.10)		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
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/041293	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02020/014413		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	令和2年1月16日 (2020.1.16)	(74) 代理人	100095360
(31) 優先権主張番号	62/696,754		弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成30年7月11日 (2018.7.11)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	62/743,976	(74) 代理人	100149010
(32) 優先日	平成30年10月10日 (2018.10.10)		弁理士 星川 亮
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C T L A - 4 を標的とする改変された F c 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】

C T L A - 4 結合ドメインおよび2つ以上の F c ドメインを有する F c 抗原結合構築体は、そのような構築体を使用するための方法とともに記載される。かかる構築体を構成するポリペプチドも記載される。それらの構築体中に含まれる F c ドメイン単量体は、ホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成を促進するアミノ酸置換を含み得る。

【選択図】 図 1

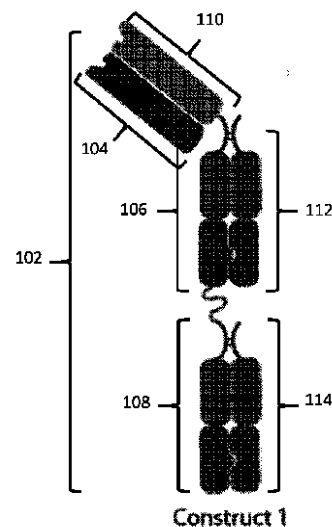


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C T L A 4 結合ドメインと、リンカーによって第 2 の F c ドメインに結合された第 1 の F c ドメインとを含む F c 抗原結合ドメイン構築体であって、前記第 1 および第 2 の F c ドメインの各々が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2】

C T L A 結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体；第 2 のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 2 の I g G 1 F c 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、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む任意選択の第 3 の I g G 1 F c 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 2 つの F c ドメイン単量体が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含み、前記第 2 の I g G 1 F c 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 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記第 1 の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 2 の I g G 定常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 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体、前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体、および前記第 3 の I g G 1 F c 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む、
請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 2 の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、
請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 3 の I g G 1 F c 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 2 の I g G 1 ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、
請求項 2 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

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20に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 Aである、請求項 2 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 2 ～ 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 2 5】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 Pである、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 6】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L 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 2 ～ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 7】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 2 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L を有し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 0】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 3 1】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 3 2】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 3】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 35】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 36】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK

20

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 37】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 38】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択される、請求項 30～37 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 39】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 2～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 40】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、前記 C H 3 ドメイン内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 39 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、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 39 に記載のポリペプチド。

【請求項 42】

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 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F

50

からなる群から選択される、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 3】

前記 2 つまたは 4 つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される、請求項 5、6、および 9～29 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、s c F v である、請求項 2～43 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含む、請求項 2～43 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 6】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V L ドメインをさらに含む、請求項 43 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 7】

前記 V H ドメインが、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列のセットを含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 8】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 9】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列を除き、表 2 に記載の抗体の V H 配列と少なくとも 95% または 98% 同一である、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列を含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列のセットを含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 2】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットからの C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V L ドメインを含み、前記 V H ドメイン配列および V L ドメイン配列が、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 95% または 98% 同一である、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含む、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、I g G C L 抗体定常ドメインおよび I g G C H 1

10

20

30

40

50

抗体定常ドメインを含む、請求項 2～43 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 56】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み、V L ドメインおよび C L ドメインを含むポリペプチドに結合して、F a b を形成することができる、請求項 2～43 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

前記第 1 または第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される請求項 2～56 のいずれか一項に記載のポリペプチドの 2 つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

【請求項 58】

ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む I g G 1 F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドに結合される請求項 2～56 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、

前記ポリペプチドと前記第 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 I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内のシステイン残基と前記第 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との間のジスルフィド結合によって結合される、

ポリペプチド複合体。

【請求項 59】

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 58 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 60】

前記改変された空洞を形成する前記変異が、Y 4 0 7 T、Y 4 0 7 A、F 4 0 5 A、T 3 9 4 S、T 3 9 4 W/Y 4 0 7 A、T 3 6 6 W/T 3 9 4 S、T 3 6 6 S/L 3 6 8 A/Y 4 0 7 V/Y 3 4 9 C、S 3 6 4 H/F 4 0 5 A からなる群から選択される、請求項 59 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 61】

前記第 2 のポリペプチドが、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 58～60 のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 62】

C T L A 4 結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体；第 2 のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 2 の I g G 1 F c 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、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む任意選択の第 3 の I g G 1 F c 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 F c ドメイン単量体が、1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む、ポリペプチド。

【請求項 63】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項 62 に記載のポリペプチド。

【請求項 64】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項 62 に記載のポリペプチド。

【請求項 65】

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される 2 つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される 4 つの逆電荷変異のセットを含み、前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 A および表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項 62 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 66】

前記第1の IgG1 Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の IgG1 Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4BAおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項 67】

前記第1の IgG1 Fcドメイン単量体および前記第2の IgG定常ドメイン単量体の両方が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項62に記載のポリペプチド。

10

【請求項 68】

第3のリンカーと、第3の IgG1 Fcドメイン単量体と、を含み、

前記第1の IgG1 Fcドメイン単量体、前記第2の IgG1 Fcドメイン単量体、および前記第3の IgG1 Fcドメイン単量体が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項 69】

第3のリンカーと、第3の IgG1 Fcドメイン単量体と、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、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第3の IgG1 Fcドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

20

【請求項 70】

第3のリンカーと、第3の IgG1 Fcドメイン単量体と、を含み、

前記第1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、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の IgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

30

【請求項 71】

第3のリンカーと、第3の IgG1 Fcドメイン単量体と、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、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第1の IgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

40

【請求項 72】

表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む前記 IgG1 Fcドメイン単量体が、同一の CH3ドメインを有する、請求項62～71のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 73】

表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異が、CH3ドメインにある、請求項62～72のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 74】

前記変異が、EUのG341位～EUのK447位（両端を含む）の配列内にある、請求項73に記載のポリペプチド。

50

【請求項 7 5】

前記変異が各々、単一アミノ酸変化である、請求項 6 2～7 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7 6】

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、
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGS, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
 GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGS GGS, GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS, GGS G, GGS G,
 GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS, GENLYFQSGG, SACYCELS,
 RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
 AAANSSIDLISVPVDSR, GGS GGS GSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS,
 GGS GGS GGS GGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGS GGS GGS GGS GGS GGS, GGGG,
 GGGGGGGGG, GGGGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

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 7 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 7】

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 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 8】

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 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 9】

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 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 0】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUの I 2 5 3 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 6 2～7 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 1】

EUの I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択される、請求項 8 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 2】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 A である、請求項 8 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 3】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUの R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 6 2～8 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8 4】

EUの R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 8 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 5】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 P である、請求項 8 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 6】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L からなる群から選択されるアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含むか、またはそれからなる、請求項 62～85 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 87】

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 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

【請求項 88】

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 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

【請求項 89】

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 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L 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 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 90】

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 91】

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

【請求項 92】

各 Fc ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 93】

各 Fc ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 94】

各 Fc ドメイン単量体の前記 C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

40

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 95】

各 Fc ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

50

【請求項 96】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 97】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 98】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択される、請求項 90～97 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 99】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 100】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、前記 C H 3 ドメイン内の逆電荷変異である、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 101】

前記単一アミノ酸置換が、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 102】

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 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択される、請求項 62 に記載のポリペプチド。

【請求項 103】

前記 2 つまたは 4 つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される、請求項 65、66、および 69～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 104】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、s c F v である、請求項 62～103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 105】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含む、請求項 62～103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 106】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V L ドメインをさらに含む、請求項 103 に記載のポリペプチド。

【請求項 107】

前記 V H ドメインが、表 1 に記載の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3

10

20

30

40

50

配列のセットを含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 108】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 109】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 配列を除き、表 2 に記載の抗体の V H 配列と少なくとも 95% または 98% 同一である、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 110】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 111】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 1 に記載される C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列のセットを含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 112】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットからの C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 113】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含む V H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含む V L ドメインを含み、前記 V H ドメイン配列および V L ドメイン配列が、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 95% または 98% 同一である、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 114】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 115】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、I g G C L 抗体定常ドメインおよび I g G C H 1 抗体定常ドメインを含む、請求項 62 ~ 103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 116】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み、V L ドメインおよび C L ドメインを含むポリペプチドに結合して、F a b を形成することができる、請求項 62 ~ 103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 117】

前記第 1 または第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される請求項 2 ~ 56 のいずれか一項に記載のポリペプチドの 2 つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

【請求項 118】

ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む I g G 1 F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドに結合される請求項 62 ~ 116 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、

前記ポリペプチドと前記第 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 I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内のシステイン残基と前記第 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との間のジスルフィド結合によって結合される、

10

20

30

40

50

ポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 9】

前記第 2 のポリペプチド単量体が、1、2、または 3 つの逆電荷変異を含む、請求項 1 1 8 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 0】

前記第 2 のポリペプチド単量体が、表 4 から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷変異を含み、かつポリペプチド中の表 4 から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷変異に対して相補的である、請求項 1 1 9 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 1】

前記第 2 のポリペプチドが、最大 1 0 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 2】

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 ドメイン単量体と、第 2 のリンカーと、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 ドメイン単量体と、任意選択の第 3 のリンカーと、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 ドメイン単量体とを含む、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む、ポリペプチド。

【請求項 1 2 3】

前記第 1 の IgG1 単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびCH₁ドメインをさらに含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 4】

前記第 1 の IgG1 単量体のアミノ末端に scFv をさらに含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 5】

前記第 1 の IgG1 Fc ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つ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 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 6】

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、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 7】

前記第 1 の IgG1 Fc ドメイン単量体および前記第 2 の IgG 定常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 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 8】

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

【請求項 1 2 9】

第 3 のリンカーと、第 3 の IgG1 Fc ドメイン単量体と、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 Fc ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 130】

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G 1 F c 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2の I g G 1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
請求項 122 に記載のポリペプチド。

【請求項 131】

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G 1 F c 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1の I g G 1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
請求項 122 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 132】

改変された突起を形成する変異を含む前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷変異をさらに含む、請求項 122 ～ 131 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 133】

前記改変された突起を形成する変異および前記逆電荷変異が、前記 C H 3 ドメイン内にある、請求項 122 ～ 131 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 134】

ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第1の I g G 1 F c ドメイン単量体と、第2のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第2の I g G 1 F c ドメイン単量体と、任意選択の第3のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む任意選択の第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と
を含む、ポリペプチドであって、

20

少なくとも1つの F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸修飾を含む、ポリペプチド。

【請求項 135】

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよび C H 1 ドメインをさらに含む、請求項 134 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 136】

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体のアミノ末端に s c F v をさらに含む、請求項 134 に記載のポリペプチド。

【請求項 137】

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表 6 中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 B から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項 134 に記載のポリペプチド。

【請求項 138】

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項 134 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 139】

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 定常ドメイン単量体の両方が、表 4 B から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項 134 に記載のポリペプチド。

【請求項 140】

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、

50

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体、前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体、および前記第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体が各々、表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項 1 3 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 1】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表 4 A または表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第 3 の I g G 1 ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される 2 つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される 4 つの逆電荷変異のセットを含む、
請求項 1 3 4 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 4 2】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表 4 A または表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第 2 の I g G 1 ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される 2 つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される 4 つの逆電荷変異のセットを含む、
請求項 1 3 4 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 1 4 3】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表 4 A または表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第 1 の I g G 1 ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される 2 つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される 4 つの逆電荷変異のセットを含む、
請求項 1 3 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 4】

表 4 A または 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、同一の C H 3 ドメインを有する、請求項 1 3 4 ～ 1 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 1 4 5】

表 4 から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異が、C H 3 ドメインにある、請求項 1 3 4 ～ 1 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 6】

前記変異が、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4 7】

前記変異が各々、単一アミノ酸変化である、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 1 4 8】

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、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
 GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGS, GSGS,
 GSGSGSGS, GSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS,
 RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
 AAANSSIDLISVPVDSR, GSGSGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS,
 GGGSGGGSGGGGS, SGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGSGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGG,
 GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGG

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 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 4 9】

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 ～ 3 0、4 ～ 2 0、8 ～ 3 0、8 ～ 2 0、1 2 ～ 2 0、または 1 2 ～ 3 0 個のグリシン残基からなる、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 0】

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、2 0 個のグリシン残基からなる、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 1】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の I 2 5 3 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

【請求項 1 5 2】

E U の I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択される、請求項 1 5 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 3】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 A である、請求項 1 5 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 4】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 1 5 5】

E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 1 5 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 6】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 P である、請求項 1 5 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 7】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L 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 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 1 5 8】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H

50

T C P P C P A P E Lを有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E Lを有し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L Lを有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 1】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 2】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 5】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 6】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 7】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、1 0 個以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 8】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 9】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 0】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 1】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択される、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 1 7 2】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 1 0 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 3】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、前記 C H 3 ドメイン内の逆電荷変異である、請求項 9 9 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 1 7 4】

前記単一アミノ酸置換が、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 1 7 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 5】

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 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択される、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 6】

前記 2 つまたは 4 つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 1 7 8】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 1 に記載の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 配列のセットを含む、請求項 1 2 3、1 2 4、1 3 5、および 1 3 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 9】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含む、請求項 1 2 3、1 2 4、1 3 5、および 1 3 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 1 8 0】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 の配列を除き、表 2 に記載の抗体の V H 配列と少なくとも 9 5 % または 9 8 % 同一である、請求項 1 2 3、1 2 4、1 3 5、および 1 3 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 8 1】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の V H 配列を含む、請求項 1 2

50

3、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項182】

前記VHドメインまたはscFvが、表1に記載のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3配列のセットを含む、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項183】

前記VHドメインまたはscFvが、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列のセット由来のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3配列を含む、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項184】

前記VHドメインまたはscFvメインが、表2に記載の抗体のVH配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むVHドメインと、表2に記載の抗体のVL配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むVLドメインと、を含み、前記VHドメイン配列および前記VLドメイン配列が、前記CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を除き、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列と少なくとも95%または98%同一である、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項185】

前記VHドメインまたはscFvが、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列のセットを含む、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

【請求項186】

IgG CL抗体定常ドメインと、IgG CH1抗体定常ドメインと、をさらに含む、請求項122～145のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項187】

請求項2～187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188】

請求項187に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項189】

請求項187に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

30

【請求項190】

請求項188に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項191】

請求項189または請求項190に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現させる条件下で培養することを含む、請求項2～187のいずれか一項に記載のポリペプチドを産生する方法。

【請求項192】

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189に記載の宿主細胞。

40

【請求項193】

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190に記載の宿主細胞。

【請求項194】

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189に記載の宿主細胞。

【請求項195】

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190に記載の宿主細胞。

【請求項196】

50

10 個以下の単一アミノ酸修飾を有する I g G 1 F c 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 189 に記載の宿主細胞。

【請求項 197】

10 個以下の単一アミノ酸修飾を有する I g G 1 F c 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 190 に記載の宿主細胞。

【請求項 199】

前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、前記 C H 3 ドメイン内に 10、8、6、または 4 つ以下の単一アミノ酸修飾を有する配列番号 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 196 または 197 に記載の宿主細胞。

【請求項 200】

請求項 2 ～ 186 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 201】

前記ポリペプチドの 40%、30%、20%、10%、5%、2% 未満が、F c ドメイン単量体上に少なくとも 1 つのフコース修飾を有する、請求項 200 に記載の薬学的組成物。

【請求項 202】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、請求項 1 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 203】

前記単一 F c ドメイン構築体が抗体である、請求項 1 または 202 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 204】

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメ

10

20

30

40

50

イン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、組成物。

【請求項 205】

前記 C T L A 4 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 のポリペプチドもしくは前記第 3 のポリペプチドに結合されるか、または前記第 2 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る、請求項 204 に記載の組成物。

【請求項 206】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 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る、請求項 204 に記載の組成物。

【請求項 207】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

10

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

20

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 208】

前記生物活性が、F c 受容体媒介性エフェクター機能である、請求項 207 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 209】

30

前記 F c 受容体媒介性エフェクター機能が、A D C C および A D C P および／または C D C 活性である、請求項 208 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 210】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合するスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

40

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 211】

50

前記 C T L A 4 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 のポリペプチドもしくは前記第 3 のポリペプチドに結合されるか、または前記第 2 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る、請求項 2 0 2、2 0 7、または 2 1 0 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 2】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 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る、請求項 2 0 2、2 0 7、または 2 1 0 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、F a b である、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 2 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 2 1 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1、第 2、または第 3 のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、請求項 2 0 2 ～ 2 1 2 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、s c F v である、請求項 2 1 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 6】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V_H ドメインおよび C_H 1 ドメインを含み、前記 V_H ドメインおよび C_H 1 ドメインが、前記第 1、第 2、または第 3 のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、請求項 2 0 2 ～ 2 1 2 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

20

【請求項 2 1 7】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V_L ドメインをさらに含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 8】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、前記 V_L ドメインを含む第 4 のポリペプチドを含む、請求項 2 1 7 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 9】

前記 V_H ドメインが、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列のセットを含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 2 2 0】

前記 V_H ドメインが、表 2 に記載の抗体の配列を含む V_H ドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 1】

前記 V_H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V_H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、前記 V_H 配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列を除き、表 2 に記載の抗体の V_H 配列と少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 2 2 2】

前記 V_H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V_H 配列を含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列のセットを含む、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H 配列および V_L 配列のセ

50

ットからの C D R-H 1、C D R-H 2、C D R-H 3、C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 の配列を含む、請求項 1 および 202～215 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 225】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H 配列の C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 を含む V_H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V_L 配列の C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 を含む V_L ドメインを含み、前記 V_H ドメイン配列および V_L ドメイン配列が、C D R-H 1、C D R-H 2、C D R-H 3、C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V_H 配列および V_L 配列に対し、少なくとも 95% 同一である、請求項 1 および 202～215 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 226】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H 配列および V_L 配列のセットを含む、請求項 1 および 202～215 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 227】

I g G C_L 抗体定常ドメインおよび I g G C_H 1 抗体定常ドメインをさらに含み、前記 I g G C_H 1 抗体定常ドメインが、リンカーを介して前記第 1 のポリペプチドまたは前記第 2 のポリペプチドの N 末端に結合している、請求項 1 および 202～212 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

20

【請求項 228】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 202～227 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 229】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 202～228 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 230】

前記第 2 のポリペプチドおよび前記第 3 のポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、請求項 202～228 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 231】

前記二量体形成選択性モジュールが、前記 F c ドメイン単量体の一方の前記 C_H 3 ドメイン内に改変された空洞と、前記 F c ドメイン単量体の他方の前記 C_H 3 ドメイン内に改変された突起と、を含み、前記改変された空洞および前記改変された突起が、F c ドメイン単量体の空洞内突起対 (pro tuberance-int o-cavity pair) を形成するように配置されている、請求項 228 または 229 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 232】

前記改変された突起が、S 354 C、T 366 W、T 366 Y、T 394 W、T 394 F、および F 405 W からなる群から選択される少なくとも 1 つの修飾を含み、前記改変された空洞が、Y 349 C、T 366 S、L 368 A、Y 407 V、Y 407 T、Y 407 A、F 405 A、および T 394 S からなる群から選択される少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 231 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 233】

前記 F c ドメイン単量体の一方が Y 407 V および Y 349 C を含み、前記 F c ドメイン単量体の他方が T 366 W および S 354 C を含む、請求項 228 または 229 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

50

【請求項 2 3 4】

前記二量体形成選択性モジュールが、前記ドメイン単量体の一方の前記 C_H 3 ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、前記 F c ドメイン単量体の他方の前記 C_H 3 ドメイン内に正に荷電したアミノ酸と、を含み、前記負に荷電したアミノ酸および前記正に荷電したアミノ酸が、F c ドメインの形成を促進するように配置されている、請求項 2 2 8 または 2 2 9 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 5】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 9 9 K と、K 4 0 9 D または K 4 0 9 E のいずれかとを含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 2 3 6】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、K 3 9 2 D および D 3 9 9 K を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 7】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7 K および K 3 7 0 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 5 6 K および K 4 3 9 D を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、K 3 9 2 E および D 3 9 9 K を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

20

【請求項 2 4 0】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7 K および K 3 7 0 D を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 1】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 5 6 K および K 4 3 9 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 2】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W を含む、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 2 4 3】

前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W を含む、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 4】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7 K または E 3 5 7 R を含む、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、K 3 7 0 D または K 3 7 0 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 2 4 5】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、K 3 7 0 D または K 3 7 0 E を含む、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、E 3 5 7 K または E 3 5 7 R を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 6】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、K 4 0 9 D または K 4 0 9 E を含む、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各

50

【請求項 2 4 7】

【請求項 2 4 8】

10

【請求項 2 4 9】

【請求項 250】

20

GGGGGGGGGGGGGGG、または GGGGGGGGGGGGGGGGG

【請求項 2 5 1】

【請求項 2 5 2】

30

【請求項 2 5 3】

【請求項 254】

【請求項 2 5 5】

40

【請求項 2 5 6】

【請求項 257】

50

【請求項 258】

I 253 位の各アミノ酸修飾が、I 253 Aである、請求項 257 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 259】

前記 F c ドメインのうちの少なくとも 1 つが、R 292 位に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む、請求項 1 および 202 ～ 258 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 260】

R 292 位の各アミノ酸修飾が独立して、R 292 D、R 292 E、R 292 L、R 292 P、R 292 Q、R 292 R、R 292 T、および R 292 Y からなる群から選択される、請求項 259 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 261】

R 292 位の各アミノ酸修飾が、R 292 P である、請求項 260 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 262】

前記 F c ドメイン単量体のうちの 1 つ以上が、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H 2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H 3 抗体定常ドメインを含む、請求項 1 および 202 ～ 261 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 263】

前記 F c ドメイン単量体が各々、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H 2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H 3 抗体定常ドメインを含む、請求項 262 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

20

【請求項 264】

前記 I g G が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、および I g G 4 からなる群から選択されるサブタイプのものである、請求項 262 または 263 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 265】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドの各々内の N 末端 A s p が、G l n に変異している、請求項 1 および 202 ～ 264 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 266】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドのうちの 1 つ以上が、C 末端リシンを欠く、請求項 1 および 202 ～ 265 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 267】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドが各々、C 末端リシンを欠く、請求項 266 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 268】

リンカーによって前記ポリペプチドのうちの 1 つ以上の N 末端または C 末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む、請求項 1 および 202 ～ 267 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 269】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

50

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
 c) 第4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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、

前記第1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ドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項270】

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75%が、前記第1のFcドメイン、前記第2のFcドメイン、および前記CTLA4結合ドメインを含む、請求項269に記載の細胞培養培地。

10

【請求項271】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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り、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも0.1mg/Lの濃度で前記培養培地中に存在する、細胞培養培地。

【請求項272】

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75%が構造的に同一である、請求項271に記載の細胞培養培地。

20

【請求項273】

前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも10mg/Lの濃度で前記培養培地中に存在する、請求項269～272のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項274】

前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも100mg/Lの濃度で前記培養培地中に存在する、請求項269～273のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項275】

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

30

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

(3) 第4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ことであって、

前記第1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CTLA4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、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、培養することと、

40

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こととを含む、方法。

【請求項276】

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

50

i) 第1のFcドメイン単量体、
 ii) 第2のFcドメイン単量体、および
 iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
 c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
 e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

10

を含み、
 前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

【請求項277】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項276に記載の組成物。

20

【請求項278】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、E357KおよびK370Dを含み、前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、K370DおよびE357Kを含む、請求項277に記載の組成物。

【請求項279】

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、
 a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 ii) 第2のFcドメイン単量体、および
 iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

30

を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
 c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
 e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、
 f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

40

を含み、
 前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

【請求項280】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のFcドメイン単量体および前記第4の

50

F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第 2 のポリペプチドおよび前記第 3 のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項 279 に記載の組成物。

【請求項 281】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、E 357 K および K 370 D を含み、前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、K 370 D および E 357 K を含む、請求項 280 に記載の組成物。

【請求項 282】

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

10

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する

第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第

20

2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成する、組成物。

30

【請求項 283】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 282 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 284】

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する

第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

50

b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3のFcドメイン単量体、
 v) 第4のFcドメイン単量体、および
 v i) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー
 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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

10

を含む、
 前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成する、組成物。

【請求項285】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

20

前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項284に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項286】

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 i i) 第2のFcドメイン単量体、
 i i i) 第3のFcドメイン単量体、
 i v) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

30

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、
 v i) 第4のFcドメイン単量体、
 v i i) 第5のFcドメイン単量体、
 v i i i) 第6のFcドメイン単量体、
 i x) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

40

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
 f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

50

g) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、前記第 4 のポリペプチド、前記第 5 のポリペプチド、または前記第 6 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 4 の F c ドメインを形成し、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 5 の F c ドメインを形成する、組成物。

【請求項 287】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 7 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 8 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 9 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 6 の F c ドメイン単量体および前記第 10 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 286 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 288】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドおよび／または前記第 3 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインとを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1 および第 2 の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、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、単一 F c ドメインおよび前記 CTLA 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 289】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1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1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

10

20

【請求項 290】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合するスペーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 291】

Fc 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

40

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

50

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインとを含む、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

【請求項292】

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

(3) 第4のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

(4) 前記第1のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

(5) 前記第2のポリペプチドおよび／または第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第1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CTLA4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

【請求項293】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項288、289、290、291、または292に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項294】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインとを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1、第 2、および第 3 の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイにおいて、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 295】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

20

d) 前記第 1 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1、第 2、および第 3 の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項 296】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合するスペーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

40

d) 前記第 1 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の抗原結合ドメイン、前記第 2 の抗原結合ドメイン、および前記第 3 の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 297】

50

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の抗原結合ドメイン、前記第 2 の抗原結合ドメイン、および前記第 3 の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

【請求項 298】

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

(3) 第 4 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

(4) 前記第 1 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

(5) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

(6) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、第 2 のポリペプチド、または第 3 のポリペプチドに結合され、それにより F c 抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第 1 および第 2 の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

【請求項 299】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第 2 のポリペプチドおよび前記第 3 のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項 294、295、296、297、または 298 に記載の組成物。

【請求項 300】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の Fc ドメイン単量体、

ii) 第 2 の Fc ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 2 の Fc ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

iv) 第 3 の Fc ドメイン単量体、

v) 第 4 の Fc ドメイン単量体、および

vi) 前記第 3 の Fc ドメイン単量体と前記第 4 の Fc ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

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 6 の Fc ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 1 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 4 の Fc ドメイン単量体および前記第 6 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 Fc 抗原結合ドメイン構築体が、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、単一 Fc ドメインおよび前記 C T L A 4 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強化されている、Fc 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 301】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の Fc ドメイン単量体、

ii) 第 2 の Fc ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 2 の Fc ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

iv) 第 3 の Fc ドメイン単量体、

v) 第 4 の Fc ドメイン単量体、および

vi) 前記第 3 の Fc ドメイン単量体と前記第 4 の Fc ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

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 6 の Fc ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 1 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 4 の Fc ドメイン単量体および前記第 6 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 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 302】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のスペーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

10

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のスペーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

20

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 303】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

30

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

40

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成する、細胞培養培

50

地。

【請求項 304】

Fc 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の Fc ドメイン単量体、

ii) 第 2 の Fc ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 2 の Fc ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 2 のポリペプチドであって、

iv) 第 3 の Fc ドメイン単量体、

v) 第 4 の Fc ドメイン単量体、および

vi) 前記第 3 の Fc ドメイン単量体と前記第 4 の Fc ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

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) 第 6 の Fc ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

(5) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 3 の Fc ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の Fc ドメインを形成し、前記第 2 の Fc ドメイン単量体と前記第 5 の Fc ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の Fc ドメインを形成し、前記第 4 の Fc ドメイン単量体と前記第 6 の Fc ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の Fc ドメインを形成し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

【請求項 305】

前記第 1 の Fc ドメイン単量体および前記第 3 の Fc ドメイン単量体が各々、前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 3 の Fc ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 2 の Fc ドメイン単量体および前記第 5 の Fc ドメイン単量体が各々、前記第 2 の Fc ドメイン単量体と前記第 5 の Fc ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 4 の Fc ドメイン単量体および前記第 6 の Fc ドメイン単量体が各々、前記第 4 の Fc ドメイン単量体と前記第 6 の Fc ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 300、301、302、303、または 304 に記載の Fc 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 306】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の Fc ドメイン単量体、

ii) 第 2 の Fc ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 2 の Fc ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

iv) 第 3 の Fc ドメイン単量体、

v) 第 4 の Fc ドメイン単量体、および

10

20

30

40

50

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 3 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイにおいて、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項 3 0 7】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

20

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

30

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 3 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項 3 0 8】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のスペーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

50

i v) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

10

前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項309】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

20

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

30

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成する、細胞培養培地。

40

【請求項310】

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

50

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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) 第6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

(5) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

【請求項311】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項306、307、308、309、または310に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項312】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わされて、第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTLA4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項313】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさ

20

30

40

50

れて、第4のFcドメインを形成し、前記第6の単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項314】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のスペーサー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさって第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体が組み合わさって第5のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項315】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、
 b) 第 2 のポリペプチドであって、
 v i) 第 4 の F c ドメイン単量体、
 v i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、
 v i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、
 i x) 前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体を結合する第 3 のスパーサー、および

 x) 前記第 5 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体を結合する第 4 のスパーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、
 c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、
 d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、
 e) 第 9 の F c ドメイン単量体を含む第 5 のポリペプチドと、
 f) 第 10 の F c ドメイン単量体を含む第 6 のポリペプチドと、
 g) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、前記第 4 のポリペプチド、前記第 5 のポリペプチド、または前記第 6 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 4 の F c ドメインを形成し、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 5 の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項 316】

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、
 i) 第 1 の F c ドメイン単量体、
 i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、
 i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、
 i v) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のスパーサー、および

 v) 前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 2 のポリペプチドであって、

 v i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

 v i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、

 v i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、

 i x) 前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体を結合する第 3 のスパーサー、および

 x) 前記第 5 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体を結合する第 4 のスパーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

(3) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

(4) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

(5) 第 9 の F c ドメイン単量体を含む第 5 のポリペプチドと、

(6) 第 10 の F c ドメイン単量体を含む第 6 のポリペプチドと、

(7) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、

前記第 4 のポリペプチド、前記第 5 のポリペプチド、または前記第 6 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 4 の F c ドメインを形成し、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 5 の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

【請求項 317】

先行する請求項のいずれか一項に記載の F c 抗原結合構築体を投与することを含む、癌を治療するための方法であって、

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、頭頸部癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、中皮腫、尿路上皮癌、尿路上皮癌、膠芽腫、卵巣癌、前立腺癌、高グレードの中樞神経系悪性腫瘍、肝臓癌、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫からなる群から選択される、方法。

【請求項 318】

先行する請求項のいずれか一項に記載の F c 抗原結合構築体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 319】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 2 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第 1 および第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 4 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第 3 および第 4 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドと

を含み、

第 1 および第 3 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 5 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 4 および第 6 の F c 単量体は一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒に、第 2 の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 320】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3

19に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項321】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項319に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項322】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項319に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項323】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項319に記載のFc抗原ドメイン構築体。

10

【請求項324】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項319～323のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項325】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項319～323のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

20

【請求項326】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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319～323のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項327】

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、請求項324～326のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン単量体。

【請求項328】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項319～323のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

30

【請求項329】

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第4のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が、前記第4のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項319～323のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

40

【請求項330】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、請求項328に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項331】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、請求項329に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項332】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

50

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに
 iv) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第1のポリペプチド、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、
 ii) 第4のFcドメイン単量体、
 iii) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに
 iv) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

10

を含む、第2のポリペプチド、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドとを含む、

第1および第3のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第4および第6のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

20

【請求項333】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに
 iv) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

30

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、
 ii) 第4のFcドメイン単量体、
 iii) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに
 iv) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと

40

を含む、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項334】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項333に記載のFc抗原ドメイン構築体。

50

【請求項 3 3 5】

前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3 3 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 6】

前記第 5 のポリペプチドおよび前記第 6 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3 3 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 7】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 5 のポリペプチドおよび前記第 6 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3 3 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

10

【請求項 3 3 8】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 9】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 0】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

20

【請求項 3 4 1】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 3 4 2】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

30

【請求項 3 4 3】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

40

【請求項 3 4 4】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 3 4 2 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 5】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 3 4 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 6】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

50

i i) 第2のFcドメイン単量体、
 i i i) 第3のFcドメイン単量体、
 i v) 第1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、
 v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

i i) 第5のFcドメイン単量体、

i i i) 第6のFcドメイン単量体、

i v) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドと

を含み、

第1および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第4および第8のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第5のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項347】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項348】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項349】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項350】

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項351】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項352】

10

20

30

40

50

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 5 3】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 5 4】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

10

【請求項 3 5 5】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 3 5 6】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

20

【請求項 3 5 7】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 7 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 8 の F c ドメイン単量体が、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 9 の F c ドメイン単量体が、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 6 の F c ドメイン単量体および前記第 10 の F c ドメイン単量体が、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

30

【請求項 3 5 8】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 3 5 7 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 5 9】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 3 5 8 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

40

【請求項 3 6 0】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 1 の C T L A - 4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー

50

を含む、第 1 のポリペプチドと、
 b) 第 2 のポリペプチドであって、
 i) 第 4 の F c ドメイン単量体、
 i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、
 i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、
 i v) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、
 v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、お
 よび

 v i) 第 5 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー
 を含む、第 2 のポリペプチドと、
 c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、
 d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、
 e) 第 9 の F c ドメイン単量体および第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5
 のポリペプチドと、
 f) 第 10 の F c ドメイン単量体および第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第
 6 のポリペプチドと
 を含み、

第 1 および第 7 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 4 お
 よび第 8 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 5
 の F c 単量体は一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 3 および第 9 の F c ドメイン単
 量体は一緒に、第 4 の F c ドメインを形成し、第 6 および第 10 の F c 単量体は一緒に、
 第 5 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L
 A-4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A-4 重
 鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒に、第 2 の F a b を形
 成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 361】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、
 a) 第 1 のポリペプチドであって、
 i) 第 1 の F c ドメイン単量体、
 i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、
 i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、
 i v) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、
 v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、お
 よび

 v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー
 を含む、第 1 のポリペプチドと、
 b) 第 2 のポリペプチドであって、
 i) 第 4 の F c ドメイン単量体、
 i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、
 i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、
 i v) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、
 v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、お
 よび

 v i) 第 5 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー
 を含む、第 2 のポリペプチドと、
 c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、
 d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、
 e) 第 9 の F c ドメイン単量体を含む第 5 のポリペプチドと、
 f) 第 10 の F c ドメイン単量体を含む第 6 のポリペプチドと、
 g) 第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 7 のポリペプチドと、

10

20

30

40

50

h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含み、

第1および第4のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第5および第8のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項362】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項363】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項364】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項365】

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

20

【請求項366】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項367】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

30

【請求項368】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項369】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

40

【請求項370】

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン単量体。

【請求項371】

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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項372】

50

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 7 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 5 の F c ドメイン単量体および前記第 8 の F c ドメイン単量体が、前記第 5 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 9 の F c ドメイン単量体が、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 6 の F c ドメイン単量体および前記第 10 の F c ドメイン単量体が、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 361～366 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

10

【請求項 373】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 371 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 374】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 372 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

20

【請求項 375】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 2 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 3 の F c ドメイン単量体、

iv) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

30

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 5 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 6 の F c ドメイン単量体、

iv) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第 5 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

40

d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 9 の F c ドメイン単量体および第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 10 の F c ドメイン単量体および第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドとを含む、

第 1 および第 4 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 7 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 5 および第 8 の F c 単量体は一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 3 および第 9 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 4 の F c ドメインを形成し、第 6 および第 10 の F c 単量体は一緒に、

50

第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項376】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

iii) 第3のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体第2のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含む、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFcドメイン単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項377】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項378】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項379】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項380】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項381】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項382】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、

請求項 376～380 のいずれか一項に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 383】

前記 Fc ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 376～380 のいずれか一項に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 384】

前記単一アミノ酸置換が、前記 CH3 ドメイン内のみにある、請求項 376～380 のいずれか一項に記載の Fc 抗原ドメイン単量体。

【請求項 385】

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、前記第 2 の Fc ドメイン単量体と前記第 4 の Fc ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 376～380 のいずれか一項に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 386】

前記第 1 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、前記第 1 の Fc ドメイン単量体と前記第 5 の Fc ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の Fc ドメイン単量体および前記第 6 の Fc ドメイン単量体が、前記第 3 の Fc ドメイン単量体と前記第 6 の Fc ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 376～380 のいずれか一項に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 387】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 385 に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 388】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 386 に記載の Fc 抗原ドメイン構築体。

【請求項 389】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

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 1 の CTLA-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 第 1 の Fc ドメイン単量体と第 2 の Fc ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 3 の Fc ドメイン単量体、

ii) 第 4 の Fc ドメイン単量体、

iii) 第 2 の CTLA-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 第 3 の Fc ドメイン単量体と第 4 の Fc ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の Fc ドメイン単量体および第 3 の CTLA-4 重鎖結合ドメインを含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の Fc ドメイン単量体および第 4 の CTLA-4 軽鎖結合ドメインを含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 1 の CTLA-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 2 の CTLA-4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドと、

g) 第 3 の CTLA-4 軽鎖結合ドメインを含む第 7 のポリペプチドと、

h) 第 4 の CTLA-4 軽鎖結合ドメインを含む第 8 のポリペプチドと

10

20

30

40

50

を含み、

第1および第5のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第3のCTLA-4重鎖結合ドメインと一緒に、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第4のCTLA-4重鎖結合ドメインと一緒に、第2のFabを形成し、第3のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4重鎖結合ドメインは一緒になって、第3のFabを形成し、第4のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインと一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

10

【請求項390】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項389に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項391】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項389に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項392】

前記第5のポリペプチド、前記第6のポリペプチド、前記第7のポリペプチド、および前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項389に記載のFc抗原ドメイン構築体。

20

【請求項393】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチド、前記第6のポリペプチド、前記第7のポリペプチド、および前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項389に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項394】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項395】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

30

【請求項396】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項397】

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、請求項389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン単量体。

40

【請求項398】

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項399】

前記第1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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、前記第3のF

50

cドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項389～393のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項400】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、請求項398に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項401】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、請求項399に記載のFc抗原ドメイン構築体。

10

【請求項402】

各リンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGS, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGS, GSGS,
GGSGGGSG, GSGGGSGGGSGGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS,
RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS,
GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGG

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか3、またはそれからなる、請求項319～401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403】

前記Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUのI253位に置換を含む、請求項319～401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404】

EUのI253位の各アミノ酸置換が独立して、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403に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

30

【請求項405】

前記Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUのR292位に置換を含む、請求項319～401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406】

EUのR292位の各アミノ酸置換が独立して、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45に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項405】

前記Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、およびD356Rからなる群から選択される置換を含む、請求項319～401のいずれか一項に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

40

【請求項405】

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319～401のいずれか一項に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

50

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）は、免疫応答の重要な負の調節因子である。それはT細胞上での活性化により誘導され、制御性T（Treg）細胞上で構成的に発現される。そのリガンドB7.1およびB7.2との相互作用を通して、CTLA-4は、細胞の増殖および機能的活性を低減する。抗原への慢性曝露は、癌において一般的であるように、T細胞上のCTLA-4の保持発現を駆動し、腫瘍細胞を応答できないようにして攻撃し、それにより腫瘍促進環境を支持する。Tregの抑制活性に起因して、腫瘍中のそれらの存在が十分な抗腫瘍免疫応答を開始することをさらに防ぐこともまた十分に確立されている。CTLA-4/B7.1およびB7.2相互作用の遮断は、T細胞の機能的逆転または再活性化をもたらす。

10

【0002】

Yervoy（登録商標）（イピリムマブ）は、転移性黒色腫の治療に認証されたCTLA-4に対するIgG1 mAbである。事前臨床および臨床データは、イピリムマブの作用の主要なメカニズムのうちの2つが、F(ab)ドメインによるCTLA-4の遮断、およびFcドメインによる抗体依存性細胞傷害（ADCC）の誘導であることを示している。ADCCは、CTLA-4発現Tregの殺傷ならびにおそらくCTLA-4発現腫瘍細胞の殺傷をもたらすと考えられる。

20

【発明の概要】

【0003】

開示の概要

本開示は、CTLA4結合ドメインを、少なくとも2つのFcドメインと組み合わせて、固有の生物活性を有する新たな治療薬を生成するための組成物および方法の特徴とする。

【0004】

いくつかの例では、本開示は、CTLA4結合ドメイン（例えば、既知の治療用CTLA4抗体のCTLA4結合ドメイン）を少なくとも2つの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。かかる構築体を生み出すために、本開示は、少なくとも2つ、例えば、複数のFcドメインを有する構築体を組み立て、かつそれらのホモ二量体形成およびヘテロ二量体形成を制御して、限定された数のポリペプチド由来の別個のサイズの分子を組み立てるための様々な方法を提供する。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。

30

【0005】

第1の態様では、本開示は、強化されたエフェクター機能を含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、Fc抗原結合ドメイン構築体は、CTLA4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、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、単一FcドメインとCTLA4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強化されている。

40

【0006】

第2の態様では、本開示は、CTLA4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の実質的に均質な群を含む組成物を特徴とする。

【0007】

第3の態様では、本開示は、CTLA4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し

50

ており、F c 抗原結合ドメイン構築体は、単一F c ドメインおよびC T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む。

【0008】

第4の態様では、本開示は、a) i) 第1のF c ドメイン単量体、i i) 第2のF c ドメイン単量体、ならびにi i i) 第1のF c ドメイン単量体および第2のF c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) 第3のF c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、c) 第4のF c 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、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合されたC T L A 4 結合ドメインとを含むF c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む組成物を特徴としており、第1のF c ドメイン単量体および第3のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第1のF c ドメインを形成し、第2のF c ドメイン単量体および第4のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第2のF c ドメインを形成する。

10

【0009】

第4の態様のいくつかの実施形態では、C T L A 4 結合ドメインは、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドもしくは第3のポリペプチドに結合されるか、または第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドに結合され、あるいはC T L A 4 結合ドメインは、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および第3のポリペプチドに結合される。

【0010】

第5の態様では、本開示は、強化されたエフェクター機能を含むF c 抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、F c 抗原結合ドメイン構築体は、a) i) 第1のF c ドメイン単量体、i i) 第2のF c ドメイン単量体、ならびにi i i) 第1のF c ドメイン単量体および第2のF c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) 第3のF c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、c) 第4のF c 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、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合されたC T L A 4 結合ドメインとを含み、第1のF c ドメイン単量体および第3のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第1のF c ドメインを形成し、第2のF c ドメイン単量体および第4のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第2のF c ドメインを形成し、F c 抗原結合ドメイン構築体は、単一F c ドメインおよびC T L A 4 結合ドメインを有する構築体と比較して、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイにおいて、エフェクター機能が強化されている。

20

30

【0011】

第5の態様のいくつかの実施形態では、単一F c ドメイン構築体は、抗体である。

【0012】

第6の態様では、本開示は、a) i) 第1のF c ドメイン単量体、i i) 第2のF c ドメイン単量体、ならびにi i i) 第1のF c ドメイン単量体および第2のF c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) 第3のF c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、c) 第4のF c 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、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合されたC T L A 4 結合ドメインとを含むF c 抗原結合ドメイン構築体を特徴とする。第1のF c ドメイン単量体および第3のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第1のF c ドメインを形成し、第2のF c ドメイン単量体および第4のF c ドメイン単量体は組み合わせられて、第2のF c ドメインを形成し、F c 抗原結合ドメイン構築体は、単一F c ドメインおよびC T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む。

40

【0013】

第6の態様のいくつかの実施形態では、生物活性は、A D C C、A D C P、および／またはC D C 活性 (例えば、A D C C および A D C P 活性、A D C C および C D C 活性、A D C P および C D C 活性、または A D C C、A D C P、および C D C 活性) などのF c 受容体媒介性エフェクター機能である。

【0014】

50

第7の態様では、本開示は、a) i) 第1のFcドメイン単量体、i i) 第2のFcドメイン単量体、ならびにi i i) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合するスペーサーを含む第1のポリペプチドと、b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、c) 第4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、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成する。

【0015】

本開示の第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドもしくは第3のポリペプチドに結合されるか、または第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドに結合され、あるいはCTLA4結合ドメインは、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および第3のポリペプチドに結合される。

【0016】

本開示の第1、第2、第3、および第4の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、FabまたはFabのV_Hである。

【0017】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、結合ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部であり、いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、scFvである。

【0018】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含み、V_HドメインおよびC_H1ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である。いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_Lドメインをさらに含み、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1に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列のセットを含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の配列を含むV_HドメインのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の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を除き、表2に記載の抗体のV_H配列と少なくとも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%同一であるか、またはV_Hドメインは、表2に記載の抗体のV_H配列を含む。

【0019】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、表1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み、CTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_H配列およびV_L配列のセットからのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を含み、CTLA4結合ドメインは、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を含むV_Hドメイン、ならびに表2に記載される抗体のV_L配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むV_Lドメインを含み、V_Hドメイン配列およびV_L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V_HおよびV_Lの配列に対し、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、もしくは少なくとも99.5%同一であるか、またはCTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_HおよびV_Lの配列のセットを含む。

【0020】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、IgG C_L抗体定常ドメインおよびIgG C_H1抗体定常ドメインをさらに含み、IgG C_H1抗体定常ドメインは、リンカーによって第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのN末端に結合している。

【0021】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

10

【0022】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様の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4のFcドメイン単量体は、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0023】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、Fcドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に改変された空洞と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に改変された突起とを含み、改変された空洞および改変された突起は、Fcドメイン単量体の空洞内突起対 (protruberance-into-cavity pair) を形成するように配置されている。いくつかの実施形態では、改変された突起は、S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F、およびF405Wから選択される少なくとも1つの修飾を含み、改変された空洞は、Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A、およびT394Sから選択される少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体の一方が、Y407VおよびY349Cを含み、Fcドメイン単量体の他方が、T366WおよびS354Cを含む。

20

【0024】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、ドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に正に荷電したアミノ酸とを含み、負に荷電したアミノ酸および正に荷電したアミノ酸は、Fcドメインの形成を促進するように配置されている。いくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D399Kと、K409DまたはK409Eのいずれかとを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392DおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Eを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392EおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、S354CおよびT366Wを含み、第3と第4のポリペプチドは各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第3および第4のポリペプチドは各々、S354CおよびT366Wを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、E357KまたはE357Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K370DまたはK370Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体の各々は、K370DまたはK370Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチド

30

40

50

は各々、E 3 5 7 Kまたは3 5 7 Rを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、K 4 0 9 DまたはK 4 0 9 Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、D 3 9 9 KまたはD 3 9 9 Rを含むか、または第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、D 3 9 9 KまたはD 3 9 9 Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K 4 0 9 DまたはK 4 0 9 Eを含む。

【0025】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドは、同一のアミノ酸配列を有する。

【0026】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様の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つ以上のリンカーは、結合である。

【0027】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様の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つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG,

SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS,

GGSGSGSGS, GGSGSGSGSGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG,

GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,

RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,

AAANSSIDLISVPVDSR, GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGG,

GGGSGGGSGGGG, SGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGGG,

GGGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG,またはGGGGGGGGGGGGGGGGGG

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、グリシンスペーサー、例えば、4～30、8～30、または12～30個のグリシン残基からなるスペーサー、例えば、20個のグリシン残基からなるスペーサーである。

【0028】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、リンカーによりFcドメイン単量体に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーである。

【0029】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメインのうちの少なくとも1つは、I 2 5 3位に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、I 2 5 3位の各アミノ酸修飾は独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、およびI 2 5 3 Yから選択される。いくつかの実施形態では、I 2 5 3位の各アミノ酸修飾は、I 2 5 3 Aである。

【0030】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメインのうちの少なくとも1つは、R 2 9 2位に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、R 2 9 2位の各アミノ酸修飾は独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、およびR 2 9 2 Yから選択される。いくつかの実施形態では、R 2 9 2位の各アミノ酸修飾は、R 2 9 2 Pである。

【0031】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体のうちの1つ以上が、IgGヒンジドメイン、IgG C_H2抗体定常ドメイン

、および I g G C_H3 抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、F c ドメイン単量体は各々、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H3 抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、I g G は、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、および I g G 4 からなる群から選択されるサブタイプのものである。

【0032】

本開示の第 4、第 5、第 6、および第 7 の態様のいくつかの実施形態では、第 4、第 5、第 6、および第 7 のポリペプチドの各々内の N 末端 A s p が、G l n に変異している。

【0033】

本開示の第 4、第 5、第 6、および第 7 の態様のいくつかの実施形態では、第 4、第 5、第 6、および第 7 のポリペプチドのうちの 1 つ以上が、C 末端リシンを欠く。いくつかの実施形態では、第 4、第 5、第 6、および第 7 のポリペプチドは各々、C 末端リシンを欠く。

【0034】

本開示の第 4、第 5、第 6、および第 7 の態様のいくつかの実施形態では、F c 抗原結合ドメイン構築体は、リンカーによってポリペプチドのうちの 1 つ以上の N 末端または C 末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む。

【0035】

第 8 の態様では、本開示は、F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、F c 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り、F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも 0.1 mg / L、10 mg / L、25 mg / L、50 mg / L、75 mg / L、または 100 mg / L の濃度で培養培地中に存在する、細胞培養培地を特徴とする。

【0036】

本開示の第 8 の態様のいくつかの実施形態では、F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 75 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 95 % が、構造的に同一である。

【0037】

第 9 の態様では、本開示は、F c 抗原結合ドメイン構築体の群を含む細胞培養培地を特徴としており、F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % は、a) i) 第 1 の F c ドメイン単量体、i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、ならびに i i i) 第 1 の F c ドメイン単量体および第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む第 1 のポリペプチドと、b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、c) 第 4 の F c 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、第 2 のポリペプチド、または第 3 のポリペプチドに結合された C T L A 4 結合ドメインとを含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は組み合わせられて、第 1 の F c ドメインを形成し、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は組み合わせられて、第 2 の F c ドメインを形成する。

【0038】

本開示の第 9 の態様のいくつかの実施形態では、F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 75 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 95 % は、第 1 の F c ドメイン、第 2 の F c ドメイン、および C T L A 4 結合ドメインを含む。

【0039】

第 10 の態様では、本開示は、F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法を特徴としており、方法は、(1) i) 第 1 の F c ドメイン単量体、i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、ならびに i i i) 第 1 の F c ドメイン単量体および第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む第 1 のポリペプチドと、(2) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、(3) 第 4 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、(4) C T L A 4 結合ドメインとを発現する宿主細胞を培養することであって、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わせられて、第 1 の F c 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ドメイン単量体が組み合わされて、第2のFcドメインを形成し、CTLA4結合ドメインが、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、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%が、構造的に同一である、培養することと、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ことと、を含む。

【0040】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドもしくは第3のポリペプチドに結合されるか、または第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドに結合され、あるいはCTLA4結合ドメインは、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および第3のポリペプチドに結合される。

10

【0041】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、FabまたはV_Hである。

【0042】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部であり、いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、scFvである。

【0043】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_HドメインとC_H1ドメインを含み、V_HドメインとC_H1ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である。いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_Lドメインをさらに含み、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1に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列のセットを含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の配列を含むV_HドメインのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の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を除き、表2に記載の抗体のV_H配列と少なくとも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%同一であるか、またはV_Hドメインは、表2に記載の抗体のV_H配列を含む。

20

30

【0044】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、表1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み、CTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_H配列およびV_L配列のセットからのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を含み、CTLA4結合ドメインは、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を含むV_Hドメイン、ならびに表2に記載される抗体のV_L配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むV_Lドメインを含み、V_Hドメイン配列およびV_L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V_HおよびV_Lの配列に対し、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、もしくは少なくとも99.5%同一であるか、またはCTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_HおよびV_Lの配列のセットを含む。

40

【0045】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、IgG C_L抗体定常ドメインおよびIgG C_H1抗体定常ドメインをさらに

50

含み、IgG C_H1抗体定常ドメインは、リンカーによって第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのN末端に結合している。

【0046】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0047】

本開示の第9および第10の態様の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4のFcドメイン単量体は、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

10

【0048】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、Fcドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に改変された空洞と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に改変された突起とを含み、改変された空洞および改変された突起は、Fcドメイン単量体の空洞内突起対を形成するように配置されている。いくつかの実施形態では、改変された突起は、S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F、およびF405Wから選択される少なくとも1つの修飾を含み、改変された空洞は、Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A、およびT394Sから選択される少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体の一方が、Y407VおよびY349Cを含み、Fcドメイン単量体の他方が、T366WおよびS354Cを含む。

20

【0049】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、ドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に正に荷電したアミノ酸とを含み、負に荷電したアミノ酸および正に荷電したアミノ酸は、Fcドメインの形成を促進するように配置されている。いくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D399Kと、K409DまたはK409Eのいずれかとを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392DおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Eを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392EおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、S354CおよびT366Wを含み、第3と第4のポリペプチドは各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第3および第4のポリペプチドは各々、S354CおよびT366Wを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、E357KまたはE357Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K370DまたはK370Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体の各々は、K370DまたはK370Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、E357KまたはE357Rを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、K409DまたはK409Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、D399KまたはD399Rを含むか、または第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、D399KまたはD399Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K409DまたはK409Eを含む。

30

40

【0050】

50

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドおよび第 3 のポリペプチドは、同一のアミノ酸配列を有する。

【0051】

本開示の第 9 および第 10 の態様の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 つ以上のリンカーは、結合である。

【0052】

本開示の第 9 および第 10 の態様の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 つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGG, SGGG, GSGS,

10

GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,

GGSGSGSGSGS, GSGG, GGSG, GGSGGGSG,

GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,

RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,

AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS,

GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGG,

GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG, または GGGGGGGGGGGGGGGGG

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、グリシンスペーサー、例えば、4～30、8～30、または 12～30 個のグリシン残基からなるスペーサー、例えば、20 個のグリシン残基からなるスペーサーである。

20

【0053】

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、CTLA 4 結合ドメインは、リンカーにより Fc ドメイン単量体に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーである。

【0054】

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、Fc ドメインのうちの少なくとも 1 つは、I 253 位に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、I 253 位の各アミノ酸修飾は独立して、I 253 A、I 253 C、I 253 D、I 253 E、I 253 F、I 253 G、I 253 H、I 253 I、I 253 K、I 253 L、I 253 M、I 253 N、I 253 P、I 253 Q、I 253 R、I 253 S、I 253 T、I 253 V、I 253 W、および I 253 Y から選択される。いくつかの実施形態では、I 253 位の各アミノ酸修飾は、I 253 A である。

30

【0055】

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、Fc ドメインのうちの少なくとも 1 つは、R 292 位に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、R 292 位の各アミノ酸修飾は独立して、R 292 D、R 292 E、R 292 L、R 292 P、R 292 Q、R 292 R、R 292 T、および R 292 Y から選択される。いくつかの実施形態では、R 292 位の各アミノ酸修飾は、R 292 P である。

【0056】

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、Fc ドメイン単量体のうちの 1 つ以上が、IgG ヒンジドメイン、IgG C_H2 抗体定常ドメイン、および IgG C_H3 抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、Fc ドメイン単量体は各々、IgG ヒンジドメイン、IgG C_H2 抗体定常ドメイン、および IgG C_H3 抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、IgG は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、および IgG4 からなる群から選択されるサブタイプのものである。

40

【0057】

本開示の第 9 および第 10 の態様のいくつかの実施形態では、第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドの各々内の N 末端 Asp は、Gln に変異している。

50

【0058】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドのうちの1つ以上が、C末端リシンを欠く。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドは各々、C末端リシンを欠く。

【0059】

本開示の第9および第10の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、リンカーによってポリペプチドのうちの1つ以上のN末端またはC末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む。

【0060】

本開示の第11の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドは、異なるアミノ酸配列を有する。

10

【0061】

本開示の第11の態様のいくつかの実施形態では、第1のCTLA4結合ドメインは、第1のポリペプチドに結合され、第2のCTLA4結合ドメインは、第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドに結合される。

【0062】

本開示の第11の態様の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4のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K370DおよびE357Kを含む。

20

【0063】

本開示の第12の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第2のポリペプチドおよび第3のポリペプチドは、異なるアミノ酸配列を有する。

30

【0064】

本開示の第12の態様の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4のFcドメイン単量体は各々、D399KおよびK409Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Dを含む。

【0065】

本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1のまたはCTLA4結合ドメインは、FabまたはV_Hドメインである。本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1および第2のCTLA4結合ドメインは、Fabである。本開示の第9の態様のいくつかの実施形態では、第1、第2、および第3のCTLA4結合ドメインは、FabまたはV_Hドメインである。

40

【0066】

本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1または第2のCTLA4結合ドメインは、scFvである。本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1および第2のCTLA4結合ドメインは、scFvである。本開示の第9の態様のいくつかの実施形態では、第1、第2、および第3のCTLA4結合ドメインは、scFvである。

【0067】

本開示の第11の態様のいくつかの実施形態では、第1または第2のCTLA4ドメインは、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含み、V_HドメインとC_H1ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である。いくつかの実施形態

50

では、C T L A 4 結合ドメインは、V_L ドメインをさらに含み、いくつかの実施形態では、F c 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 1 に記載の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 配列のセットを含み、V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の配列を含む V_H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の V_H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、V_H 配列は、C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を除き、表 2 に記載の抗体の V_H 配列と少なくとも 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% 同一であるか、または V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の V_H 配列を含む。

10

【0068】

本開示の第 12 の態様のいくつかの実施形態では、第 1、第 2、または第 3 の C T L A 4 結合ドメインは、V_H ドメインおよび C_H 1 ドメインを含み、V_H ドメインおよび C_H 1 ドメインは、第 1、第 2、または第 3 のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である。いくつかの実施形態では、C T L A 4 結合ドメインは、V_L ドメインをさらに含み、いくつかの実施形態では、F c 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 1 に記載の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 配列のセットを含み、V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の配列を含む V_H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の V_H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含み、V_H 配列は、C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を除き、表 2 に記載の抗体の V_H 配列と少なくとも 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% 同一であるか、または V_H ドメインは、表 2 に記載の抗体の V_H 配列を含む。

20

【0069】

本開示の第 11 の態様のいくつかの実施形態では、第 1 または第 2 の C T L A 4 結合ドメインは、表 1 に記載される C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列のセットを含み、C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H 配列および V_L 配列のセットからの C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を含み、C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含む V_H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V_L 配列の C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含む V_L ドメインを含み、V_H ドメイン配列および V_L ドメイン配列は、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V_H および V_L の配列に対し、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、もしくは少なくとも 99.5% 同一であるか、または C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H および V_L の配列のセットを含む。

30

【0070】

本開示の第 12 の態様のいくつかの実施形態では、第 1、第 2、または第 3 の C T L A 4 結合ドメインは、表 1 に記載される C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列のセットを含み、C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H 配列および V_L 配列のセットからの C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を含み、C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H 配列の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含む V_H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V_L 配列の C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含む V_L ドメインを含み、V_H ドメイン配列および V_L ドメイン配列は、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V_H および V_L の配列に対し、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同

40

50

一、少なくとも 99% 同一、もしくは少なくとも 99.5% 同一であるか、または C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V_H および V_L の配列のセットを含む。

【0071】

本開示の第 11 および第 12 の態様のいくつかの実施形態では、F c 抗原結合ドメイン構築体は、I g G C_L 抗体定常ドメインおよび I g G C_H1 抗体定常ドメインをさらに含み、I g G C_H1 抗体定常ドメインは、リンカーによって第 1 のポリペプチドまたは第 2 のポリペプチドの N 末端に結合している。

【0072】

本開示の第 11 および第 12 の態様のいくつかの実施形態では、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は、第 1 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

10

【0073】

本開示の第 11 および第 12 の態様のいくつかの実施形態では、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は、第 2 の F c ドメイン単量体と第 4 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0074】

本開示の第 11 および第 12 の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、F c ドメイン単量体の一方の C_H3 ドメイン内に改変された空洞と、F c ドメイン単量体の他方の C_H3 ドメイン内に改変された突起とを含み、改変された空洞および改変された突起は、F c ドメイン単量体の空洞内突起対を形成するように配置されている。いくつかの実施形態では、改変された突起は、S 354C、T 366W、T 366Y、T 394W、T 394F、および F 405W から選択される少なくとも 1 つの修飾を含み、改変された空洞は、Y 349C、T 366S、L 368A、Y 407V、Y 407T、Y 407A、F 405A、および T 394S から選択される少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、F c ドメイン単量体の一方が、Y 407V および Y 349C を含み、F c ドメイン単量体の他方が、T 366W および S 354C を含む。

20

【0075】

本開示の第 11 および第 12 の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、ドメイン単量体の一方の C_H3 ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、F c ドメイン単量体の他方の C_H3 ドメイン内に正に荷電したアミノ酸とを含み、負に荷電したアミノ酸および正に荷電したアミノ酸は、F c ドメインの形成を促進するように配置されている。いくつかの実施形態では、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、D 399K と、K 409D または K 409E のいずれかとを含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、K 392D および D 399K を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、E 357K および K 370E を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、D 356K および K 439D を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、K 392E および D 399K を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、E 357K および K 370D を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体は各々、D 356K および K 439E を含み、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は各々、S 354C および T 366W を含み、第 3 と第 4 のポリペプチドは各々、Y 349C、T 366S、L 368A、および Y 407V を含み、第 3 および第 4 のポリペプチドは各々、S 354C および T 366W を含み、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は各々、Y 349C、T 366S、L 368A、および Y 407V を含み、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は各々、E 357K または E 357R を含み、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドは各々、K 370D または K 370E を含み、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体の各々は、K 370D または K 370E を含み、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドは各々、E 357K または E 357R を含み、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単

30

40

50

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

10

20

【 0 0 7 8 】

【 0 0 7 9 】

30

【 0 0 8 0 】

40

【 0 0 8 1 】

【 0 0 8 2 】

本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドの各々内のN末端Aspは、Glnに変異している。

【0083】

本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドのうちの1つ以上が、C末端リシンを欠く。いくつかの実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドは各々、C末端リシンを欠く。

【0084】

本開示の第11および第12の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、リンカーによってポリペプチドのうちの1つ以上のN末端またはC末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む。

【0085】

第13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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) i) 第3のFcドメイン単量体、ii) 第4のFcドメイン単量体、ならびにiv) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、d) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む組成物を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成する。

【0086】

本開示の第13の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第2のFcドメイン単量体および第5のFcドメイン単量体は各々、第2のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は各々、第4のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0087】

第14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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) i) 第3のFcドメイン単量体、ii) 第4のFcドメイン単量体、ならびにiv) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、e) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む組成物を特徴としており、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せられて、第1のFcドメインを形成し、第1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せられて、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6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成する。

【0088】

本開示の第14の態様の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4のFcドメイン単量体は各々、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体

10

20

30

40

50

との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第1のFcドメイン単量体および第5のFcドメイン単量体は各々、第1のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第3のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は各々、第3のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0089】

第15の態様では、本開示は、a) i) 第1のFcドメイン単量体、i i) 第2のFcドメイン単量体、i i i) 第3のFcドメイン単量体、i v) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、ならびにv) 第2のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) i) 第4のFcドメイン単量体、i i) 第5のFcドメイン単量体、i i i) 第6のFcドメイン単量体、i v) 第4のFcドメイン単量体および第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、ならびにv) 第5のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカーを含む第2のポリペプチドと、c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、g) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、第4のポリペプチド、第5のポリペプチド、または第6のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む組成物を特徴としており、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せられて、第1のFcドメインを形成し、第1のFcドメイン単量体および第7のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第8のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3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9のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第4のFcドメインを形成し、第6のFcドメイン単量体および第10のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第5のFcドメイン単量体を形成する。

【0090】

本開示の第15の態様の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5のFcドメイン単量体は各々、第2のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第1のFcドメイン単量体および第7のFcドメイン単量体は各々、第1のFcドメイン単量体と第7のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第4のFcドメイン単量体および第8のFcドメイン単量体は各々、第4のFcドメイン単量体と第8のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第3のFcドメイン単量体および第9のFcドメイン単量体は各々、第3のFcドメイン単量体と第9のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第6のFcドメイン単量体および第10のFcドメイン単量体は各々、第6のFcドメイン単量体と第10のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0091】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、FabまたはV_Hドメインである。

【0092】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、1つ以上のポリペプチドのアミノ酸配列の一部であり、いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、scFvである。

【0093】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含み、V_HドメインおよびC_H1ドメインは、第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である。いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、V_Lドメインをさらに含み、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1に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列のセットを含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の配列を含むV_HドメインのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、V_Hドメインは、表2に記載の抗体の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を除き、表2に記載の抗体のV_H配列と少なくとも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%同一であるか、またはV_Hドメインは、表2に記載の抗体のV_H配列を含む。

【0094】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、表1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み、CTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_H配列およびV_L配列のセットからのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を含み、CTLA4結合ドメインは、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を含むV_Hドメイン、ならびに表2に記載される抗体のV_L配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むV_Lドメインを含み、V_Hドメイン配列およびV_L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V_HおよびV_Lの配列に対し、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、もしくは少なくとも99.5%同一であるか、またはCTLA4結合ドメインは、表2に記載される抗体のV_HおよびV_Lの配列のセットを含む。

【0095】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、IgG C_L抗体定常ドメインおよびIgG C_H1抗体定常ドメインをさらに含み、IgG C_H1抗体定常ドメインは、リンカーによって第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのN末端に結合している。

【0096】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、Fcドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に改変された空洞と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に改変された突起とを含み、改変された空洞および改変された突起は、Fcドメイン単量体の空洞内突起対を形成するように配置されている。いくつかの実施形態では、改変された突起は、S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F、およびF405Wから選択される少なくとも1つの修飾を含み、改変された空洞は、Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A、およびT394Sから選択される少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体の一方が、Y407VおよびY349Cを含み、Fcドメイン単量体の他方が、T366WおよびS354Cを含む。

【0097】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、ドメイン単量体の一方のC_H3ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、Fcドメイン単量体の他方のC_H3ドメイン内に正に荷電したアミノ酸とを含み、負に荷電したアミノ酸および正に荷電したアミノ酸は、Fcドメインの形成を促進するように配置されている。いくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D399Kと、K409DまたはK409Eのいずれかとを含

み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392DおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Eを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、K392EおよびD399Kを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、E357KおよびK370Dを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、D356KおよびK439Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、S354CおよびT366Wを含み、第3と第4のポリペプチドは各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第3および第4のポリペプチドは各々、S354CおよびT366Wを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、E357KまたはE357Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K370DまたはK370Eを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体の各々は、K370DまたはK370Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、E357KまたはE357Rを含み、第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、K409DまたはK409Eを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、D399KまたはD399Rを含むか、または第2のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体は各々、D399KまたはD399Rを含み、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドは各々、K409DまたはK409Eを含む。

【0098】

本開示の第13、第14、および第15の態様の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つ以上のリンカーは、結合である。

【0099】

本開示の第13、第14、および第15の態様の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つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGS,
SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS,
GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGS, GSGS, GSGGGSG,
GSGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,
RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSGSGSGSGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGSGGS,
GGGSGGGSGSGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG, または GGGGGGGGGGGGGGGG

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、グリシンスペーサー、例えば、4～30、8～30、または12～30個のグリシン残基からなるスペーサー、例えば、20個のグリシン残基からなるスペーサーである。

【0100】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、リンカーによりFcドメイン単量体に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーである。

【0101】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメインのうちの少なくとも1つは、I253位に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、I253位の各アミノ酸修飾は独立して、I253A、I253C、I253D、I253E、I253F、I253G、I253H、I253I、I25

3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y から選択される。いくつかの実施形態では、I 2 5 3 位の各アミノ酸修飾は、I 2 5 3 A である。

【0102】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメインのうちの少なくとも1つは、R 2 9 2 位に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、R 2 9 2 位の各アミノ酸修飾は独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y から選択される。いくつかの実施形態では、R 2 9 2 位の各アミノ酸修飾は、R 2 9 2 P である。

10

【0103】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体のうちの1つ以上が、IgGヒンジドメイン、IgG C_H2抗体定常ドメイン、およびIgG C_H3抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は各々、IgGヒンジドメイン、IgG C_H2抗体定常ドメイン、およびIgG C_H3抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4からなる群から選択されるサブタイプのものである。

【0104】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、ポリペプチドの各々内のN末端Aspは、Glnに変異している。

20

【0105】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、ポリペプチドのうちの1つ以上が、C末端リシンを欠く。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは各々、C末端リシンを欠く。

【0106】

本開示の第13、第14、および第15の態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、リンカーによってポリペプチドのうちの1つ以上のN末端またはC末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む。

【0107】

30

第16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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、c) 第4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のポリペプチドに結合された第1のCTLA4結合ドメインと、e) 第2のポリペプチドおよび/または第3のポリペプチドに結合された第2のCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第1および第2のCTLA4結合ドメインは、異なる抗原に結合し、Fc抗原結合ドメイン構築体は、単一FcドメインおよびCTLA4結合ドメインを有する構築体と比較して、抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイ、抗体依存性細胞貪食(ADCP)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、エフェクター機能が強化されている。

40

【0108】

第26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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) iv) 第3のFcドメイン単量体、v) 第4のFcドメイン単量体、ならびにvi) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第2のポリペプチド

50

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、ポリペプチドに結合された第1のCTLA4結合ドメインと、d) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成し、Fc抗原結合ドメイン構築体は、単一FcドメインおよびCTLA4結合ドメインを有する構築体と比較して、抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイ、抗体依存性細胞貪食(ADCP)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、エフェクター機能が強化されている。

【0109】

第27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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) iv) 第3のFcドメイン単量体、v) 第4のFcドメイン単量体、ならびにvi) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、e) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成し、Fc抗原結合ドメイン構築体は、単一FcドメインおよびCTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む。

【0110】

第28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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサーを含む第1のポリペプチドと、b) iv) 第3のFcドメイン単量体、v) 第4のFcドメイン単量体、ならびにvi) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサーを含む第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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、e) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含むFc抗原結合ドメイン構築体を特徴としており、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成する。

【0111】

第29の態様では、本開示は、Fc抗原結合ドメイン構築体の群を含む細胞培養培地を特徴としており、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、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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、b) iv) 第3のFcドメイン単量体、v) 第4のFcドメイン単量体、ならびにvi) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを含み、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は組み合わせられて、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せられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は組み合わせられて、第3のFcドメインを形成する。

【0112】

第30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を特徴としており、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、ならびにiii) 第1のFcドメイン単量体および第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカーを含む第1のポリペプチドと、(2) iv) 第3のFcドメイン単量体、v) 第4のFcドメイン単量体、ならびにvi) 第3のFcドメイン単量体および第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカーを含む第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) 第6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、(5) 第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、第3のポリペプチド、または第4のポリペプチドに結合されたCTLA4結合ドメインとを発現する宿主細胞を培養することであって、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体が組み合わせられて、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ドメイン単量体が組み合わせられて、第2のFcドメインを形成し、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体が組み合わせられて、第3のFcドメインを形成し、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%が、構造的に同一である、培養することと、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ことを含む。

【0113】

本開示の第26、第27、第28、第29、および第30の態様のいくつかの実施形態では、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は各々、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第2のFcドメイン単量体および第5のFcドメイン単量体は各々、第2のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は各々、第4のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む。

【0114】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体は、低減されたフコシル化を有する。したがって、いくつかの実施形態では、Fc抗原結合ドメイン構築体を含む組成物中のFcドメイン単量体の40%、30%、20%、15%、10%、または5%未満がフコシル化されている。

【0115】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、CH3ドメイン中に最大10個(9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ)の単一アミノ酸変化を有する図24Aのアミノ酸配列(配列番号43)を含む。

【0116】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、CH3ドメイン中に最大10個(9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ)の単一アミノ酸変化を有する図24Bのアミノ酸配列(配列番号45)を含む。

【0117】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、CH3ドメイン中に最大10個(9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ)の単一アミノ酸変化を有する図24Cのアミノ酸配列(配列番号47)を含む。

【0118】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、CH3ドメイン中に最大10個（9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ）の単一アミノ酸変化を有する図24Dのアミノ酸配列（配列番号42）を含む。

【0119】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、例えば、Fcドメイン単量体がポリペプチドのカルボキシ末端にある場合、Fcドメイン単量体は、K447を含まない。他の実施形態では、例えば、Fcドメイン単量体がポリペプチドのカルボキシ末端にない場合、Fcドメイン単量体は、K447を含む。

【0120】

本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、例えば、Fcドメイン単量体がリンカーのアミノ末端にある場合、Fcドメイン単量体は、E216～C220（両端を含む）のヒンジ部分を含まないが、D221～L235（両端を含む）のヒンジ部分を含む。他の実施形態では、例えば、Fcドメイン単量体がCH1ドメインのカルボキシ末端にある場合、Fcドメイン単量体は、E216～L235（両端を含む）のヒンジ部分を含む。本開示のすべての態様のいくつかの実施形態では、ヒンジドメイン、例えば、ポリペプチドのアミノ末端にあるヒンジドメインは、EUの221位にAspからGlnへの変異を有する。

【0121】

上述されるように、本開示のFc抗原結合ドメイン構築体は、2つ以上のIgG1 Fcドメイン単量体を含むポリペプチドなどのポリペプチドから組み立てられ、かかるポリペプチドは、本開示の一態様である。

【0122】

第41の態様では、本開示は、CTLA4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；任意選択的に第3のリンカー；ならびに任意選択的にヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む第3のIgG1 Fcドメイン単量体を含むポリペプチドを特徴としており、少なくとも1つの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む。

【0123】

第41の様々な実施形態では、CTLA4結合ドメインは、抗体重鎖可変ドメインを含み、CTLA4結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインを含み、第1のIgG1 Fcドメイン単量体は、2または4つ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ドメイン単量体は、2または4つの逆電荷変異を含み、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、改変された突起を形成する変異を含み、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、この場合において当該第一のIgG1 Fcドメイン単量体、第二のIgG1 Fcドメイン単量体、および第三のIgG1 Fcドメイン単量体がそれぞれ改変された突起を形成する変異を含む；ポリペプチドは、第三のリンカーと第三の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 Fcドメイン単量体は、2または4つの逆電荷変異を含み、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3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2のIgG1 Fcドメイン単量体は、2または4つの逆電荷変異を含み、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、突起を形成する変異を含み、第1のIgG1 Fcドメイン単量体は、2または4つの逆電荷

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

40

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、単一アミノ酸置換は、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、

K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択され、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4

2、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、C H 3 ドメイン内の逆電荷変異であるか、または改変された突起を

形成する変異であり、単一アミノ酸置換は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T

3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択され、2 つまたは 4 つの逆電荷変異は、K 4 0 9

D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3

9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択され；C T L A 4 結合ドメインは、s c F v であり；C T L A 4 結合ドメインは、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み；C T L A 4 結合ドメインは、V L ドメインをさらに含み；V H ド

メインは、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 のセットを含み；V H ドメインは、表 2 に記載される抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H

1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み；V H ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み、V H 配列は、C

D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列に対し、少なくとも 95 % または 98 % 同一であり；V H ドメインは、表 2 に記

載される抗体の V H 配列を含み；C T L A 4 結合ドメインは、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3

の配列のセットを含み；C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列と V L 配列のセットからの C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C

D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を含み；C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V H ド

メインと、表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V L ドメインとを含み、V H ドメイン配列および V L ドメイン配列は、C

D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 95 % または 98 % 同一であり；C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の

10

20

30

40

50

VH配列およびVL配列のセットを含み；CTLA4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み；CTLA4結合ドメインは、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。

【0125】

第1または第2のIgG1 Fcドメイン単量体のヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合された上述のポリペプチドの2つのコピーを含むポリペプチド複合体も記載される。

【0126】

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た上述のポリペプチドを含むポリペプチド複合体も記載され、ポリペプチドと第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のシステイン残基と第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との間のジスルフィド結合によって結合される。

【0127】

複合体の様々な実施形態では、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み、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、第2のポリペプチドは、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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。

【0128】

第42の態様では、本開示は、CTLA4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；任意選択的に第3のリンカー；ならびに任意選択的にヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む第3のIgG1 Fcドメイン単量体を含むポリペプチドを特徴としており、少なくとも1つのFcドメイン単量体は、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む。

【0129】

第42の態様の様々な実施形態では、CTLA4結合ドメインは、抗体重鎖可変ドメインを含み；CTLA4結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインを含み；第1のIgG1 Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、第2のIgG1 Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；第1のIgG1 Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第2のIgG1 Fcドメイン単量体は、表4aおよび4bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み；第1のIgG1 Fcドメイン単量体および第2のIgG定常ドメイン単量体の両方は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1 Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1 Fcドメイン単量体、第2のIgG1 Fcドメイン単量体、および第3のIgG1 Fcドメイン単量体はそれぞれ、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1 Fcドメイン単量体をさらに含み、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、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第3のIgG1 Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aお

10

20

30

40

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、単一アミノ酸置換は、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択され、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、C H 3 ドメイン内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り、単一アミノ酸置換は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択され、2 つまたは 4 つの逆電荷変異は、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択され；C T L A 4 結合ドメインは、s c F v であり；C T L A 4 結合ドメインは、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み；C T L A 4 結合ドメインは、V L ドメインをさらに含み；V H ドメインは、表 1 に記載される C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 のセットを含み；V H ドメインは、表 2 に記載される抗体の配列を含む V H ドメインの C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 を含み；V H ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 を含み、V H 配列は、C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列に対し、少なくとも 95 % または 98 % 同一であり；V H ドメインは、表 2 に記

10

20

30

40

50

載される抗体のVH配列を含み；CTL A 4結合ドメインは、表1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み；CTL A 4結合ドメインは、表2に記載される抗体のVH配列と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の配列を含み；CTL A 4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ドメインと、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ドメインとを含み、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、少なくとも95%または98%同一であり；CTL A 4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配列のセットを含み；CTL A 4結合ドメインは、IgG C L抗体定常ドメインおよびIgG C H1抗体定常ドメインを含み；CTL A 4結合ドメインは、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。

【0130】

第1または第2のIgG1 Fcドメイン単量体のヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合された上述のポリペプチドのうちのいずれかの2つのコピーを含むポリペプチド複合体も記載される。

【0131】

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た上述のポリペプチドを含むポリペプチド複合体も記載され、ポリペプチドと第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のシステイン残基と第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との間のジスルフィド結合によって結合される。様々な実施形態では、第2のポリペプチド単量体は、1、2、または3つの逆電荷変異を含み、第2のポリペプチド単量体は、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷変異を含み、ポリペプチド内の表4Aおよび表4B選択される1、2、または3つの逆電荷変異に対して相補的であり、第2のポリペプチドは、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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。

【0132】

第43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ドメイン単量体と、第2のリンカーと、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ドメイン単量体と、任意選択の第3のリンカーと、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ドメイン単量体と、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む、ポリペプチドを特徴とする。

【0133】

第43の態様の様々な実施形態では、ポリペプチドは、第1のIgG1単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびCH1ドメインまたは第1のIgG1単量体のアミノ末端にscFvをさらに含み、第1のIgG1 Fcドメイン単量体は、2つまたは4つ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ドメイン単量体は、2つまたは4つの逆電荷変異を含み、第1のIgG1 Fcドメイン単量体および第2のIgG定常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み、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、第2のIgG1 Fcドメイン単量体、および第3のIgG1 Fcドメイン単量体は各々、改変さ

10

20

30

40

50

50

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

10

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

20

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、単一アミノ酸置換は、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択され、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、C H 3 ドメイン内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り、単一アミノ酸置換は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択され、2 つまたは 4 つの逆電荷変異は、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される。

30

40

【0135】

第 44 の態様では、本開示は、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、第 2 のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、任意選択の第 3 のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む任意選択の第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含むポリペプチドであって、少なくとも 1 つの F c ドメイン単量体が、1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む、ポリペプチドを特徴とする。

【0136】

第 44 の態様の様々な実施形態では、ポリペプチドは、第 1 の I g G 1 F c ドメイン

50

10
20
30
40
50

とも1つは、EUのI253位に単一アミノ酸変異を含み、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、I253位の各アミノ酸変異は、I253Aであり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つは、EUのR292位の単一アミノ酸変異を含み、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、R292位の各アミノ酸変異は、R292Pであり、各Fcドメイン単量体は独立して、EPKSCDKTHTCPPCPAPELLおよびDKTHTHTCPPCPAPELL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

からなり、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DKTHTHTCPPCPAPELLを有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTHTCPPCPAPELを有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTHTCPPCPAPEL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DKTHTHTCPPCPAPELLを有し、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは独立して、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

10

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

20

を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

30

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含み、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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各Fcドメイン単量体のCH3ドメインは独立して、8つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各Fcドメイン単量体のCH3ドメインは独立して、6つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

40

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、各Fcドメイン単量体のCH3ドメインは独立して、5つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含み、単一アミノ酸置換は、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399

50

R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択され； F c ドメイン単量体の各々は独立して、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 5、および最大で 1 0 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 5 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み；単一アミノ酸置換のうちの最大で 6 つが、C H 3 ドメイン中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り；単一アミノ酸置換は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にあり；V H ドメインまたは s c F v は、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 のセットを含み；V H ドメインまたは s c F v は、表 2 に記載される抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み；V H ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み、V H 配列は、C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列に対し、少なくとも 9 5 % または 9 8 % 同一であり；V H ドメインまたは s c F v は、表 2 に記載される抗体の V H 配列を含み；V H ドメインまたは s c F v は、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列のセットを含み；V H ドメインまたは s c F v は、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットからの C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を含み；V H ドメインまたは s c F v は、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V H ドメインと、表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V L ドメインを含み、V H ドメイン配列および V L ドメイン配列は、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 9 5 % または 9 8 % 同一であり；V H ドメインまたは s c F v は、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含む。

10

20

【0137】

また、第 4 1、第 4 2、第 4 3、および第 4 4 の態様の前述のポリペプチドのいずれかをコードする核酸分子が記載される。

【0138】

また、前述のポリペプチドのいずれかをコードする核酸を含む発現ベクター；核酸または発現ベクターを含有する宿主細胞；抗体 V L ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、抗体 V L ドメインと抗体 C L ドメインとを含むポリペプチドをコードする核酸分子）をさらに含有する宿主細胞；抗体 V L ドメインと抗体 C L ドメインとを含むポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含有する宿主細胞；1 0 個以下の単一アミノ酸変異を有する I g G 1 F c 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有する宿主細胞；1 0 個以下の単一アミノ酸変異を有する I g G 1 F c 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有する宿主細胞も記載される。様々な実施形態では、I g G 1 F c ドメイン単量体は、C H 3 ドメイン中に 1 0、8、6、または 4 つ以下の単一アミノ酸変異を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のいずれかのアミノ酸配列を含む。

30

【0139】

本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体のうちのいずれかを含む薬学的組成物も記載される。様々な実施形態では、ポリペプチドの 4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、2 % 未満が、少なくとも 1 つのフコースを有する。

40

【0140】

本開示の第 4 1、第 4 2、第 4 3、および第 4 4 の態様のポリペプチドは、本明細書に記載の様々な F c 抗原結合ドメイン構築体の構成要素として有用である。ゆえに、第 1～第 4 0 の態様のうちのいずれかのポリペプチド、例えば、C T L A 4 結合ドメインを含み得るものは、本開示の第 4 1、第 4 2、第 4 3、および第 4 4 の態様のうちのいずれかのポリペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。

【0141】

50

本開示のすべての態様における使用に有用な他のポリペプチドには、1、2、または3つの空洞を形成する変異（例えば、Y407T、Y407A、F405A、T394S、T394W：Y407T、T394S：Y407A、T366W：T394S、F405T、T366S：L368A：Y407V：Y349C、S364H：F405Aから選択される）を有するFcドメイン単量体を含む（例えば、8、6、5、4、または3つ以下の単一アミノ酸置換を有する配列番号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か、またはそれからなる）ポリペプチドが含まれる。これらのポリペプチドは、任意選択的に、表4Aまたは表4Bからの1、2、または3つの逆電荷変異を含み得る。

【0142】

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、8、6、または4つ以下の単一アミノ酸置換（例えば、CH3ドメイン内のみ）を有する配列番号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的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。

【0143】

本明細書に記載されるCTLA結合構築体を含む組成物により、癌、例えば、黒色腫または転移性黒色腫を治療するための方法もまた記載される。

【0144】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第1のポリペプチド、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

iii) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第2のポリペプチド、

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと、

第1および第3のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第4および第6のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体も記載される。

【0145】

様々な実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つ

10

20

30

40

50

の単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体の各々のCH₃ドメインは、ヒトIgGのアミノ酸配列と比較して最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体は各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号42、43、45、および47のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、CH₃ドメイン内のみであり、第1のFcドメイン単量体および第3のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、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、第2のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第4のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は、第4のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表4Aおよび表4B中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表3中の置換から選択される。

10

【0146】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第1のポリペプチド、

20

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

iii) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第2のポリペプチド、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

30

d) 第6のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

第1および第3のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第4および第6のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体も記載される。

【0147】

40

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第1のポリペプチド、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

50

i i i) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカー、を含む、第2のポリペプチド、

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体も記載される。

10

【0148】

様々な実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体は各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号42、43、45、および47のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、CH3ドメイン内のみであり、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、第2のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第1のFcドメイン単量体および第5のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第3のFcドメイン単量体および第6のFcドメイン単量体は、第4のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表4Aおよび表4B中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表3中の置換から選択される。

20

30

【0149】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、

i i i) 第3のFcドメイン単量体、

i v) 第1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

40

v i) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

i i) 第5のFcドメイン単量体、

i i i) 第6のFcドメイン単量体、

50

i v) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含むFc抗原結合ドメイン構築体もまた記載され、

第1および第7のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第4および第8のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第5のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体と一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFcドメイン単量体と一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する。

【0150】

様々な実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第7のポリペプチドおよび第8のポリペプチドの配列は同一であり、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第7のポリペプチドおよび第8のポリペプチドの配列は同一であり、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体は独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号42、43、45、および47のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、CH3ドメイン内のみであり、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、第2のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第1のFcドメイン単量体および第7のFcドメイン単量体は、第1のFcドメイン単量体と第7のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第4のFcドメイン単量体および第8のFcドメイン単量体は、第4のFcドメイン単量体と第8のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第3のFcドメイン単量体および第9のFcドメイン単量体は、第3のFcドメイン単量体と第9のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第6のFcドメイン単量体および第10のFcドメイン単量体は、第6のFcドメイン単量体と第10のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表4Aおよび表4B中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表3中の置換から選択される。

【0151】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

10

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第 5 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

20

d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 9 の F c ドメイン単量体および第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 10 の F c ドメイン単量体および第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドとを含む F c 抗原結合ドメイン構築体もまた記載され、

第 1 および第 7 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 4 および第 8 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 5 の F c 単量体は一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 3 および第 9 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 4 の F c ドメインを形成し、第 6 および第 10 の F c ドメイン単量体は一緒に、第 5 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒に、第 2 の F a b を形成する。

30

【0152】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

40

v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、お

50

よび

v i) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含むFc抗原結合ドメイン構築体もまた記載され、

第1および第4のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第7のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第5および第8のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体と一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFcドメイン単量体と一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する。

【0153】

様々な実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第7のポリペプチドおよび第8のポリペプチドの配列は同一であり、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの配列は同一であり、第3のポリペプチドおよび第4のポリペプチドの配列は同一であり、第5のポリペプチドおよび第6のポリペプチドの配列は同一であり、第7のポリペプチドおよび第8のポリペプチドの配列は同一であり、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体の各々のCH3ドメインは、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、Fcドメイン単量体は各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号42、43、45、および47のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、CH3ドメイン内のみであり、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、第1のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第2のFcドメイン単量体および第7のFcドメイン単量体は、第2のFcドメイン単量体と第7のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第5のFcドメイン単量体および第8のFcドメイン単量体は、第5のFcドメイン単量体と第8のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第3のFcドメイン単量体および第9のFcドメイン単量体は、第3のFcドメイン単量体と第9のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、第6のFcドメイン単量体および第10のFcドメイン単量体は、第6のFcドメイン単量体と第10のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表4Aおよび表4B中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表3中の置換から選択される。

【0154】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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CTLA-4重鎖結合ドメイン、
 v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

ii) 第5のFcドメイン単量体、

iii) 第6のFcドメイン単量体、

iv) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含むFc抗原結合ドメイン構築体もまた記載され、

第1および第4のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第5および第8のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFcドメイン単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する。

【0155】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

iii) 第3のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体第2のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3お

よび第 6 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 4 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A - 4 重鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A - 4 重鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインと一緒に、第 2 の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体も記載される。

【0156】

様々な実施形態では、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドの配列は同一であり、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドの配列は同一であり、第 5 のポリペプチドおよび第 6 のポリペプチドの配列は同一であり、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドの配列は同一であり、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドの配列は同一であり、第 5 のポリペプチドおよび第 6 のポリペプチドの配列は同一であり、F c ドメイン単量体の各々の C H 3 ドメインは、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、F c ドメイン単量体の各々の C H 3 ドメインは、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、C H 3 ドメイン内のみであり、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は、第 2 の F c ドメイン単量体と第 4 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 5 の F c ドメイン単量体は、第 1 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、第 3 の F c ドメイン単量体および第 6 の F c ドメイン単量体は、第 3 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表 3 中の置換から選択される。

【0157】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

- a) 第 1 のポリペプチドであって、
 - i) 第 1 の F c ドメイン単量体、
 - i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、
 - i i i) 第 1 の C T L A - 4 重鎖結合ドメイン、ならびに
 - i v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、
- b) 第 2 のポリペプチドであって、
 - i) 第 3 の F c ドメイン単量体、
 - i i) 第 4 の F c ドメイン単量体、
 - i i i) 第 2 の C T L A - 4 重鎖結合ドメイン、ならびに
 - i v) 第 3 の F c ドメイン単量体と第 4 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、
- c) 第 5 の F c ドメイン単量体および第 3 の C T L A - 4 重鎖結合ドメインを含む第 3 のポリペプチドと、
- d) 第 6 の F c ドメイン単量体および第 4 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインを含む第 4 のポリペプチドと、
- e) 第 1 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、
- f) 第 2 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドと、
- g) 第 3 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインを含む第 7 のポリペプチドと、
- h) 第 4 の C T L A - 4 軽鎖結合ドメインを含む第 8 のポリペプチドとを含む F c 抗原結合ドメイン構築体もまた記載され、

第 1 および第 5 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 3 および第 6 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 4 の F c 単量体と一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインおよび第 3 の C T L A-4 重鎖結合ドメインと一緒に、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインおよび第 4 の C T L A-4 重鎖結合ドメインと一緒に、第 2 の F a b を形成し、第 3 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメインと一緒に、第 3 の F a b を形成し、第 4 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインと一緒に、第 2 の F a b を形成する。

【0158】

様々な実施形態では、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドの配列は同一であり、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドの配列は同一であり、第 5 のポリペプチド、第 6 のポリペプチド、第 7 のポリペプチド、および第 8 のポリペプチドの配列は同一であり、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドの配列は同一であり、第 3 のポリペプチドおよび第 4 のポリペプチドの配列は同一であり、第 5 のポリペプチド、第 6 のポリペプチド、第 7 のポリペプチド、および第 8 のポリペプチドの配列は同一であり、F c ドメイン単量体の各々の C H 3 ドメインは、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、F c ドメイン単量体の各々の C H 3 ドメインは、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換は、C H 3 ドメイン内にあり、第 2 の F c ドメイン単量体および第 4 の F c ドメイン単量体は、第 2 の F c ドメイン単量体と第 4 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、第 1 の F c ドメイン単量体および第 5 の F c ドメイン単量体は、第 1 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、第 3 の F c ドメイン単量体および第 6 の F c ドメイン単量体は、第 3 の F c ドメイン単量体と第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、ホモ二量体形成を促進する置換は、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択され、ヘテロ二量体形成を促進する置換は、表 3 中の置換から選択される。

【0159】

様々な実施形態では、各リンカーは、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS,
GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GSGGSGSGS,
GSGGSGSGSGSGS, GSGG, GSGG, GSGGGSG,
GSGGGSGSGSGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT,
RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGG,
GGGSGGGSGGGG, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGG, GGGG,
GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGG

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか 3、またはそれからなり、F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の I 2 5 3 位に置換を含み、E U の I 2 5 3 位の各アミノ酸置換は独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択され、F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の R 2 9 2 位に置換を含み、E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸置換

は独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、およびR 2 9 2 Yからなる群から選択され、F cドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、およびD 3 5 6 Rからなる群から選択される置換を含み、各F cドメイン単量体のヒンジは独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L LおよびD K T H T C P P C P A P E L L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。

【0160】

3 3 3 3 3 3

【0161】

定義：

本明細書に記載される場合、「F c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、C_H2ドメインまたはその機能性断片、およびC_H3ドメインまたはその機能性断片)(例えば、(i)別のF cドメイン単量体と二量体形成してF cドメインを形成し、そして(ii)F c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F cドメイン単量体は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、I g G 1ヒンジ、I g G 1 C_H2ドメインおよびI g G 1 C_H3ドメインの少なくとも一部分を含む。したがって、F cドメイン単量体、例えば、ヒトI g G 1 F cドメイン単量体は、E 3 1 6～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、P 3 1 7～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、K 3 1 8～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、K 3 1 8～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、S 3 1 9～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、C 3 2 0～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、D 3 2 1～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、K 3 2 2～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、T 3 2 3～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、K 3 2 3～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、H 3 2 4～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、T 3 2 5～G 4 4 6もしくはK 4 4 7、またはC 3 2 6～G 4 4 6もしくはK 4 4 7にわたることができる。F cドメイン単量体は、I g G、I g E、I g M、I g AまたはI g D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、I g G)。さらに、F cドメイン単量体は、I g Gサブタイプ(例えば、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、またはI g G 4)であり得る(例えば、ヒトI g G 1)。ヒトI g G 1 F c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I g G 1の完全ヒンジドメインは、E UナンバリングE 3 1 6～P 2 3 0またはL 2 3 5にわたり、C_H2ドメインは、A 2 3 1またはG 2 3 6～K 3 4 0にわたり、C_H3ドメインは、G 3 4 1～K 4 4 7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、P 2 3 0またはL 2 3 5のいずれかである。本明細書の多くの実施例において、C_H3ドメインはK 3 4 7を含まない。ゆえにC_H3ドメインは、G 3 4 1～G 4 4 6であってもよい。本明細書の多くの実施例において、ヒンジドメインは、E 2 1 6～L 2 3 5を含み得る。これは、例えば、ヒンジがC_H1ドメインまたはC T L A-4結合ドメインに対してアミノ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事例では、E Uナンバリング2 2 1のA s pは、G l nに変異される。F c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は何も含まない。F cドメイン単量体は、野生型(例えば、ヒト)F c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、F cドメインとF c受容体との間の相互作用を変える。F cドメイン単量体は、野生型F c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、F cドメイン単量体

10

20

30

40

50

間の相互作用を変える。特定の実施形態では、以下のヒト I g G 1 C H 3 ドメイン配列と比較して、C H 3 ドメイン上に、最大で 10、8、6 または 5 つの単一アミノ酸置換が存在する：

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKTVDKSRWQQGQNVFSCSV

MHEALHNHYTQKSLSLSPG

。好適な変更の例は、この技術分野で既知である。

【0162】

本明細書で使用される場合、「F c ドメイン」という用語は、F c 受容体を結合することが可能である 2 つの F c ドメイン単量体による二量体を指す。野生型 F c ドメインでは、2 つの F c 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 F c 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。

10

【0163】

本開示において、「F c 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 F c ドメインを少なくとも 2 つ形成し、少なくとも 1 つの「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 F c 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 F c ドメイン単量体を含むことが可能である。例えば、F c 抗原結合ドメイン構築体は、3 つの F c ドメインを有することが可能であり、そのうちの 2 つが I g G 1 または I g G 1 に由来する F c ドメイン単量体を含み、3 つ目が I g G 2 または I g G 2 に由来する F c ドメイン単量体を含む。別の非限定的な例において、F c 抗原結合ドメイン構築体は、3 つの F c ドメインを有することができ、そのうちの 2 つは「空洞に突起が挿入された対 (p r o t u b e r a n c e - i n t o - c a v i t y p a i r)」を含み、3 つ目は「空洞に突起が挿入された対」を含まない。F c ドメインは、例えば F c γ R I、F c γ R I I a、F c γ R I I b、F c γ R I I I a、F c γ R I I I b、または F c γ R I V である F c 受容体と結合する最小限の構造を形成する。

20

【0164】

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。当技術分野で既知の表面プラズモン共鳴 (S P R : S u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e) または様々な免疫アッセイ (例えば、ウェスタンブロットまたは E L I S A) 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 (C D R)、例えば、表 1 に記載される抗体の 1 つ以上の C D R、表 2 に記載される抗体の 1 つ以上の C D R、または表 2 に記載される抗体の V H ドメインおよび／もしくは V L ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 結合ドメインは、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを、任意選択的に V L 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、C T L A - 4) 結合ドメインは、抗体の F a b 断片または s c F v である。したがって、C T L A - 4 結合ドメインは、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含むか、またはそれからなる「C T L A - 4 重鎖結合ドメイン」と、V L 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「C T L A - 4 軽鎖結合ドメイン」とを含み得る。C T L A - 4 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 I I I 型ドメイン (F N 3) 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。

30

40

【0165】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」 (C D R) 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 C T L A 4 結合に必須である。各可変ドメインは通常、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3、ならびに C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 として識別される 3 つの C D R 領域を有する。各相補

50

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。いくつかの事例では、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。

10

【0166】

「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。いくつかの事例では、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。

20

30

【0167】

「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つのCDRが相互作用して、 $V_H - V_L$ 二量体の表面上のCTLA4結合部位を画定する。

【0168】

「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。

40

【0169】

「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 ドメインおよび V_L ドメインの間にポリペプチドリッカーをさらに含み、それによりscFvはCTLA4結合のための所望の構造を形成することができるようになる。

【0170】

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

50

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。

【0171】

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。

10

【0172】

本明細書で使用される場合、「二量体形成選択性モジュール」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」な二量体形成選択性モジュールは、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性モジュールである。相補的な二量体形成選択性モジュールは、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性モジュールが本明細書に記載される。

20

【0173】

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。

【0174】

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。

30

【0175】

「空洞に突起が挿入された対」という用語は、第1のFcドメイン単量体とその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ドメイン単量体とその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。

40

【0176】

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ドメインを指し、これらの2つのFcドメイン単量体は、これらの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変異(例えば、表4Aおよび表4B中の変異を参照)を含む。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

50

の「枝」Fcドメインとを有するFc構築体において、アミノ末端の「枝」Fcドメインのそれぞれが、ヘテロ二量体のFcドメイン（「枝ヘテロ二量体Fcドメイン」とも称される）であってもよい。

【0177】

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。

【0178】

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。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構築体において、カルボキシル末端の「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）であってもよい。

【0179】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二量体形成選択性モジュール」という用語は、適合するヘテロ二量体形成選択性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性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性モジュールの例を、表3および4に示している。

【0180】

本明細書で使用される場合、「ホモ二量体形成選択性モジュール」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。ホモ二量体形成選択性モジュールの例を、表4および5に示している。

【0181】

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inker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、CTLA4結合ドメインは、CTLA4結合ドメインおよび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、CTLA4結合ドメインは、ペプチドリinkerを介してFcドメイン単量体に結合され、ペプチドリinker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、CTLA4結合ドメインのC末端に結合され、ペプチドリinker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。

【0182】

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。

【0183】

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。

【0184】

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、GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG（配列番号27）の配列を有する。

【0185】

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。

【0186】

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など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。

【0187】

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つ含む分子を指す。

【0188】

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

10

20

30

40

50

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。

【0189】

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共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。

【0190】

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、EUNナンバリングを使用した。

10

【0191】

図24A～24Dは、EUNナンバリングシステムを使用して番号付けされたヒトIgG1Fcドメインを示す。

【0192】

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／または補体依存性細胞傷害活性（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（CDC））、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（CD32a）、FcγRIIb（CD32b）、FcγRIIIa（CD16a）および／またはFcγRIIIb（CD16b））、Fc-アルファ受容体（FcαR）、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つ以上）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。

20

30

40

【0193】

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つ（例えば、少なくとも1、2または3つ）のFcドメイン単量体がアミノ酸改変（例えば、置換）を含む。いくつかの事例では、少なくとも1つの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。

【0194】

50

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など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) ソフトウェアなど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：

$$100 \times (\text{分数である } A/B)$$

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は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。

【0195】

特定の実施形態では、候補配列との比較のために整列させた参照配列は、候補配列の全長または候補配列の連続したアミノ酸（または核酸）残基の選択された部分にわたって、候補配列が50%～100%の同一性（例えば、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、90%～100%、92%～100%、95%～100%、97%～100%、99%～100%、または99.5%～100%の同一性）を呈することを示し得る。比較目的のために整列させた候補配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または100%である。候補配列内のある位置が参照配列内の対応する位置と同じアミノ酸（または核酸）残基によって占有されている場合、それらの分子はその位置で同一である。

【0196】

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（配列番号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、配列番号44、46、48、および50～53のうちのいずれか1つの配列と少なくとも95%同一（少なくとも97%、99%、または99.5%同一）の配列を有し得る。特定の実施形態では、Fc構築体中のFcドメイン単量体は、配列番号48、52および53の配列に対し、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。

【0197】

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配列番号1～36（例えば、配列番号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。

【0198】

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ビヒクルを指す。核酸は典型的に、この技術分野で既知の従来の技術（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、直接の微量注入など）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。

10

【0199】

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剂的に許容される成分を含む。該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。

【0200】

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。

20

30

【0201】

本明細書で使用される場合、「薬剂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、薬剂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、十分な薬剂的安定性を与えなければならず、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。

【0202】

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。

40

【0203】

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】

50

【0204】

【図1】2つのFcドメインおよびCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体1）の説明図である。各Fcドメインは、2つのFcドメイン単量体の二量体である。Fcドメイン単量体のうちの2つ（106および108）がそのC_H3抗体定常ドメイン内に突起を含有する一方で、他の2つのFcドメイン単量体（112および114）は、そのC_H3抗体定常ドメイン内の隣接する位置に空洞を含有する。この構築体は、3つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（102）は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（110）に直列に連続して、スペーサーによりN末端上で連結される、2つの突起含有Fcドメイン単量体（106および108）を含む。V_L含有ドメイン（104）は、V_Hドメインに結合される。第2および第3のポリペプチド（112および114）は各々、空洞含有Fcドメイン単量体を含有する。

10

【図2】3つのFcドメインおよびCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体2）の説明図である。この構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（202）は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（212）に直列に連続して、スペーサーによりN末端上で連結される、3つの突起含有Fcドメイン単量体（206、208、および210）を含む。V_L含有ドメイン（204）は、V_Hドメインに結合される。第2、第3、および第4のポリペプチド（214、216、および218）は各々、空洞含有Fcドメイン単量体を含有する。

20

【図3】2つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体3）の説明図である。この構築体は、3つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（302）は、直列に連続してスペーサーによって連結された2つの突起含有Fcドメイン単量体（304および306）を含有する。第2および第3のポリペプチド（320および322）の各々は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（316および318）に直列にN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（310および314）を含む。V_L含有ドメイン（308および312）は、各V_Hドメインに結合される。

【図4】3つのFcドメインおよび3つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体4）の説明図である。この構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（402）は、直列に連続してスペーサーによって連結された3つの突起含有Fcドメイン単量体（404、406、および408）を含有する。第2、第3、および第4のポリペプチド（428、430、および432）の各々は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（422、416、および410）に直列にN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（426、420、および414）を含む。V_L含有ドメイン（424、418、および412）は、各V_Hドメインに結合される。

30

【図5】2つのFcドメインおよび3つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体5）の説明図である。この構築体は、3つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（502）は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（510）に直列に連続して、スペーサーによりN末端上で連結される、2つの突起含有Fcドメイン単量体（508および506）を含む。第2および第3のポリペプチド（524および526）の各々は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（512および518）に直列にN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（516および522）を含む。V_L含有ドメイン（504、514、および520）は、各V_Hドメインに結合される。

40

【図6】3つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体6）の説明図である。この構築体は、4つのFc単量体含有ポリペプチドから形成されている。第1のポリペプチド（602）は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（612）に直列に連続して、スペーサーによりN末端上で連結され

50

る、3つの突起含有Fcドメイン単量体（606、608、および610）を含む。第2、第3、および第4のポリペプチド（632、634、および636）の各々は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（616、622、および628）に直列にN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（618、624、および630）を含む。V_L含有ドメイン（604、616、622、および628）は、各V_Hドメインに結合される。

【図7】3つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体7）の説明図である。このFc抗原結合ドメイン構築体は、2つのFcドメイン単量体（706および718）の二量体を含み、これらのFcドメイン単量体はいずれもWT配列とは異なる電荷のアミノ酸をそれらのC_H3-C_H3界面に含有し、これらの2つのFcドメイン単量体間で好ましい静電相互作用を促進する。この構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成されている。2つのポリペプチド（702および724）はそれぞれ、WT配列とは異なる荷電アミノ酸をC_H3-C_H3の接合面を含むFcドメイン単量体（706および718）、およびV_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（712および714）へと直列に連続してスパーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（710および720）を含む。第3および第4のポリペプチド（708および722）は各々、空洞含有Fcドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（704および716）は、各V_Hドメインに結合される。

【図8】3つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体8）の説明図である。構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（802および828）は各々、WT配列とは異なる電荷のアミノ酸をそれらのC_H3-C_H3界面に含有するFcドメイン単量体（810および816）に直列に連続してスパーサーによって連結された突起含有Fcドメイン単量体（814および820）を含む。第3および第4のポリペプチド（804および826）はそれぞれ、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（812および818）に直列にN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（808および824）を含む。V_L含有ドメイン（806および822）は、各V_Hドメインに結合される。

【図9】3つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体9）の説明図である。構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（902および936）はそれぞれ、WT配列とは異なる荷電アミノ酸をC_H3-C_H3の接合面を含むFcドメイン単量体（910および924）、およびV_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（908および920）へと直列に連続してスパーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（918および928）を含む。第3および第4のポリペプチド（904および934）は、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（912および926）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（916および932）を含む。V_L含有ドメイン（906、914、922、および930）は、各V_Hドメインに結合される。

【図10】5つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体10）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1002および1032）はそれぞれ、別の突起含有Fcドメイン単量体（1014および1028）、WT配列とは異なる荷電アミノ酸をC_H3-C_H3の接合面を含むFcドメイン単量体（1008および1022）、およびV_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1006および1018）へと直列に連続してスパーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（1016および1030）を含む。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1012、1010、1026、および1024）は各々、空洞含有Fcドメイン単量体を含む。V_L含有ドメイン（1004および1020）は、各V_Hドメインに結合

10

20

30

40

50

される。

【図11】5つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体11）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1102および1148）は、別の突起含有Fcドメイン単量体（1120および1130）と、WT配列とは異なる電荷のアミノ酸を C_H3-C_H3 界面に含有するFcドメイン単量体（1124および1126）とに直列に連続してスペーサーによって連結された突起含有Fcドメイン単量体（1118および1132）を含有する。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1106、1104、1144、および1146）はそれぞれ、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1112、1122、1138、および1128）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1116、1110、1134、および1140）を含む。 V_L 含有ドメイン（1108、1114、1135、および1142）は、各 V_H ドメインに結合される。

10

【図12】5つのFcドメインおよび6つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体12）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1202および1256）は、別の突起含有Fcドメイン単量体（1226および1228）、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面で含むFcドメイン単量体（1210および1244）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1250および1248）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（1224および1230）を含む。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1206、1204、1254、および1252）はそれぞれ、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1218、1212、1236、および1242）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1222、1216、1232、および1238）を含む。 V_L 含有ドメイン（1208、1214、1220、1234、1240、および1246）は、各 V_H ドメインに結合される。

20

【図13】3つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体13）の説明図である。構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1302および1324）は、突起含有Fcドメイン単量体（1312および1316）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1310および1314）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面で含むFcドメイン単量体（1308および1318）を含む。第3および第4のポリペプチド（1306および1320）は、空洞含有Fcドメイン単量体を含む。 V_L 含有ドメイン（1304および1322）は、各 V_H ドメインに結合される。

30

【図14】3つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体14）の説明図である。構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1404および1426）は、突起含有Fcドメイン単量体（1414および1418）に直列に連続してスペーサーによって連結されたWT配列とは異なる電荷のアミノ酸を C_H3-C_H3 界面に含有するFcドメイン単量体（1308および1318）を含有する。第3および第4のポリペプチド（1402および1428）はそれぞれ、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1408および1416）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1410および1422）を含む。 V_L 含有ドメイン（1406および1424）は、各 V_H ドメインに結合される。

40

【図15】3つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体15）の説明図である。構築体は、4つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1502および1536）は、突起含有Fcドメイン単量体（1518および1522）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1514および1532）へと直列に連続してスペーサーによりN

50

末端上で連結される、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面を含むFcドメイン単量体（1512および1524）を含む。第3および第4のポリペプチド（1504および1534）は、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1508および1530）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1510および1526）を含む。 V_L 含有ドメイン（1506、1516、1520、および1528）は、各 V_H ドメインに結合される。

【図16】5つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体16）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1602および1632）は、突起含有Fcドメイン単量体（1612および1622）、第2の突起含有Fcドメイン単量体（1614および1620）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1616および1618）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面を含むFcドメイン単量体（1610および1624）を含む。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1608、1606、1626、および1628）は各々、空洞含有Fcドメイン単量体を含む。 V_L 含有ドメイン（1604および1630）は、各 V_H ドメインに結合される。

【図17】5つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体17）の説明図である。この構築体は、6つのFc単量体含有ポリペプチドから形成されている。2つのポリペプチド（1702および1748）は、N末端に、突起含有Fcドメイン単量体（1720および1730）と、第2の突起含有Fcドメイン単量体（1722および1728）とに直列に連続してスペーサーによって連結されたWT配列とは異なる電荷のアミノ酸を C_H3-C_H3 界面に含有するFcドメイン単量体（1718および1732）を含有する。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1706、1704、1746、および1744）は、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1712、1724、1738、および1726）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1716、1710、1734、および1740）を含む。 V_L 含有ドメイン（1708、1714、1736、および1742）は、各 V_H ドメインに結合される。

【図18】5つのFcドメインおよび6つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体18）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1802および1856）は、突起含有Fcドメイン単量体（1820および1836）、第2の突起含有Fcドメイン単量体（1822および1834）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1826および1830）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面を含むFcドメイン単量体（1818および1838）を含む。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（1806、1804、1854、および1852）はそれぞれ、 V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1812、1828、1844、および1850）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（1816、1810、1840、および1846）を含む。 V_L 含有ドメイン（1808、1814、1824、1832、1842、および1848）は、各 V_H ドメインに結合される。

【図19】5つのFcドメインおよび2つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体19）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（1902および1932）は、WT配列とは異なる荷電アミノ酸を C_H3-C_H3 の接合面を含むFcドメイン単量体（1908および1926）、突起含有Fcドメイン単量体（1916および1918）、および V_H ドメインを含むCTLA4結合ドメイン（1914および1920）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（1912および1930）を含む。第3および第4のポリペプチド（1910および1928）

10

20

30

40

50

は、空洞含有Fcドメイン単量体を含有し、第5および第6のポリペプチド（1906および1924）は、空洞含有Fcドメイン単量体を含有する。V_L含有ドメイン（1904および1922）は、各V_Hドメインに結合される。

【図20】5つのFcドメインおよび4つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体20）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（2002および2048）は、N末端に、WT配列とは異なる電荷のアミノ酸をC_H3-C_H3界面に含有するFcドメイン単量体（2012および2030）と、突起含有Fcドメイン単量体（2040および2038）とに直列に連続してスペーサーによって連結された突起含有Fcドメイン単量体（2020および2022）を含有する。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（2006、2004、2046、および2044）はそれぞれ、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（2014、2042、2028、および2036）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（2018、2010、2024、および2032）を含む。V_L含有ドメイン（2008、2016、2026、および2034）は、各V_Hドメインに結合される。

【図21】5つのFcドメインおよび6つのCTLA4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体（構築体21）の説明図である。構築体は、6つのFcドメイン単量体含有ポリペプチドから形成される。2つのポリペプチド（2102および2156）は、WT配列とは異なる荷電アミノ酸をC_H3-C_H3の接合面で含むFcドメイン単量体（2112および2130）、別の突起含有Fcドメイン単量体（2144および2142）、およびV_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（2148および2138）へと直列に連続してスペーサーによりN末端上で連結される、突起含有Fcドメイン単量体（2120および2122）を含む。第3、第4、第5、および第6のポリペプチド（2106、2104、2154、および2152）はそれぞれ、V_Hドメインを含むCTLA4結合ドメイン（2114、2150、2128、および2136）に直列に連続してN末端上で結合される空洞含有Fcドメイン単量体（2118、2110、2124、および2132）を含む。V_L含有ドメイン（2108、2116、2126、2134、2140、および2146）は、各V_Hドメインに結合される。

【図22】B細胞を標的とする様々な抗CD20構築体を用いたCDCアッセイ、ADCPアッセイ、およびADCCアッセイの結果を示す3つのグラフである。第1のグラフは、S3Y Fc抗原結合ドメイン構築体がCDCを媒介し得ることを示す。中央のグラフは、SAI Fc抗原結合ドメイン構築体およびS3Y Fc抗原結合ドメイン構築体の両方が、ADCP FcγRIIaレポーターアッセイにおいて100倍超増強された効力を呈することを示す。第3のグラフは、SAI Fc抗原結合ドメイン構築体およびS3Y Fc抗原結合ドメイン構築体が、フコシル化mAbと比較して増強されたADCC活性および脱フコシル化mAbと同様の活性を呈することを示す。

【図23】CTLA4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。パネルAは、CTLA4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、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。パネルBは、長鎖Fcの融合タンパク質として発現されるscFvを示す。パネルCは、別個に発現され、外因的に付加され、化学結合によりFc抗原結合ドメイン構築体に結合された重鎖構成要素および軽鎖構成要素を示す。

【図24】図24Aは、EUNアンバリングを用いたヒトIgG1のアミノ酸配列（配列番号43）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、CH2ドメインは下線が無く、そしてCH3領域は下線付きである。図24Bは、EUNアンバリングを用いるヒトIgG1のアミノ酸配列（配列番号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ドメインは下線が無く、そしてCH3領域は下線付きであり、K447を欠く。図24Cは、EUNアンバリングを用いるヒトIgG1のアミノ酸配列（配列番号47）を示す。ヒンジ領域は二重下線によって示され、CH2ドメインは下線が無く、そしてCH3領域は下線付きであり、そして447Kを欠く。図2

10

20

30

40

50

4 Dは、E Uナンバリングを用いるヒト I g G 1 のアミノ酸配列（配列番号 4 2）を示す。両端を含む E 2 1 6 ~ C 2 2 0 を欠いたヒンジ領域は二重下線によって示され、C H 2 ドメインは下線が無く、そして C H 3 領域は下線付きである。

【図 2 5】抗 C T L A - 4 F c 構築体の C D C 活性の分析の結果を示す。

【図 2 6】抗 C T L A - 4 F c 構築体の A D C P 活性の分析の結果を示す。

【図 2 7】抗 C T L A - 4 F c 構築体の A D C C 活性の分析の結果を示す。

【図 2 8】抗 C T L A - 4 F c 構築体および抗 C T L A 4 抗体による一次ヒト制御性 T 細胞の N K 細胞媒介性殺傷の分析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0205】

10

詳細な説明

多くの治療用抗体は、抗体依存性細胞傷害（A D C C : a n t i b o d y - d e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y）、抗体依存性細胞貪食（A D C P : a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l u l a r p h a g o c y t o s i s）、および補体依存性細胞傷害（C D C : c o m p l e m e n t - d e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y）など、F c 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。いくつかの事例では、本開示は、治療薬、例えば、既知の治療用抗体を含む既知の単一 F c ドメインの C T L A 4 結合ドメインを、少なくとも 2 つの F c ドメインと組み合わせて、固有の生物活性を有する新規の治療薬を生成することを企図する。いくつかの事例では、本明細書に開示される新規治療剤は、例えば既知の治療用抗体などの既知の F c ドメイン含有治療剤を越える生物活性を有する。少なくとも 2 つの F c ドメインの存在により、エフェクター機能を強化することができ、そして例えば A D C P および／または C D C と組み合わせられた A D C C 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。一貫した生物学的機能を有する生成物を生成するために、F c ドメインの数の制御は、決定的である。本開示は、F c ドメインをコードするペプチドのホモ二量体形成およびヘテロ二量体形成を制御して、限定された数のポリペプチド鎖から別個のサイズの分子を組み立てる F c 改変ツールのセットを特徴とする。国際公開第 W O / 2 0 1 5 / 1 6 8 6 4 3 号、同第 W O 2 0 1 7 / 1 5 1 9 7 1 号、同第 W O 2 0 1 7 / 2 0 5 4 3 6 号、および同第 W O 2 0 1 7 / 2 0 5 4 3 4 号は、2 つ以上の F c ドメインを有する分子を組み立てるための F c 改変ツールおよび方法を開示しており、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。改変ツールは、製造結果を著しく改善する構造特徴（例えば、グリシンリンカー）を含む。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。薬学的組成物に高度の均質性をもたせることにより、望ましくない物質（例えば、分解産物、および／または凝集産物または多量体）によって引き起こされる薬学的製品の凝集または分解の可能性も最小限に抑えられ、望ましくない物質によって引き起こされるオフターゲットおよび有害な副作用も制限される。

20

30

【0206】

40

本明細書で詳細に記載されるように、本発明者らは、2 つの F c ドメイン単量体を直列に連続して結合するためにグリシン残基のみを含むスペーサーの使用、末端リシン残基が取り除かれたポリペプチド配列の使用、およびヘテロ二量体形成選択性モジュールの 2 つのセットである（i）異なる逆電荷変異を有するヘテロ二量体形成選択性モジュールおよび（i i）改変された空洞および突起を有するヘテロ二量体形成選択性モジュールの使用を含むアプローチを使用して、F c 抗原結合ドメイン構築体の F c ドメイン構成要素を改変することにより、組成物の均質性を改善した。

【0207】

本発明者らは、リンカーによって分離された複数の F c 配列を含む 1 つの長鎖ペプチドおよび単一の F c 配列を含む短鎖の複数のコピーを使用して、F c ドメインが直列に連結

50

された一連のFc抗原結合ドメイン構築体を設計した（Fc抗原結合ドメイン構築体1～6、図1～図6）。ヘテロ二量体形成変異を各Fc配列に導入して、より短いまたはより大きい複合体の形成を最小限に抑えた所望の直列立体配置への組み立てを確実にした。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。N個のFcドメインを有するペプチドに関しては、そのような構築体は、CTLA4結合ドメインがそれぞれ長ペプチド鎖、短ペプチド鎖、またはその両方に導入されるかどうかに応じて、1～N+1個のCTLA4結合ドメインとともに調製され得る。

【0208】

Fc抗原結合ドメイン構築体1～6（図1～図6）において、FcドメインをこれらのFcドメイン間の単一の分岐点に連結した。これらの構築体は、リンカーによって分離された複数のFc配列を含む長鎖ペプチドの2つのコピーを含み、そこで、分岐Fc配列がホモ二量体形成変異を含み、非分岐Fcドメインがヘテロ二量体形成変異を含む。長鎖のヘテロ二量体形成変異に対して相補的な変異を有する単一のFc配列を含む短鎖の複数コピーが、多量体Fc足場を完成させるために使用される。ヘテロ二量体形成Fcドメインは、分岐FcドメインのC末端（例えば、Fc抗原結合ドメイン構築体7～12、図7～図12）、N末端（例えば、Fc抗原結合ドメイン構築体13～18、図13～図18）、またはそれらの両方（例えば、Fc抗原結合ドメイン構築体19～21、図19～図21）に連結され得る。直列の複数のFcドメインは、分岐Fcドメインのいずれかの末端に連結され得る。CTLA4結合ドメインは、長ペプチド鎖に導入されてもよく、それにより組み立てられたタンパク質分子当たり、2つのCTLA4結合ドメインが生じる。あるいは、CTLA4結合ドメインは、短ペプチド鎖に導入されてもよく、それにより組み立てられたタンパク質分子当たり、N-1個のCTLA4結合ドメインが生じ、Nは、組み立てられたタンパク質分子中のFcドメインの数である。CTLA4結合ドメインが、短ペプチド鎖および長ペプチド鎖の両方に導入された場合、その結果得られる組み立てられたタンパク質分子は、N+1個のCTLA4結合ドメインを含む。

【0209】

モノクローナル抗体（mAb）およびFcドメインに対するこれまでの改変の試みは、Fcドメイン内に変異を作製してFcγRIIIaへの結合を強化し、ひいては抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）応答を増強すること、およびFcドメインを脱フコシル化してFcγRIIIaへの結合を強化し、ひいてはADCC応答を増強することを含んだ。

【0210】

FcγRIIIaへの結合を強化するためにFcドメイン中に変異を有する抗体、またはFcドメインの脱フコシル化を有する抗体と比較して、本開示に開示されるFc抗原結合ドメイン構築体は、予想外にも、複数のクラスのFcγ受容体へのより強い結合と、複数の細胞傷害経路の強化された活性を特徴とする。本開示のFc抗原結合ドメイン構築体は、それらの対応するフコシル化、および脱フコシル化された親モノクローナル抗体と比較して、FcγRIIIaとFcγRIIIaの両方への結合を強化させることができる（実施例46を参照）。さらに、本開示のFc抗原結合ドメイン構築体は、予想外にも、ADCC経路反応の強化に加えて、補体依存性細胞傷害（CDC）経路、および／または抗体依存性細胞貪食（ADCP）経路を介在する能力を特徴とする（実施例47を参照）。

【0211】

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CH2およびIgAからのCH3による複合型、または、ヒンジおよびIgG1からのCH2であるがIgG3からのCH3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FcγRIIIa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CH3抗体定常ドメインが、CH3-CH3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VH、VL、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。

10

【0212】

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、配列番号42の配列に対し、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、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、配列番号44、46、48、および50～53のうちのいずれか1つの配列と少なくとも95%同一（例えば、少なくとも97%、99%、または99.5%同一）の配列を含み得る。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、配列番号48、52、および53のうちのいずれか1つの配列に対し、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。

20

配列番号 42

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 44

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 46

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

配列番号 48

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

配列番号 50

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号 51

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLKSDGSFFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 52

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLKSDGSFFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

配列番号 53

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGDSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【0213】

I I . F c ドメイン

本明細書で規定するように、F c 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F c ドメイン単量体を含む。F c ドメインは、F c 受容体、例えばF c-γ受容体（すなわち、F c γ受容体（F c γ R））、F c-α受容体（すなわち、F c α受容体（F c α R））、F c-ε受容体（すなわち、F c ε受容体（F c ε R））および／または胎児性F c 受容体（F c R_n）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F c ドメインは、F c γ受容体（例えば、F c γ R I（CD64）、F c γ R I I A（CD32）、F c γ R I I B（CD32）、F c γ R I I I A（CD16a）、F c γ R I I I B（CD16b））および／またはF c γ R I Vおよび／または胎児性F c 受容体（F c R_n）に結合する。

30

【0214】

I I I . C T L A 4 結合ドメイン

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。C T L A 4 結合ドメインは、抗体のC T L A 4 結合ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、C T L A 4 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。C T L A 4 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、F N 3 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。

【0215】

断片の抗原結合（F a b）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。F a b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つの1セットを含有する。F a b断片は、免疫グロブリン抗体アイソタイプのI g G、I g E、I g M、I g AまたはI g Dのものであり得る。またF a b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、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3またはI g G 4）のものであり得る。いくつかの実施形態では、F a b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F a b断片に共有結合的に付加され、F（a b'）₂断片を形成してもよい。いくつかの実施形態では、F a bは、例え

40

50

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。

【0216】

いくつかの実施形態では、F a b断片の一部のみがC T L A 4結合ドメインとして使用され得る。いくつかの実施形態では、F a bの軽鎖構成要素 ($V_L + C_L$) のみ、またはF a bの重鎖構成要素 ($V_H + C_H$) のみを使用される場合がある。いくつかの実施形態では、F a b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 (s c F v) が使用される場合がある。他の実施形態では、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒にC T L A 4結合領域の対を形成する直列のF d断片 ($V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$) の対を含む直鎖抗体が使用され得る。

10

【0217】

いくつかの実施形態では、本開示のC T L A 4結合ドメインは、表1に列記される標的または抗原に関して、以下の表1にさらに詳細に提供されるように、列記される標的または抗原に関して表1に列記されるC D R配列のうちの1、2、3、4、5、または6つすべてを含む。

【0218】

(表1) C D R配列

抗体名	CDR1-IMGT (重鎖)	CDR2-IMGT (重鎖)	CDR3-IMGT (重鎖)	CDR1-IMGT (軽鎖)	CDR2-IMGT (軽鎖)	CDR3-IMGT (軽鎖)
抗CTLA mAb	GFTFSSY T (配列番号 91)	ISYDGNN K (配列番号 121)	ARTGWLG PFDY (配列番号 155)	QSVGSSY (配列番号 185)	GAF	QQYGSSP WT (配列番号 218)

20

【0219】

(表2) V HおよびV L配列

抗体名	VH	VL
トレメリムマブ	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

30

40

【0220】

50

Fc 抗原結合ドメイン構築体 1 の CTLA 4 結合ドメイン (図 1 の 110 / 104) は、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0221】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 2 の CTLA 4 結合ドメイン (図 2 の 212 / 204) は、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0222】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 3 の CTLA 4 結合ドメイン (図 3 の 308 / 316 および 312 / 318) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

10

【0223】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 4 の CTLA 4 結合ドメイン (図 4 の 410 / 412、416 / 418、および 422 / 424) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0224】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 5 の CTLA 4 結合ドメイン (図 5 の 510 / 504、512 / 514、および 518 / 520) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0225】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 6 の CTLA 4 結合ドメイン (図 6 の 612 / 604、614 / 616、620 / 622、および 626 / 628) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

20

【0226】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 7 の CTLA 4 結合ドメイン (図 7 の 712 / 714 および 714 / 716) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0227】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 8 の CTLA 4 結合ドメイン (図 8 の 812 / 806 および 818 / 822) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

30

【0228】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 9 の CTLA 4 結合ドメイン (図 9 の 908 / 906、920 / 922、912 / 914、および 926 / 930) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0229】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 10 の CTLA 4 結合ドメイン (図 10 の 1006 / 1004 および 1018 / 1020) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0230】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 11 の CTLA 4 結合ドメイン (図 11 の 1112 / 1114、1122 / 1108、1128 / 1142、および 1138 / 1136) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

40

【0231】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 12 の CTLA 4 結合ドメイン (図 12 の 1218 / 1220、1212 / 1214、1250 / 1208、1248 / 1246、1242 / 1240、および 1236 / 1234) はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0232】

50

Fc 抗原結合ドメイン構築体 13 の CTLA4 結合ドメイン（図 13 の 1310 / 1304 および 1314 / 1322）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0233】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 14 の CTLA4 結合ドメイン（図 14 の 1408 / 1406 および 1416 / 1424）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0234】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 15 の CTLA4 結合ドメイン（図 15 の 1508 / 1506、1514 / 1516、1532 / 1520、および 1530 / 1528）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0235】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 16 の CTLA4 結合ドメイン（図 16 の 1616 / 1604 および 1618 / 1630）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0236】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 17 の CTLA4 結合ドメイン（図 17 の 1712 / 1714、1724 / 1708、1726 / 1742、および 1738 / 1736）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0237】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 18 の CTLA4 結合ドメイン（図 18 の 1812 / 1814、1828 / 1808、1826 / 1824、1830 / 1832、1850 / 1848、および 1844 / 1842）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0238】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 19 の CTLA4 結合ドメイン（図 19 の 1914 / 1904 および 1920 / 1922）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0239】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 20 の CTLA4 結合ドメイン（図 20 の 2014 / 2016、2042 / 2008、2036 / 2034、および 2028 / 2026）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0240】

Fc 抗原結合ドメイン構築体 21 の CTLA4 結合ドメイン（図 21 の 2114 / 2116、2150 / 2108、2148 / 2146、2138 / 2140、2136 / 2134、および 2128 / 2126）はそれぞれ、表 1 に列記される抗体のうちのいずれか 1 つの 3 つの重鎖および 3 つの軽鎖の CDR 配列を含み得る。

【0241】

IV. 二量体形成選択性モジュール

本開示において、二量体形成選択性モジュールは、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、二量体形成選択性モジュールは、2 つの Fc ドメイン単量体の相互作用する C_H3 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_H3 抗体定常ドメインの部分である。二量体形成選択性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_H3 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、二量体形成選択性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

10

20

30

40

50

成選択性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、Quick Change（登録商標）Mutagenesisなど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。

【0242】

いくつかの実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、C_H3抗体定常ドメイン内に（本明細書でさらに説明される「ホール」の）改変された空洞を含む。他の実施形態では、二量体形成選択性モジュールは、C_H3抗体定常ドメイン内に改変された突起（または本明細書でさらに説明される「ノブ」）を含む。Fcドメインを選択的に形成するために、適合性の二量体形成選択性モジュールを有する2つのFcドメイン単量体（例えば、一方が改変された空洞を含むC_H3抗体定常ドメインであり、他方が改変された突起を含むC_H3抗体定常ドメインである）とを組み合わせ、Fcドメイン単量体の空洞内突起（「ノブアンドホール」）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性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性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。表3は、好適な変異を列記する。

【0243】

他の実施形態では、ヘテロ二量体形成は、正に荷電したアミノ酸置換を含む二量体形成選択性モジュールを有するFcドメイン単量体および負に荷電したアミノ酸置換を含む二量体形成選択性モジュールを有するFcドメイン単量体の使用によって達成され、これらが選択的に組み合わせ、荷電したアミノ酸の好ましい静電ステアリング（本明細書でさらに説明される）により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、以下の正に荷電したアミノ酸置換および負に荷電したアミノ酸置換：K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439DおよびK439Eのうちの1つを含み得る。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。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性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。表3は、ヘテロ二量体形成を促進するための様々な逆荷電二量体形成選択性モジュールを列記する。

【0244】

ノブおよびホール変異および静電ステアリング変異以外に、ヘテロ二量体形成を促進するために用いられ得る追加のタイプの変異が存在する。これらの変異も表3に列記されている。

【0245】

他の実施形態では、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性モジュールを含む。ホモ二量体形成選択性モジュールは、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/

10

20

30

40

50

K 4 3 9 D、K 4 0 9 E / D 3 9 9 K、K 3 9 2 E / D 3 9 9 K、E 3 5 7 K / K 3 7 0 D または D 3 5 6 K / K 4 3 9 E を含む F c 単量体を含む。別の実施形態では、F c ドメインは、例えば K 4 0 9 D / D 3 9 9 K / E 3 5 7 K / K 3 7 0 E 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 F c ドメイン単量体を含む。表 4 A および 4 B は、ホモ二量体形成を促進する様々な選択性を列挙する。

【0246】

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、(i i) 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 F c ドメイン単量体を、(i) 少なくとも 1 つの逆電荷の変異と、(i i) 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 F c ドメイン単量体と選択的に結合して、F c 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 K 3 7 0 D と、改変された空洞 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V とを含有する F c ドメイン単量体と、反転した電荷の変異 E 3 5 7 K と、改変された突起 S 3 5 4 C および T 3 6 6 W とを含有する他の F c ドメイン単量体とを選択的に結合して、F c ドメインを形成する。

【0247】

こうした F c 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性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 F c ドメインの形成は促されない。

【0248】

さらに、画成された F c ドメイン単量体による F c 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 F c ドメイン単量体それぞれに対する C 末端融合を含む L U Z-Y アプローチ (米国特許出願公開第 W O 2 0 1 1 0 3 4 6 0 5 号) のみならず、I g A および I g G 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 F c ドメイン単量体により F c ドメインを生成する、ストランド交換改変ドメイン (S E E D (s t r a n d - e x c h a n g e e n g i n e e r e d d o m a i n)) 体のアプローチ (D a v i s e t a l . , P r o t e i n E n g D e s S e l . 2 3 : 1 9 5 - 2 0 2 , 2 0 1 0) が含まれるが、これらに限定されない。

【0249】

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 (k n o b - i n t o - h o l e)」ストラテジー) は、C a r t e r およびその協同研究者 (R i d g w a y e t a l . , P r o t e i n E n g . 9 : 6 1 7 - 6 1 2 , 1 9 9 6、A t w e l l e t a l . , J M o l B i o l . 2 7 0 : 2 6 - 3 5 , 1 9 9 7、M e r c h a n t e t a l . , N a t B i o t e c h n o l . 1 6 : 6 7 7 - 6 8 1 , 1 9 9 8) 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 , 7 3 1 , 1 6 8 号にも開示されている。

【0250】

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 F c 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、F c 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 F c 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_H 3 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_H 3 抗体定常ドメインが、2つの F_c 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性モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択性モジュール）（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_H 3 抗体定常ドメイン内の改変された空洞は、もう一方の C_H 3 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_H 3 抗体定常ドメイン内の改変された突起は、もう一方の C_H 3 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。

【0251】

改変された空洞は、チロシンまたはトリプトファンなど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など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性モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択性モジュール）（上記でさらに記載した）は、C_H 3 抗体定常ドメイン内に Y 4 0 7 V 変異など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性モジュール（例えば、ヘテロ二量体形成選択性モジュール）（上記でさらに記載した）は、C_H 3 抗体定常ドメイン内に T 3 6 6 W 変異など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_H 3 ドメイン間のジスルフィド結合改変と組み合わせられる。一実施例では、改変された空洞 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V を含有する F_c ドメイン単量体は、改変された突起 S 3 5 4 C および T 3 6 6 W を含有する他の F_c ドメイン単量体と選択的に結合して、F_c ドメインを形成することができる。別の実施例では、Y 3 4 9 C を追加することで改変された空洞を含有する F_c ドメイン単量体と、S 3 5 4 C を追加することで改変された突起を含有する F_c ドメイン単量体が選択的に組み合わせられて、F_c 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（H A - T F 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。

【0252】

C_H 3 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_H 3 抗体定常ドメインの界面における残基の総数である。

【0253】

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、例えば2つの異なるポリペプチド中の F_c 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 F_c ドメイン単量体の各々に導入する。ゆえに、F_c 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：D 3 5 6 K、D 3 5 6 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、D 3 9 9 K、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 4 3 9 D および K 4 3 9 E。例えば1つの F_c ドメイン単量体、例えば空洞（Y 3 4 9 C、T 3

66S、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。

【0254】

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。

【0255】

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、米国特許出願公開第2014-0024111号に開示されている。

【0256】

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など、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など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、二量体形成選択性モジュール(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。

【0257】

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性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。

【0258】

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、表3に含まれるが、それらに限定されない電荷残基対などの2つのFcドメイン単量体に異なるが適合性の変異を導入することによって促進され得る。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、以下の正に荷電したアミノ酸置換および負に荷電したアミノ酸置換:D356K、D356R、E357K、E357R、K370D、K370E、K392D、K392E、D399K、K409D、K409E、K439DおよびK439Eのうちの1つを含み得る。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

10

20

30

40

50

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。

【0259】

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では、3つのFcドメインのうちの2つが、静電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。「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ドメインを指し、これらの2つのFcドメイン単量体は、これらの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変異（ヘテロ二量体形成選択性モジュール）（例えば、表4Aおよび表4B中の変異を参照）を含む。3つのFcドメイン、すなわち、1つのカルボキシル末端「幹」Fcドメインおよび2つのアミノ末端「枝」Fcドメインを有するFc抗原結合ドメイン構築体では、アミノ末端「枝」Fcドメインは各々、ヘテロ二量体Fcドメイン（「枝ヘテロ二量体Fcドメイン」とも呼ばれる）（例えば、図1中、Fcドメイン単量体106および114またはFcドメイン単量体112および116によって形成されるヘテロ二量体Fcドメイン、図2中、Fcドメイン単量体206および214またはFcドメイン単量体212および216によって形成されるヘテロ二量体Fcドメイン）であり得る。枝ヘテロ二量体Fcドメインは、E357Kを含むFcドメイン単量体およびK370Dを含む別のFcドメイン単量体によって形成され得る。

【0260】

（表3）Fcヘテロ二量体形成方法

10

20

方法	変異（鎖A）	変異（鎖B）	参考文献
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	S354C, T366W	Y349C, T366S, L368A, Y407V	
ノブイントゥ ホール(CW- CSAV)	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W	Zeidler et al, <i>J Immunol.</i> 163: 1246-52, 1999
HA-TF	S364H, F405A	Y349T, T394F	WO2011028952
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

10

20

30

方法	変異 (鎖A)	変異 (鎖B)	参考文献
静電的ステアリング(DD-KK)	K392D, K409D	E356K, D399K	Gunasekaran et al., <i>J Biol Chem.</i> 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
VYAV-VLLW	T350V, L351Y, F405A, Y407V	T350V, T366L, K392L, T394W	Von Kreudenstein et al, <i>MAbs</i> , 5:646-54, 2013
EEE-RRR	D221E, P228E, L368E	D221R, P228R, K409R	Strop et al, <i>J Mol Biol</i> , 420:204-19, 2012
EW-RVT	K360E, K409W	Q347R, D399V, F405T	Choi et al, <i>Mol Cancer Ther</i> , 12:2748-59, 2013
EW-RVT _{S-S}	K360E, K409W, Y349C	Q347R, D399V, F405T, S354C	Choi et al, <i>Mol Immunol</i> , 65:377-83, 2015
電荷導入(DK)	L351D	T366K	De Nardis, <i>J Biol Chem</i> , 292:14706-17, 2017
電荷導入(DEKK)	L351D, L368E	L351K, T366K	De Nardis, <i>J Biol Chem</i> , 292:14706-17, 2017
L-R	F405L	K409R	Labrijn et al, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 110:5145-50, 2013
	IgG/A キメラ	IgG/A キメラ	Davis et al, <i>Protein Eng Des Sel</i> , 23:195-202, 2010
	S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N	Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R	Skegro et al, <i>J Biol Chem</i> , 292:9745-59, 2017
	S364K, T366V, K370T, K392Y, K409W, T411N	F405A, Y407S	Skegro et al, <i>J Biol Chem</i> , 292:9745-59, 2017

10

20

30

40

方法	変異（鎖A）	変異（鎖B）	参考文献
	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
DMA-RRVV	K360D, D399M, Y407A	E345R, Q347R, T366V, K409V	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
SYMV-GDQA	Y349S, K370Y, T366M, K409V	E356G, E357D, S364Q, Y407A	Leaver-Fay et al, Structure, 24:641-51, 2016
静電的ステアリング	K370D	E357K	
静電的ステアリング	K370D	E357R	
静電的ステアリング	K370E	E357K	
静電的ステアリング	K370E	E357R	
静電的ステアリング	K370D	D356K	
静電的ステアリング	K370D	D356R	
静電的ステアリング	K370E	D356K	
静電的ステアリング	K370E	D356R	

10

20

注記：すべての残基はE U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）

30

【0261】

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性モジュール）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性モジュールを含む。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ステアリング変異が表4Aおよび表4Bに示されるが、これらに限定されない。一実施形態では、Fcドメインは、二重逆電荷変異体（表4Aおよび表4B）、例えば、K409D/D399Kを各々含む、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、四重逆電荷変異体（表4Aおよび表4B）、例えば、K409D/D399K/K370D/E357Kを各々含む、2つのFcドメイン単量体を含む。

40

【0262】

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

50

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、カルボキシル末端の「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。

10

【0263】

（表4A）Fcホモ二量体化方法－各鎖中の2つの変異

方法	変異（鎖AおよびB）	参考文献
野生型	なし	US Pat. # 8,216,805
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	K409D/D399R	
静電的ステアリング	K409E/D399R	
静電的ステアリング	K392D/D399R	

20

30

40

【0264】

（表4B）Fcホモ二量体化方法－各鎖中の4つの変異

ホモ二量体Fcドメイン内の2つのFc ドメイン単量体の各々のC _H 3抗体定常 ドメインにおける逆電荷変異（複数可）	ホモ二量体Fcドメイン内の2つのFc ドメイン単量体の各々のC _H 3抗体定常 ドメインにおける逆電荷変異（複数可）
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

10

20

30

ホモ二量体Fcドメイン内の2つのFc ドメイン単量体の各々のC _H 3抗体定常 ドメインにおける逆電荷変異（複数可）	ホモ二量体Fcドメイン内の2つのFc ドメイン単量体の各々のC _H 3抗体定常 ドメインにおける逆電荷変異（複数可）
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
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

10

20

【0265】

V I I . 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_H3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_H3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。

30

【0266】

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。

40

【0267】

50

【 0 2 6 8 】

【 0 2 6 9 】

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既知であり、例えば、グリシンおよびセリンなど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、GGGS（配列番号1）、GSG（配列番号2）またはSGG（配列番号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（配列番号4）、GSGSGS（配列番号5）、GSGSGSGS（配列番号6）、GSGSGSGSGS（配列番号7）またはGSGSGSGSGSGS（配列番号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（配列番号9）、GGSGGSGGS（配列番号10）およびGGSGGSGGSGGS（配列番号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（配列番号12）、GGSGGGSGGGSG（配列番号13）、GGSGGGSGGGSGGGSG（配列番号14）またはGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG（配列番号15）である、GGSG（配列番号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（

50

【 0 2 7 0 】

【 0 2 7 1 】

【 0 2 7 2 】

【 0 2 7 3 】

【 0 2 7 4 】

他の実施形態では、スパーサーはまた、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 G E N L Y F Q S G G（配列番号 28）、S A C Y C E L S（配列番号 29）、R S I A T（配列番号 30）、R P A C K I P N D L K Q K V M N H（配列番号 31）、G G S A G G S G S G S S G G S S G A S G T G T A G G T G S G S G T G S G（

配列番号 32)、AAANS S I D L I S V P V D S R (配列番号 33) または G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S (配列番号 34) を含有することも可能である。

【0275】

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 G G G S G G S G G G S (配列番号 35) および S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G (配列番号 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 G G S G G G S G G G S G G G S G G S (配列番号 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。

10

【0276】

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、上述の配列番号1～36のいずれか1つの配列に対し、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、配列番号17、18、26、および27のいずれか1つの配列に対し、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、配列番号18または27の配列に対し、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。

20

【0277】

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C_H3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つの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。

30

40

【0278】

スペーサーは、Fcドメイン単量体のヒンジドメインのN末端と、CTLA-4結合ドメインのカルボキシ末端との間に存在し得（例えば、CTLA-4重鎖結合ドメインのCH1ドメインまたはCTLA-4軽鎖結合ドメインのCLドメイン）、これにより、ドメインが、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、

50

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個のアミノ酸)のスペーサー、または少なくとも12個のアミノ酸、例えば、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、または12～13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、または190～200個のアミノ酸)を含むアミノ酸スペーサーによって結合される。

【0279】

V I I I . 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。

【0280】

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既知である。一実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、配列D I C L P R W G C L W (配列番号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、配列番号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。

【0281】

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、C T L A 4 結合ドメインを含む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、C T L A 4 結合ドメインを含む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末端に融合され得る。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ることが期待される。

【0282】

V I I I . Fc抗原結合ドメイン構築体

概して、本開示は、2～10個のFcドメインおよび1つ以上のC T L A 4 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

10

20

30

40

50

／またはアビディティを有し得る。この開示は、F cドメインの2つのF c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。F c抗原結合ドメイン構築体は、偶数のF cドメイン単量体を含み、F cドメイン単量体の各対がF cドメインを形成する。F c抗原結合ドメイン構築体は、4つのF cドメイン単量体の二量体から形成される最小で2つの機能性F cドメインと、1つのC T L A 4結合ドメインとを含む。C T L A 4結合ドメインは、例えば、リンカー、スパーサー、ペプチド結合、化学結合、または化学的部分で、F cドメインに結合され得る。

【0283】

F c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。F c抗原結合ドメイン構築体は、非対称の直列F cドメインから組み立てられ得る(図1～6)。F c抗原結合ドメイン構築体は、単独で分岐したF cドメインから組み立てられ得、この分岐点は、N末端F cドメインにある(図7～12)。F c抗原結合ドメイン構築体は、単独で分岐したF cドメインから組み立てられ得、この分岐点は、C末端F cドメインにある(図13～18)。F c抗原結合ドメイン構築体は、単独で分岐したF cドメインから組み立てられ得、この分岐点は、N末端F cドメインにもC末端F cドメインにもない(図19～21)。

【0284】

C T L A 4結合ドメインは、多くの方法でF c抗原結合ドメイン構築体に結合され得る。C T L A 4結合ドメインは、F c鎖の融合タンパク質として発現され得る。C T L A 4結合F a bの重鎖構成要素は、F c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23、パネルA)。いくつかの実施形態では、s c F vは、C T L A 4結合ドメインとして使用される。s c F vは、F c長鎖の融合タンパク質として発現され得る(図23、パネルB)。いくつかの実施形態では、長鎖構成要素および軽鎖構成要素は別個に発現され、F c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、C T L A 4結合ドメインは別個に発現され、後に化学結合を用いてF c抗原結合ドメイン構築体に結合される(図23、パネルC)。

【0285】

いくつかの実施形態では、F c抗原結合ドメイン構築体中の1つ以上のF c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、F c抗原結合ドメイン構築体中のすべてのF c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、F c抗原結合ドメイン構築体中の1つ以上のF cポリペプチドのC末端リシンの非存在は、F c抗原結合ドメイン構築体(例えば3つのF cドメインを有するF c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F cドメインを有するF c抗原結合ドメイン構築体の群。

【0286】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のF c抗原結合ドメイン構築体中の第1、第2、第3、第4、第5、または第6のポリペプチド(例えば、図1のポリペプチド102、112、および114、図2の202、214、216、および218、図3の302、320、および322、図4の402、428、430、および432、図5の502、524、および526、図6の602、632、634、および636、図7の702、708、722、および724、図8の802、804、826、および828、図9の902、904、934、および936、図10の1002、1010、1012、1024、1026、および1032、図11の1102、1104、1106、1144、1146、および1148、図12の1202、1204、1206、1252、1254、および1256、図13の1302、1306、1320、および1324、図14の1402、1404、1426、および1428、図15の1502、1504、1534、および1536、図16の1602、1606、1608、1626、1628

10

20

30

40

50

、および1632、図17の1702、1704、1706、1744、1746、および1748、図18の1802、1804、1806、1852、1854、および1856、図19の1902、1906、1910、1924、1928、および1932、図20の2002、2004、2006、2044、2046、および2048、図21の2102、2104、2106、2152、2154、および2156)のうちの1つ以上のN末端Aspは、Glnに変異し得る。

【0287】

本明細書の実施例に記載の例示的なFc抗原結合ドメイン構築体について、Fc抗原結合ドメイン構築体1~21は、それぞれ、ノブおよびホールサブユニットにE357KとK370Dの電荷対を含み得る。

10

【0288】

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1~21)のうちのいずれか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、単一FcドメインおよびCTLA4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強化することができるか、または単一FcドメインおよびCTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含み得る。

【0289】

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ビヒクルを指す。核酸は、この技術分野で既知の従来の技術(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、直接の微量注入など)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、CRL7030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ッシングする、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ッ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ッシングを確実にすることが可能である。

20

30

【0290】

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、ポリアダニル化部位および選択可能な標識を含む、この技術分野で既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、この技術分野で既知である。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 Voinov 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。

40

【0291】

50

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では存在し得る。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、およびベクター1, 4-マンノシル-糖タンパク質4-ベクター-N-アセチルグルコサミン転移酵素（GnT-I）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。

10

20

【0292】

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既知の任意の方法、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カラムなどのアフィニティークラムを、適切に選択し、クロマトグラフィーカラム、濾過、限外濾過、塩析および透析手順と組み合わせることによって、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）。

30

【0293】

いくつかの事例では、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など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（配列番号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クラムと結合する。いくつかの実施形態では、FLAGペプチドは、配列DYKDDDDK（配列番号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（配列番号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、

40

50

整数倍にした配列 E Q K L I S E E D L、例えば $3 \times$ E Q K L I S E E D L を含む。いくつかの実施形態では、H A ペプチドは、配列 Y P Y D V P D Y A（配列番号 41）を含む。いくつかの実施形態では、H A ペプチドは、直列にした、整数倍にした配列 Y P Y D V P D Y A、例えば $3 \times$ Y P Y D V P D Y A を含む。F L A G、m y c または H A 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、F L A G、m y c または H A ペプチドを含む F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することができる。

【0294】

F c 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、F c 領域を介して F c 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、F c 抗原結合ドメイン構築体は、実施例 2 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使用して精製され得る。

【0295】

X I I . 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 F c 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 F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な群を含む。様々な例において、薬学的組成物は、F c 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。

【0296】

例えば本明細書に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体（例えば、3 つの F c ドメインを有する F c 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、当業者に既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、水または他の薬剂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（W F I）、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、賦形剤などの薬剂的に許容されるビヒクルまたは溶媒と F c 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。薬学的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。

【0297】

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、塩化ナトリウムなどの他の添加とを含有する生理食塩水または等張液を、任意選択的に、好適な可溶化剤、例えばこの技術分野で通常知られる、エタノールなど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などのポリアルコール、およびポリソルベート 80（商標）、H C O-50 など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、この技術分野で既知であり、例えば、B a n g a (e d .) T h e r a p e u t i c P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : F o r m u l a t i o n , P r o c e s s i n g a n d D e l i v e r y S y s t e m s (2 d e d .) T a y l o r & F r a n c i s G r o u p , C R C P r e s s (2 0 0 6) を参照されたい。

【0298】

X I I I . 使用法および投薬量

本明細書に記載される構築体は、C T L A 4 を標的とし、C T L A 4 に標的化された抗

10

20

30

40

50

体により治療される障害を治療するために使用され得る。構築体は、例えば、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、頭頸部癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、中皮腫、尿路上皮癌、尿路上皮癌、膠芽腫、卵巣癌、前立腺癌、高グレードの中枢神経系悪性腫瘍、肝臓癌、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を治療するのに有用であり得る。

【0299】

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、薬剤放出カプセルなど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、 $1 \sim 200 \text{ mg/kg}$ 、例えば $1 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 、例えば $20 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 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、用量を逃えて、決定し (t i t e r)、投与経路を調整することが必要となる。

10

【0300】

ヒトの治療に加えて、構築体は、イヌおよびネコなどのコンパニオンアニマル、ならびに他の獣医学的対象を治療するために使用され得る。

【0301】

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強化し、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。

20

【0302】

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、膜侵襲複合体を形成させる。

30

【0303】

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

【0304】

CDCは、細胞 (例えば、Raji細胞 (ATCC) またはHEK-CtLA-4) 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することによって評価され得る。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°C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°C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。

40

【0305】

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) 活性を強化することもできる。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

50

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。

【0306】

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、 5×10^5 / 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（例えば、Raji標的細胞（ATCC CCL-86）またはHEK-CTLA-4）を回収し、アッセイ培地（フェノールレッドフリーのRPMI、10% FBS Δ 、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、抗体でコーティングされた細胞、例えば、抗CD20でコーティングされたRaji細胞または抗CTLA4でコーティングされたHEK-CTLA-4細胞を含む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（ 5×10^4 NK細胞： 1×10^4 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。

10

【0307】

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細胞またはHEK-CTLA-4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（またはHEK-CTLA4）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。

20

【0308】

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）活性を強化することもできる。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- κ B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。

30

40

【0309】

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、Fc γ RIIa（CD32a）、Fc γ RI（CD64）、およびFc γ RIIIa（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ー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、Fc γ RIIaがこのプロセスに関与する主要Fc γ 受容体であることが示唆されている。

【0310】

50

FcγRIIa-H ADC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）を含む低アフィニティーヒトFcγRIIa-Hバリエーション、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。

【0311】

標的細胞および関連抗体と共培養したとき、抗体のFcドメインは、FcγRIIa-Hエフェクター細胞と結合し、FcγRIIaシグナル伝達およびNFAT-RE-媒介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】

【0312】

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。

【0313】

実施例1. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体7の設計および精製

タンパク質発現

Fc抗原結合ドメイン構築体は、フォールディング効率を増加させ、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会合を最小限に抑え、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）薬学的用組成物を生成するように設計される。これら目標を念頭に、分岐点がN末端Fcドメインにある単独で分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製した。Fc抗原結合ドメイン構築体7（CTLA-4）は、各々、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド（抗CTLA-4長鎖Fc（配列番号ZZ1）の2つのコピーおよび短鎖Fc（配列番号ZZ2）の2つのコピー）と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド（配列番号ZZ3）の2つのコピーとを含む。長鎖Fcは、E357K電荷変異ならびにS354CおよびT366W突起形成変異（ヘテロ二量体化を促進する）を有するFcドメイン単量体を、電荷変異（K409D/D399K変異）Fcドメイン単量体（ホモ二量体化を促進する）と、抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン（EUの1~220位）とともに直列で連続してN末端で含む（構築体7（CTLA-4））。短鎖Fcは、K370D電荷変異、ならびにY349C、T366S、L368A、およびY407V空洞形成変異（ヘテロ二量体形成を促進するため）を含有する。抗CTLA-4軽鎖はまた、scFvの一部として長鎖FcのN末端に融合されて発現される得る。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ボソームを介して、ヒト胎生腎（HEK）293細胞にトランスフェクトされた。表5のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド（1つのプラスミドは軽鎖（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fc（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは短鎖Fcをコードする）によりコードされた。

【0314】

（表5）構築体7（CTLA-4）配列

10

20

30

40

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)	短鎖Fc
構築体7 (CTLA-4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKSC DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLSKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKHTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	配列番号 DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKN QVSLCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQK SLSLSPG

10

20

30

【0315】

発現されたタンパク質を、Poros Mab Capture A (Life Technologies 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。捕捉されたFc抗原結合ドメイン構築体を、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し(低塩洗浄)、100mMのグリシン(pH3)で溶出した。溶出液を1M TRIS(pH7.4)の添加によって素早く中和し、0.2μm

40

フィルターに通して滅菌濾過した。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。カラムを50mMのMES(pH6)(緩衝液A)で予め平衡化し、試料を、50mMのMES、400mMの塩化ナトリウム(pH6)(緩衝液B)を溶出緩衝液として使用した段階勾配で溶出した。イオン交換後、標的画分を、接線流濾過システム上で10kDa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PBS緩衝液に緩衝液交換した。試料をおよそ30mg/mLに濃縮し、0.2μm

40

【0316】

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)

50

試料を、L a e m m l i 試料緩衝液（４％ＳＤＳ、Ｂｉ o - R a d）中で、９５℃で１０分間変性させた。試料を、C r i t e r i o n T G X s t a i n - f r e e ゲル（４～１５％ポリアクリルアミド、Ｂｉ o - R a d）上で泳動させた。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。C h e m i D o c M P イメージングシステム（Ｂｉ o - R a d 社）でゲルを画像化した。I m a g e l a b ４．０．１ソフトウェア（Ｂｉ o - R a d 社）を用いて、バンドの定量化を行った。

【０３１７】

実施例２．ＣＴＬＡ－４結合ドメインを含むＦｃ抗原結合ドメイン構築体１３の設計および精製

タンパク質発現

分岐点がＣ末端Ｆｃドメインにある単独で分岐したＦｃドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製した。Ｆｃ抗原結合ドメイン構築体１３（ＣＴＬＡ－４）は、各々、２つの別個のＦｃドメイン単量体含有ポリペプチド（抗ＣＴＬＡ－４長鎖Ｆｃの２つのコピー（配列番号ＺＺのいずれか１つ、および短鎖Ｆｃ（配列番号ＺＺ）の２つのコピー）と、抗ＣＴＬＡ－４軽鎖ポリペプチド（配列番号ＺＺ）の２つのコピーとを含む。長鎖Ｆｃは、電荷変異（Ｋ４０９Ｄ／Ｄ３９９Ｋ変異）Ｆｃドメイン単量体（ホモ二量体化を促進する）を、Ｅ３５７Ｋ電荷変異ならびにＳ３５４ＣおよびＴ３６６Ｗ突起形成変異（ヘテロ二量体化を促進する）を有するＦｃドメイン単量体とともに、直列に連続して含み、Ｎ末端で抗ＣＴＬＡ－４ ＶＨおよびＣＨ１ドメイン（ＥＵの１～２２０位）（構築体１３（ＣＴＬＡ－４））を含む。短鎖Ｆｃは、Ｋ３７０Ｄ電荷変異、ならびにＹ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ空洞形成変異（ヘテロ二量体形成を促進するため）を含有する。抗ＣＴＬＡ－４軽鎖ならびに抗ＣＴＬＡ－４ ＶＨおよびＣＨ１は、抗ＣＴＬＡ４ ｍＡｂから取られる。ＣＴＬＡ－４軽鎖はまた、ｓｃＦｖの一部として長鎖ＦｃのＮ末端に融合されて発現され得る。他の型の構築体１３は、抗ＣＴＬＡ－４重鎖とともに作製され得、各型は、長鎖Ｆｃポリペプチド中のＦｃドメイン単量体間に異なる大きさのグリシンスペーサー（Ｇ４、Ｇ１０、Ｇ１５、またはＧ２０リンカー）を保有する。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ボソームを介して、ヒト胎生腎（ＨＥＫ）２９３細胞にトランスフェクトされた。以下の構築体の各々のアミノ酸配列は、３つの別個のプラスミド（１つのプラスミドは軽鎖（抗ＣＴＬＡ－４）をコードし、１つのプラスミドは長鎖Ｆｃ（抗ＣＴＬＡ－４）をコードし、１つのプラスミドは短鎖Ｆｃをコードする）によりコードされた。

【０３１８】

（表６）構築体１３（ＣＴＬＡ－４）配列

10

20

30

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体 13 (CTLA-4), G ₂₀ リンカー	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGGGGGGGGGGG	配列番号 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

10

20

		GGGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSDLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
構築体13 (CTLA-4), G ₂₀ リンカー CC変異	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYTMH WVRQAPGKGLEWVTFISY DGNNKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGDK THTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPPEEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLKSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	配列番号 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPPE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

10

20

30

40

【0319】

実施例3. Fc抗原結合ドメイン構築体1の設計および精製

50

非対称直列Fcドメイン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1（図1）は、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcおよび短鎖Fcの2つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、直列に連続して2つのFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含み、各Fcドメイン単量体は、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）（ヘテロ二量体化を促進する）を導入することによって作製される改変された突起を有する。CTLA-4結合ドメインは、長鎖Fcと同じアミノ酸配列の一部として発現されてもよい（例えば、scFvを形成するため）。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K370D）（ヘテロ二量体化を促進する）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体を含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。本実施例では、かつFc抗原結合ドメイン構築体2～42についての以下の実施例の各々では、細胞は、抗体可変軽鎖を発現する第3のプラスミドを含有し得る。

【0320】

発現されたタンパク質を、Poros MabCapture A（Life Technologies社）カラムを使用したプロテインA系のアフィニティーク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。捕捉されたFc抗原結合ドメイン構築体を、リン酸緩衝食塩水で洗浄し（低塩洗浄）、100mMのグリシン、pH3で溶離させる。溶出液を1M TRIS（pH7.4）の添加によって素早く中和し、0.2μmフィルターに通して滅菌濾過する。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。カラムを50mMのMES（pH6）（緩衝液A）で予め平衡化し、試料を、50mMのMES、400mMの塩化ナトリウム（pH6）（緩衝液B）を溶出緩衝液として使用した段階勾配で溶出する。イオン交換後、標的画分を、接線流濾過システム上で10kDa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PBS緩衝液に緩衝液交換する。試料をおよそ30mg/mLに濃縮し、0.2μmフィルターに通して滅菌濾過する。

【0321】

試料を、Laemmli試料緩衝液（4%SDS、Bio-Rad）中で、95℃で10分間変性させた。試料を、Criterion TGX stain-freeゲル（4～15%ポリアクリルアミド、Bio-Rad）上で泳動させる。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。

【0322】

実施例4. Fc抗原結合ドメイン構築体2の設計および精製

非対称直列Fcドメイン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2（図2）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcおよび短鎖Fcの3つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、N末端でCTLA-4結合ドメインと直列に連続して3つのFcドメイン単量体を含み、各Fcドメイン単量体は、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空

洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、および任意選択的に表 4 A または 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有する F c ドメイン単量体を含む。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0323】

実施例 5. F c 抗原結合ドメイン構築体 3 の設計および精製

非対称直列 F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 3（図 3）は、2 つの別個の F c 単量体含有ポリペプチド（長鎖 F c および短鎖 F c の 2 つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 F c は、直列に連続して 2 つの F c ドメイン単量体を含み、各 F c ドメイン単量体は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異）、および任意選択的に表 4 A または 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖 F c は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、および任意選択的に表 4 A または 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有する F c ドメイン単量体と、N 末端で C T L A-4 結合ドメインとを含む。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0324】

実施例 6. F c 抗原結合ドメイン構築体 4 の設計および精製

非対称直列 F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 4（図 4）は、2 つの別個の F c 単量体含有ポリペプチド（長鎖 F c および短鎖 F c の 3 つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 F c は、直列に連続して 3 つの F c ドメイン単量体を含み、各 F c ドメイン単量体は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異）、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖 F c は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有する F c ドメイン単量体と、N 末端で C T L A-4 結合ドメインとを含む。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0325】

実施例 7. F c 抗原結合ドメイン構築体 5 の設計および精製

非対称直列 F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 5（図 5）は、2 つの別個の F c 単量体含有ポリペプチド（長鎖 F c および短鎖 F c の 2 つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 F c は、N 末端で C T L A-4 結合ドメインと直列に連続して 2 つの F c ドメイン単量体を含

み、各Fcドメイン単量体は、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される変改された突起を有する。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される変改された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

10

【0326】

実施例8．Fc抗原結合ドメイン構築体6の設計および精製

非対称直列Fcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体6（図6）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcおよび短鎖Fcの3つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、N末端でCTLA-4結合ドメインと直列に連続して3つのFcドメイン単量体を含み、各Fcドメイン単量体は、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される変改された突起を有する。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される変改された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

20

30

【0327】

実施例9．Fc抗原結合ドメイン構築体7の設計および精製

分岐点があるN末端Fcドメインにある単独で分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製した。Fc抗原結合ドメイン構築体7（図7）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの2つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表4Aおよび4Bから選択される逆電荷変異（K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される変改された突起を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される変改された空洞を有するFcドメイン単量体を含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

40

【0328】

50

実施例 10. Fc 抗原結合ドメイン構築体 8 の設計および精製

分岐点が N 末端 Fc ドメインにある、単独分岐した Fc ドメインから形成された構築体は、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 8 (図 8) は、2 つの別個の Fc 単量体含有ポリペプチド (長鎖 Fc の 2 つのコピーおよび短鎖 Fc の 2 つのコピー) および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 Fc は、表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異 (K 4 0 9 D / D 3 9 9 K 変異) を有する Fc ドメイン単量体と直列に連続して、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異 (例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異)、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異 (例えば、E 3 5 7 K) を導入することによって作製される改変された突起を有する Fc ドメイン単量体を含む。短鎖 Fc は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異 (例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異)、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異 (例えば、K 3 7 0 D) を導入することによって作製される改変された空洞を有する Fc ドメイン単量体と、N 末端で C T L A - 4 結合ドメインとを含む。DNA 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 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 (H E K) 2 9 3 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、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

10

【0329】

実施例 11. Fc 抗原結合ドメイン構築体 9 の設計および精製

分岐点が N 末端 Fc ドメインにある、単独分岐した Fc ドメインから形成された構築体は、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 9 (図 9) は、2 つの別個の Fc 単量体含有ポリペプチド (長鎖 Fc の 2 つのコピーおよび短鎖 Fc の 2 つのコピー) および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 Fc は、表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異 (K 4 0 9 D / D 3 9 9 K 変異) を有する Fc ドメイン単量体と直列に連続して、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異 (例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異)、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異 (例えば、E 3 5 7 K) を導入することによって作製される改変された突起を有する Fc ドメイン単量体と、N 末端で C T L A - 4 結合ドメインとを含む。短鎖 Fc は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異 (例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異)、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異 (例えば、K 3 7 0 D) を導入することによって作製される改変された空洞を有する Fc ドメイン単量体と、N 末端で C T L A - 4 結合ドメインとを含む。DNA 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 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 (H E K) 2 9 3 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、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

20

30

【0330】

実施例 12. Fc 抗原結合ドメイン構築体 10 の設計および精製

分岐点が N 末端 Fc ドメインにある、単独分岐した Fc ドメインから形成された構築体は、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 10 (図 10) は、2 つの別個の Fc 単量体含有ポリペプチド (長鎖 Fc の 2 つのコピーおよび短鎖 Fc の 4 つのコピー) および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 Fc は、直列に連続して 2 つの Fc ドメイン単量体および N 末端で C T L A - 4 結合ドメインを含み、各 Fc ドメイン単量体は、表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異 (K 4 0 9 D / D 3 9 9 K 変異) を有する Fc ドメイン単量体と直列に連続して、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異 (例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異)、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異 (例えば、E 3 5 7 K) を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖 Fc は、表 3 から選択される少なくとも 1

40

50

つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有する F c ドメイン単量体を含む。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0331】

実施例 1 3. F c 抗原結合ドメイン構築体 1 1 の設計および精製

分岐点が N 末端 F c ドメインにある、単独分岐した F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 1 1（図 1 1）は、2 つの別個の F c 単量体含有ポリペプチド（長鎖 F c の 2 つのコピーおよび短鎖 F c の 4 つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 F c は、直列に連続して 2 つの F c ドメイン単量体を含み、各 F c ドメイン単量体は、N 末端で、表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異（K 4 0 9 D / D 3 9 9 K 変異）を有する F C ドメイン単量体と直列に連続して、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異）、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖 F c は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、ならびに任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することにより作製される改変空洞を有する F c ドメイン単量体と、抗原結合ドメインとを N 末端で含有する。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0332】

実施例 1 4. F c 抗原結合ドメイン構築体 1 2 の設計および精製

分岐点が N 末端 F c ドメインにある、単独分岐した F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 1 2（図 1 2）は、2 つの別個の F c 単量体含有ポリペプチド（長鎖 F c の 2 つのコピーおよび短鎖 F c の 4 つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖 F c は、直列に連続して 2 つの F c ドメイン単量体および N 末端で C T L A - 4 結合ドメインを含み、各 F c ドメイン単量体は、表 4 A および 4 B から選択される逆電荷変異（K 4 0 9 D / D 3 9 9 K 変異）を有する F C ドメイン単量体と直列に連続して、表 3 から選択される少なくとも 1 つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 変異）、および任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する。短鎖 F c は、表 3 から選択される少なくとも 1 つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異）、ならびに任意選択的に表 4 A および 4 B から選択される 1 つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することにより作製される改変空洞を有する F c ドメイン単量体と、抗原結合ドメインとを N 末端で含有する。D N A 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4 哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N A プラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3 細胞にトランスフェクトされる。短鎖 F c および長鎖 F c のアミノ酸配列は、2 つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例 3 にあるように精製される。

【0333】

実施例 1 5. F c 抗原結合ドメイン構築体 1 3 の設計および精製

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体13（図13）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの2つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体を含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

10

【0334】

実施例16．Fc抗原結合ドメイン構築体14の設計および精製

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体14（図14）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの2つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、N末端で、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体を含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

20

30

【0335】

実施例17．Fc抗原結合ドメイン構築体15の設計および精製

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体15（図15）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの2つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択

40

50

される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するF cドメイン単量体と、N末端でC T L A－4結合ドメインとを含む。D N A配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N Aプラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3細胞にトランスフェクトされる。短鎖F cおよび長鎖F cのアミノ酸配列は、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

【0336】

実施例18. F c抗原結合ドメイン構築体16の設計および精製

分岐点がC末端F cドメインにある、単独分岐したF cドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c抗原結合ドメイン構築体16（図16）は、2つの別個のF c単量体含有ポリペプチド（長鎖F cの2つのコピーおよび短鎖F cの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖F cは、各々が表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 CおよびT 3 6 6 W変異）、および任意選択的に表4 Aまたは4 Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する、2つのF cドメイン単量体と直列に連続して、表4 Aまたは4 Bから選択される逆電荷変異（K 4 0 9 D / D 3 9 9 K変異）を有するF Cドメイン単量体と、N末端でC T L A－4結合ドメインとを含む。短鎖F cは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、およびY 4 0 7 V変異）、および任意選択的に表4 Aまたは4 Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するF cドメイン単量体を含む。D N A配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N Aプラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3細胞にトランスフェクトされる。短鎖F cおよび長鎖F cのアミノ酸配列は、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

【0337】

実施例19. F c抗原結合ドメイン構築体17の設計および精製

分岐点がC末端F cドメインにある、単独分岐したF cドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c抗原結合ドメイン構築体17（図17）は、2つの別個のF c単量体含有ポリペプチド（長鎖F cの2つのコピーおよび短鎖F cの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖F cは、N末端で、各々が表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S 3 5 4 CおよびT 3 6 6 W変異）、および任意選択的に表4 Aまたは4 Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E 3 5 7 K）を導入することによって作製される改変された突起を有する、2つのF cドメイン単量体と直列に連続して、表4 Aまたは4 Bから選択される逆電荷変異（K 4 0 9 D / D 3 9 9 K変異）を有するF Cドメイン単量体を含む。短鎖F cは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、およびY 4 0 7 V変異）、および任意選択的に表4 Aまたは4 Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K 3 7 0 D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するF cドメイン単量体と、N末端でC T L A－4結合ドメインとを含む。D N A配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3. 4哺乳動物発現ベクター内にクローニングされた。D N Aプラスミド構築体はリボソームを介して、ヒト胎生腎（H E K）2 9 3細胞にトランスフェクトされる。短鎖F cおよび長鎖F cのアミノ酸配列は、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

【0338】

実施例20. F c抗原結合ドメイン構築体18の設計および精製

分岐点がC末端F cドメインにある、単独分岐したF cドメインから形成された構築体

を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体18（図18）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、各々が表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有する、2つのFcドメイン単量体と直列に連続して、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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ボソームを介して、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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

10

【0339】

実施例21．Fc抗原結合ドメイン構築体19の設計および精製

分岐点がN末端またはC末端Fcドメインのいずれにもない、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体19（図19）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体、ならびに表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有する別のFcドメイン単量体とともに直列に連続して、少なくとも1つの表3から選択される突起形成変異（例えばS354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、ならびに任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することにより作製される改変空洞を有するFcドメイン単量体を含有する。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ボソームを介して、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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

20

30

40

【0340】

実施例22．Fc抗原結合ドメイン構築体20の設計および精製

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体20（図20）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K409D／D399K変異）を有するFcドメイン単量体、ならびに表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を

50

有する別のFcドメイン単量体とともに直列に連続して、少なくとも1つの表3から選択される突起形成変異（例えばS354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体をN末端で含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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ボソームを介して、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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

10

【0341】

実施例23. Fc抗原結合ドメイン構築体21の設計および精製

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体21（図21）は、2つの別個のFc単量体含有ポリペプチド（長鎖Fcの2つのコピーおよび短鎖Fcの4つのコピー）および軽鎖ポリペプチドを含有する。長鎖Fcは、表4Aまたは4Bから選択される逆電荷変異（例えば、K409D/D399K変異）を有するFcドメイン単量体、表3から選択される少なくとも1つの突起形成変異（例えば、S354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aおよび4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有する別のFcドメイン単量体とともに直列に連続して、少なくとも1つの表3から選択される突起形成変異（例えばS354CおよびT366W変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、E357K）を導入することによって作製される改変された突起を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。短鎖Fcは、表3から選択される少なくとも1つの空洞形成変異（例えば、Y349C、T366S、L368A、およびY407V変異）、および任意選択的に表4Aまたは4Bから選択される1つ以上の逆電荷変異（例えば、K370D）を導入することによって作製される改変された空洞を有するFcドメイン単量体と、N末端でCTLA-4結合ドメインとを含む。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ボソームを介して、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、2つの別個のプラスミドによってコードされる。発現されたタンパク質は、実施例3にあるように精製される。

20

30

【0342】

実施例24. Fc抗原結合ドメイン構築体によるCDC、ADCP、およびADCCの活性化

親mAbおよび様々なFc抗原結合ドメイン構築体によるCDC、ADCP、およびADCC経路の活性化を試験するために3つのアッセイを使用した。抗CD20モノクローナル抗体であるGazyva（オビヌツズマブ）由来のCDRを含有する4つの構築体を作製した。フコシル化mAbおよび脱フコシル化mAbの両方を作製し、S3Y（実施例2に記載の構築体13の構造、図13）およびSAI（実施例1に記載の構築体7の構造、図7）Fc抗原結合ドメイン構築体も作製した。CDCアッセイを以下のとおり行った。

40

1. 抗CD20 CDCアッセイで使用される標的細胞は、Rajiリンパ芽球様ヒトB細胞株（ATCC CCL-86）である。Raji細胞を遠心分離により懸濁培養液から除去し、 6×10^5 細胞/mLでX-VIVO 15培地中に再懸濁した。

2. Raji細胞を、1ウェル当たり100 μ L（ 6×10^4 細胞/ウェル）の体積で9

50

6 ウェル平底アッセイプレートに移した。

3. 抗CD20モノクローナル抗体 (mAb) およびFc構築体の各々を、X-VIVO 15培地中で $3.33\mu\text{M}$ に希釈した。次いで、 1.5mL ポリプロピレンチューブ中で、抗CD20 mAbおよびFc構築体の各々を用いて、連続1:3希釈を行い、11点の希釈シリーズを得た。

4. 抗CD20 mAbおよびFc構築体の各希釈を、アッセイプレート中の適切なウェルに、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで移した。

5. 抗CD20 mAbおよびFc構築体を移した後ただちに、 $50\mu\text{L}$ の正常なヒト血清補体をアッセイプレート中の各ウェルに移した。

6. アッセイプレートを 37°C および $5\%\text{CO}_2$ で2時間インキュベートした。

7. 2時間インキュベーションした後、 $20\mu\text{L}$ のWST-1増殖試薬をアッセイプレートの各ウェルに添加した。

8. プレートを 37°C および $5\%\text{CO}_2$ のインキュベーターに14時間戻した。

9. 14時間のインキュベーション後、プレートを、プレート振盪器上で1分間振盪し、分光光度計を使用して、 600nm の補正を用いて、 450nm で直ちにウェルの吸光度を決定した。

標的細胞がRaji (図22、左のパネル) であるCDCアッセイにおいて、S3Y (構築体13 (CD20)) 構築体は、細胞傷害を介在することができたが、他の構築体は介在しなかった。

【0343】

ADCPアッセイを以下のとおり行った。

FcγRIIa-H ADCPレポーターバイオアッセイコンプリートキット (Promegaカタログ番号G9901) は、FcγRIIaに特異的に結合して活性化するFcドメインを有する抗体および他の生物学的物質の効力および安定性を測定するために使用され得る細胞ベースの生物発光アッセイである。このアッセイは、アミノ酸131位にヒスチジン (H) を含有する高親和性ヒトFcγRIIa-HバリエーションおよびNFAT-応答要素 (NFAT-RE) によって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。標的細胞および関連抗体と共培養されると、FcγRIIa-Hエフェクター細胞はその抗体のFcドメインに結合し、FcγRIIaのシグナル伝達およびNFAT-RE媒介性ルシフェラーゼ活性がもたらされる。生体発光シグナル信号を検出し、Bio-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイシステムおよび標準蛍光度計を使用して定量した。抗CD20 AbおよびFc構築体 (構築体7 (CD20) または構築体13 (CD20)) の濃度を上げてRaji (CD20+) 標的細胞およびFcと共にインキュベートした。抗CD20 AbおよびFc構築体の濃度を上げて、図47の真ん中のパネルで指定される濃度で、Raji (CD20+) 標的細胞およびFcγRIIa-Hエフェクター細胞とともにインキュベートした (2:1 E:T比。およそ35,000個のエフェクター細胞:15,000個の標的細胞)。 37°C で6時間インキュベーションを継続した。Bio-Glo (商標)。試薬を添加し、発光をPHERAstar FS計器で測定した。データは、図22の中央のパネルにおいて指定された濃度のRIIa-Hエフェクター細胞 (2:1 E:T比、およそ35,000個のエフェクター細胞:15,000個の標的細胞)、GraphPad Prismソフトウェアを使用して4PL曲線に適合させた。 37°C で6時間インキュベーションを継続した。Bio-Glo (商標) 試薬を添加し、発光をPHERAstar FS計器で測定した。GraphPad Prismソフトウェアを使用して、データを4PL曲線に適合させた (図22、中央のパネル)。SAI構築体 (構築体7 (CD20)) およびS3Y構築体 (構築体13 (CD20)) の両方が、mAbと比較して100倍超増強された効力を示した。

【0344】

ADCCアッセイを以下のとおり行った。

ヒト初代NKエフェクター細胞 (Hemacare) を解凍し、 $5 \times 10^5/\text{mL}$ でリン

パル増殖培地-3 (Lonza) 中 37℃で一晩静止させた。翌日、ヒトリンパ芽球様細胞株 Raji 標的細胞 (ATCC CCL-86) を収集し、アッセイ培地 (フェノールレッドフリーの RPMI、10% FBS Δ、GlutaMAX (商標)) 中に再懸濁し、様々な濃度の目的とする各プローブの存在下で、37℃で30分間プレATINGした。その後、静止させたNK細胞を収集し、アッセイ培地中に再懸濁し、抗CD20コーティング Raji 細胞を含有するプレートに添加した。プレートを、最終比率 5:1 のエフェクター細胞:標的細胞 (5×10^4 NK細胞: 1×10^4 Raji 細胞) で、37℃で6時間インキュベートした。

【0345】

CytoTox-Glo (商標) 細胞傷害性アッセイキット (Promega) を使用して、ADCC活性を決定した。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添加し、オービタルプレート振盪機上に室温で15分間置いた。発光を、PHERAstar F5プレートリーダー (BMGLabtech) を使用して測定した。データを、対照条件 (NK細胞+Rajiのみ) からの読み取り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した。(図22、右のパネル)。SAI構築体 (構築体7 (CD20)) およびS3Y構築体 (構築体13 (CD20)) の両方が、フコシル化mAbと比較して増強された細胞傷害性を示し、脱フコシル化mAbと同様の細胞傷害性を示した。

10

20

【0346】

実施例25. 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

タンパク質を、6Mのグアニジン (Sigma) 中で $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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 (carbamidomethylation)) 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-Exact (ThermoFisher 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。 $\pm 1.5\text{Da}$ の四重極分離幅 (isolation width) を有する二重荷電イオン ($z=2$) m/z 842.5に基づいて、単独でキシロシル化されたリンカーペプチドを標的とした。

30

40

【0347】

インタクト質量分析

タンパク質を、78.98%水、20%アセトニトリル、1%ギ酸 (FA)、および0.02%トリフルオロ酢酸からなる泳動緩衝液 (running buffer) 中で $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度に希釈した。サイズ排除クロマトグラフィー分離を、直列に2.1×350mm、合計カラム長700mmの2つのZenix-C SEC-300 (Sepax Technologies, Newark, DE) 上で行った。タンパク質を、80 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流量で上述の泳動緩衝液を使用してSECカラムから溶出した。質量スペクトルを、ポジティブモードで動作させたQSTAR Elite (Applied Biosystems) Q-ToF質量分光計で取得した。個々のサイズ画分下の中性質量を、

50

クロマトグラフィーピークの全幅にわたるスペクトルを合計することによって、ベイズピークデコンボリューション (Bayesian peak deconvolution) を使用してデコンボリュートした。

【0348】

キャピラリー電気泳動ー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。

10

【0349】

非還元 SDS-PAGE

試料を、Laemmli 試料緩衝液 (4% SDS、Bio-Rad) 中で、95℃で10分間変性させた。試料を、Criterion TGX stain-freeゲル (4~15%ポリアクリルアミド、Bio-Rad) 上で泳動させた。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。

20

【0350】

実施例 26. CTLA-4 結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体4の設計および精製

タンパク質発現

非対称直列Fcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体4 (CTLA-4) はそれぞれ、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド (長鎖Fc (配列番号66)、および抗CTLA-4 Fc鎖 (配列番号68) の3つのコピー) と、抗CTLA-4 軽鎖ポリペプチド (配列番号49) の3つのコピーとを含む。長鎖Fcは、直列に連続して3つのFcドメイン単量体を含有し、各Fcドメイン単量体は、E357K電荷変異と、S354CおよびT366W突起形成変異 (ヘテロ二量体形成を促進するため) とを有する。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ドメイン単量体と、N末端で抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン (EUの1~220位) (構築体4 (CTLA-4)) とを含む。CTLA-4 軽鎖はまた、scFvの一部として短鎖FcのN末端に融合されて発現され得る。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ボソームを介して、ヒト胎生腎 (HEK) 293細胞にトランスフェクトされる。表7の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド (1つのプラスミドは軽鎖 (抗CTLA-4) をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fcをコードし、1つのプラスミドは短鎖Fc (抗CTLA-4) をコードする) によりコードされる。

30

40

【0351】

(表7) 構築体4 (CTLA4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc	短鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1を含む)
構築体4 (CTLA4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号66 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSP G	配列番号68 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLR AEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPG

10

20

30

40

【0352】

発現したタンパク質を、Poros MabCapture A (Life Technologies 社) カラムを使用してプロテイン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。捕捉されたFc抗原結合ドメイン構築体を、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し(低塩洗浄)、100mMのグリシン(pH3)で溶出する。溶出液を1M TRIS(pH7.4)の添加によって素早く中和し、0.2μmフィルターに通して滅菌濾過する。Poros XS樹脂(Applied Bios

50

c i e n c e s 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。カラムを 50 mM の M E S (p H 6) (緩衝液 A) で予め平衡化し、試料を、50 mM の M E S 、 400 mM の塩化ナトリウム (p H 6) (緩衝液 B) を溶出緩衝液として使用した段階勾配で溶出する。イオン交換後、標的画分を、接線流濾過システム上で 10 k D a カットオフポリエーテルスルホン (P E S) 膜カートリッジを使用して P B S 緩衝液に緩衝液交換する。試料をおよそ 30 m g / m L に濃縮し、0.2 μ m フィルターに通して滅菌濾過する。

【0353】

実施例 27. C T L A - 4 結合ドメインを含む F c 抗原結合ドメイン構築体 8 の設計および精製

タンパク質発現

分岐点が N 末端 F c ドメインにある、単独分岐した F c ドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。F c 抗原結合ドメイン構築体 8 (C T L A - 4) はそれぞれ、2つの別個の F c ドメイン単量体含有ポリペプチド (長鎖 F c (配列番号 69) の 2 つのコピー、および抗 C T L A - 4 短鎖 F c (配列番号 68) の 2 つのコピー) と、抗 C T L A - 4 軽鎖ポリペプチド (配列番号 49) のコピーとを含む。長鎖 F c は、逆電荷変異 K 409 D および D 399 K (ホモ二量体形成を促進するため) を有する F c ドメイン単量体に直列に連続して、E 357 K 電荷変異と、S 354 C および T 366 W 突起形成変異 (ヘテロ二量体形成を促進するため) とを有する F c ドメイン単量体を含有する。短鎖 F c は、K 370 D 電荷変異ならびに Y 349 C 、 T 366 S 、 L 368 A 、 および Y 407 V の空洞形成変異 (ヘテロ二量体化を促進する) を有する F c ドメイン単量体と、N 末端で抗 C T L A - 4 V H および C H 1 ドメイン (E U の 1 ~ 220 位) (構築体 8 (C T L A - 4)) とを含む。C T L A - 4 軽鎖はまた、s c F v の一部として短鎖 F c の N 末端に融合されて発現され得る。DNA 配列は、哺乳動物細胞での発現に最適化され、p c D N A 3.4 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ボソームを介して、ヒト胎生腎 (H E K) 293 細胞にトランスフェクトされる。表 8 の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド (1 つのプラスミドは軽鎖 (抗 C T L A - 4) をコードし、1 つのプラスミドは長鎖 F c をコードし、1 つのプラスミドは短鎖 F c (抗 C T L A - 4) をコードする) によりコードされる。

【0354】

(表 8) 構築体 8 (C T L A 4) 配列

10

20

30

構築体	軽鎖	長鎖Fc	短鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1を含む)
構築体8 (CTLA4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号69 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGSGFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV MEALHNHYTQKSLSLSPG	配列番号68 QVQLVESGGGVVQPGRSRLR LSCAASGFTFSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGSG FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPG

10

20

【0355】

発現されたタンパク質を、Poros MabCapture A (Life Technologies 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。捕捉されたFc抗原結合ドメイン構築体を、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し(低塩洗浄)、100mMのグリシン(pH3)で溶出する。溶出液を1M TRIS (pH7.4)の添加によって素早く中和し、0.2μm フィルターに通して滅菌濾過する。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。カラムを50mMのMES (pH6) (緩衝液A)で予め平衡化し、試料を、50mMのMES、400mMの塩化ナトリウム(pH6) (緩衝液B)を溶出緩衝液として使用した段階勾配で溶出する。イオン交換後、標的画分を、接線流濾過システム上で10kDa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PBS緩衝液に緩衝液交換する。試料をおよそ30mg/mLに濃縮し、0.2μm フィルターに通して滅菌濾過する。

30

40

【0356】

実施例28. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体9の設計および精製

タンパク質発現

分岐点がN末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体9(CTLA-4)は、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド(抗CTLA-4長鎖Fc(配列番号54)の2つのコピー、および抗CTLA-4短鎖Fc(配列番号68)の2つのコピー)と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド(配列番号49)のコピーとを含む。長鎖Fcは、逆電荷変異K409DおよびD399K(ホモ二量体化を促進する)を有するFc

50

ドメイン単量体と直列に連続して、E 3 5 7 K電荷変異ならびにS 3 5 4 CおよびT 3 6 6 W突起形成変異（ヘテロ二量体化を促進する）を有するFcドメイン単量体と、N末端で抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン（EUの1～220位）（構築体9（CTLA-4））とを含む。短鎖Fcは、K 3 7 0 D電荷変異ならびにY 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、およびY 4 0 7 Vの空洞形成変異（ヘテロ二量体化を促進する）を有するFcドメイン単量体と、N末端で抗CTLA-4重鎖ドメイン（構築体9（CTLA-4））とを含む。CTLA-4軽鎖はまた、scFvの一部として長鎖Fcおよび／または短鎖FcのN末端に融合されて発現され得る。

【0357】

表9の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド（1つのプラスミドは軽鎖（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fc（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは短鎖Fc（抗CTLA-4）をコードする）によりコードされる。

【0358】

（表9）構築体9（CTLA-4）配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)	短鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)
構築体9 (CTLA-4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYTMH WVRQAPGKGLEWVTFISY DGNNKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPK SCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPSRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

10

20

30

40

【0359】

実施例29. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体10の設計および精製

タンパク質発現

分岐点があるN末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体10(CTLA-4)はそれぞれ、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド(抗CTLA-4長鎖Fc(配列番号71)の2つのコピー、および短鎖Fc(配列番号63)の4つのコピー)と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド(配列番号49)のコピーとをそれぞれ含む。長鎖Fcは、直列に連続して2つのFcドメイン単量体を含み、各Fcドメイン単量体は、

50

逆電荷変異 K 4 0 9 D および D 3 9 9 K (ホモ二量体化を促進する) を有する F c ドメイン単量体と直列に連続して、E 3 5 7 K 電荷変異ならびに S 3 5 4 C および T 3 6 6 W 突起形成変異 (ヘテロ二量体化を促進する) を有する F c ドメイン単量体と、N 末端で抗 C T L A - 4 V H および C H 1 ドメイン (E U の 1 ~ 2 2 0 位) (構築体 1 0 (C T L A - 4)) とを有する。短鎖 F c は、K 3 7 0 D 電荷変異、ならびに Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 空洞形成変異 (ヘテロ二量体形成を促進するため) を含有する。抗 C T L A - 4 軽鎖はまた、s c F v の一部として長鎖 F c の N 末端に融合されて発現される得る。表 1 0 の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3 つの別個のプラスミド (1 つのプラスミドは軽鎖 (抗 C T L A - 4) をコードし、1 つのプラスミドは長鎖 F c (抗 C T L A - 4) をコードし、1 つのプラスミドは短鎖 F c をコードする) によりコードされる。

10

【0360】

(表 1 0) 構築体 1 0 (C T L A 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体10 (CTLA4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPDF AVYYCQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号71 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGN KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAI YYCARTGWLGPFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLT C LVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLKSDGS FFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL P PCRDKLTKNQVSLWCLVK	配列番号63 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

20

30

40

		GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP G	

10

【0361】

実施例30. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体16の設計および精製
タンパク質発現

20

分岐点がC末端Fcドメインにある、単独分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製する。Fc抗原結合ドメイン構築体16（CTLA-4）はそれぞれ、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド（抗CTLA-4長鎖Fc（配列番号73）の2つのコピー、および短鎖Fc（配列番号63）の4つのコピー）と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド（配列番号49）の3つのコピーとをそれぞれ含む。長鎖Fcは、直列に、各々がE357K電荷変異ならびにS354CおよびT366W突起形成変異（ヘテロ二量体化を促進する）を有する、2つのFcドメイン単量体とともに直列に連続して逆電荷変異K409DおよびD399K（ホモ二量体化を促進する）を有するFcドメイン単量体と、N末端で抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン（EUの1～220位）（構築体10（CTLA-4））とを含む。短鎖Fcは、K370D電荷変異、ならびにY349C、T366S、L368A、およびY407V空洞形成変異（ヘテロ二量体形成を促進するため）を含有する。抗CTLA-4軽鎖はまた、scFvの一部として長鎖FcのN末端に融合されて発現される得る。表11の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド（1つのプラスミドは軽鎖（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fc（抗CTLA-4）をコードし、1つのプラスミドは短鎖Fcをコードする）によりコードされる。

30

【0362】

（表11）構築体16（CTLA4）配列

40

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体16 (CTLA4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号73 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDKLTKNQVSLW CLVKGFPYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK	配列番号63 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

10

20

30

40

		EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	

【0363】

実施例31. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体19の設計および精製

タンパク質発現

分岐点がC末端FcドメインにもN末端Fcドメインにもない単独で分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製した。Fc抗原結合ドメイン構築体19 (CTLA-4) は、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド (抗CTLA-4長鎖Fc (配列番号75) の2つのコピー、および短鎖Fc (配列番号63) の4つのコピー) と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド (配列番号49) のコピーとをそれぞれ含む。長鎖Fcは、E357K電荷変異ならびにS354CおよびT366W突起形成変異 (ヘテロ二量体化を促進する) を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、逆電荷変異K409DおよびD399K (ホモ二量体化を促進する) を有するFcドメイン単量体と直列に連続して、E357K電荷変異ならびにS354CおよびT366W突起形成変異 (ヘテロ二量体化を促進する) を有するFcドメイン単量体と、N末端で抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン (EUの1~220位) (構築体19 (CTLA-4)) とを含む。短鎖Fcは、K370D電荷変異、ならびにY349C、T366S、L368A、およびY407V空洞形成変異 (ヘテロ二量体形成を促進するため) を含有する。抗CTLA-4軽鎖はまた、scFvの一部として長鎖FcのN末端に融合されて発現される得る。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ボソームを介して、ヒト胎生腎 (HEK) 293細胞にトランスフェクトされた。表12の各構築体の以下のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド (1つのプラスミドは軽鎖 (抗CTLA-4) をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fc (抗CTLA-4) をコードし、1つのプラスミドは短鎖Fcをコードする) によりコードされた。

【0364】

(表12) 構築体19 (CTLA-4) 配列

10

20

30

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体 19 (CTLA-4)	配列番号 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRV EPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFS FLYSLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL PG	配列番号 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

10

20

30

40

【0365】

実施例 32. ヒトCTLA-4を発現するHEK細胞におけるCDC

ヒトCTLA-4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(CrownBio)を、DMEM、10%FBS、および選択マーカーとして0.5 μg/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

50

ン (genetec in) またはフェノールレッドを含まない X-V i v o-1 5 培地 (Lonza 社) において希釈した。6 x 10⁵ 細胞/mL の 100 μL の HEK-CTL A-4 細胞を、96 ウェル組織培養処理平底プレート (BD Falcon) に播種した。Fc 構築体および Ab を、X-V i v o-1 5 培地中で 3 倍連続希釈した。4 倍の最終濃度の 50 μL の希釈された構築体を、ウェルへ、標的細胞の上部に添加した。50 μL (25%) の非希釈のヒト血清補体 (Quidel Corporation) を、ウェルの各々に添加した。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 時間のインキュベーション後、20 μL の WST-1 細胞増殖試薬 (Roche Diagnostics Corp) を、各ウェルに添加し、37℃ で一晩インキュベートした。翌朝、2~5 分間プレートアッセイプレートを振盪機に置いた。吸光度を、分光光度計 (Molecular Devices SPECTRAmax M2) で、600 nm での補正で、450 nm で測定した。

【0366】

100% 溶解対照としてトリトン X-100 界面活性剤 (Promega) で処理した試料と、0% 細胞溶解対照として構築物を含まない細胞とを使用してデータを正規化した。

【0367】

表 13 および図 25 は、抗 CTLA-4 Fc 構築体で処理された CTLA-4 でトランスフェクトされた HEK 細胞の CDC アッセイの結果を示す。

【0368】

(表 13) CTLA-4 でトランスフェクトされた HEK 細胞を含む抗 CTLA-4 構築体の CDC 活性

構築体 番号 ¹	n	範囲	平均
抗CTLA4 mAb	1	不明瞭	約101.3/活性なし
S3Y-AA-CTLA4 構築体13 G ₂₀ リンカー	1	5.474 ~ 14.38	8.889

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。

【0369】

実施例 33. 抗 CTLA-4 Fc 構築体による抗体依存性細胞貪食 (ADCP) 活性化
ヒト単球を、CD16 除去 (StemCell) を含まない陰性選択キットを使用して凍結した末梢血単核球細胞 (PBMC) から精製した。次いで、単離された単球を、6 日間、50 ng/mL の M-CSF (R&D Systems) の存在下で培養して M0 マクロファージまで細胞を分化した。M0 マクロファージを、M2c マクロファージまで (48 時間) 最終分化のために、特殊光学 96 ウェル平底組織培養プレート (Corning 3614) に、50 ng/mL IL-10 (R&D Systems) の存在下で、100 μL 中 50,000 細胞/ウェルでフェノールレッド不含 RPMI (Gibco) 中の 10% 熱不活性化 Super Low IgG FBS (HyClone) 中に播種した。ヒト CTLA-4 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 (CrownBio) を、DMEM、10% FBS、および選択マーカーとして 0.5 μg/mL のピューロマイシンにおいて培養した。HEK-CTL A-4 細胞を、それらの培養フラスコから採取し、pH rod o 赤色細胞洗浄緩衝液 (Es

sen/Sartorius) で一度洗浄し、次いで、pHrodo 赤色細胞標識試薬キット (Essen/Sartorius) で、37℃で1時間250 ng/mLで、 1×10^6 /mLで標識した。標識されたHEK-CTLA-4 標的細胞を、フェノールレッド不含RPMI (Gibco) 中の10%熱不活性化Super Low IgG FBS (HyClone) 中に再懸濁し、次いで、50 μ L中10,000細胞/ウェルで添加した。10倍連続希釈液中(50 μ L/ウェル) 50 ng/mLの最終濃度のIL-10および4倍の最終濃度の構築体を、200 μ L/ウェルの最終体積のためにエフェクターおよび標的細胞に添加した。食食を、生細胞画像化システム (Essen/Sartorius、Incucyte S3) を用いてpHrodo 赤色蛍光強度の増加によって測定した。アッセイを、4倍対物を用いて、相および赤色蛍光のウェル当たり捕捉された1つの画像とともに、2つ組で行った。スキャンの回数を24時間にわたり45分毎に設定した。分析後、合計HEK-CTLA-4 食作用を定量するために使用される測定基準は、合計赤体積分強度 (RCU $\times \mu m^2$ /画像) である。結果を表14および図26に示す。

【0370】

(表14) HEK-CTLA-4 細胞を含む抗CTLA-4 構築体のADCP 活性

構築体 番号 ¹	n	範囲	平均
抗CTLA4 mAb	1	不明瞭	約0.1124
S3Y-AA-CLTA4 構築体13 G ₂₀ リンカー	1	0.0005506 ~ 0.006575	0.001903
S3I-AA-CTLA4 構築体7 ² (抗CTLA-4)	1	0.0002413 ~ 0.001917	0.0006801

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。

【0371】

実施例34. 抗CTLA-4 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

ヒトCTLA-4 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 (CrownBio) を、DMEM、10% FBS、および選択マーカーとして0.5 μ g/mLのピューロマイシンにおいて培養した。このアッセイにおいてNK細胞 (HemaCare) をエフェクター細胞として使用し、非組織培養処理フラスコ (Falcon) 内に一晩置いた。次いで、HEK-CTLA-4 細胞を、3 mLのAccutase (Corning) を用いて5分間採取し、洗浄して、 0.2×10^6 細胞/mLで再懸濁した。50 μ LのHEK-CTLA-4 細胞を、96ウェル組織培養処理白色平底プレート (Costar) の各ウェルに添加した。インキュベーション時間なしで、5倍連続希釈液中11倍の最終濃度での10 μ Lの構築体を各ウェルに添加した。直後に、 1×10^6 細胞/mLの50 μ LのNK細胞を各ウェルに添加した。インキュベーションを37℃で5時間行った。5時間後、50 μ LのCytotox glo 試薬 (Promega) を各ウェルに添加し、インキュベーションを37℃で15分間行った。PHERAstar FS (BMG Labtech) 上で発光を読み取った。結果を表1

5 および図 27 に示す。

【0372】

(表 15) HEK-CTLA-4 細胞を含む抗 CTLA-4 構築体の ADC 活性

構築体 番号 ¹	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
抗CTLA4 mAb	1	0.2533 ~ 0.5156	0.3525	
S3Y-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体13 G ₂₀ リンカー	1	0.01889 ~ 0.03991	0.02759	
S3Y-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体13 G ₂₀ リンカー 脱グリコシル化	1	不明瞭	約1.743/活性なし	
S3A-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体9	1	0.01494 ~ 0.03929	0.02515	
S5X-AA-CTLA4 構築体19 (抗CTLA-4)	1	0.0229 ~ 0.03298	0.02749	

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。

【0373】

実施例 35：Fc 構築体中の Fc ドメインは、抗体中の Fc ドメインのものに対して Fc ガンマ受容体同様の結合を保持する

抗 CD20 および抗 CTLA4 構築体を利用して、ホモ二量体化変異、ヘテロ二量体化変異、ポリペプチドリンカー、および Fab ドメインの様々な組み合わせが、Fc ガンマ受容体への結合に影響したかどうかを評価した。表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用して、CD64 (Fc ガンマ受容体 I) への 1:1 結合を評価した。これらの構築体をチップ表面上に捕捉し、可溶性受容体への結合を測定して、1:1 結合を確実にした。この形式では、結合価は、Fc 機能の変化に最も敏感な読み取り値であり、速度定数および平衡定数は、Fc ドメインのサブセットの変化に鈍感である。

【0374】

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ボソームを介して、ヒト胎生腎 (HEK) 293 細胞にトランスフェクトされた。抗体を 2 つの異なるプラスミド (1 つのプラスミドが重鎖をコードし、第 2 のプラスミドが軽鎖をコードした) から発現させた。Fc 構築体は、3 つの別個のプラスミドから発現され、ほとんどの場合、1 つのプラスミドは抗体軽鎖をコードし、1 つのプラスミドはアミノ末端 Fc に結合された CH1-VH Fc 部分を含む長鎖 Fc をコードし、3 つ目のプラスミドは短鎖 Fc をコード

した。例外はS3AおよびS3WのFc構築体であった。S3Wの場合、1つのプラスミドが抗体軽鎖をコードし、第2のプラスミドが2つのFcドメインを含む長鎖をコードし、第3のプラスミドがCH1-VH F A B部分を含む単一のFc鎖をコードした。S3Aの場合、1つのプラスミドが抗体軽鎖をコードし、第2のプラスミドがアミノ末端Fcに結合したCH1-VH F A B部分を含む長鎖Fcをコードし、1つのプラスミドが同様にCH1-VH F A B部分を含む短鎖Fcをコードした。

【0375】

タンパク質精製

発現したタンパク質を、Poros Mab Capture Aカラムを用いて、プロテインA系のアフィニティークロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。捕捉したFc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濾過する。

10

【0376】

タンパク質は、Poros XS樹脂を用いて、イオン交換クロマトグラフィーによってさらに分取した。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(SEC)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。

20

【0377】

イオン交換の後、プールされた材料を、接線流濾過システム上で、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濾過した。

30

【0378】

物理化学的分析

分析用サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を、ポストプロテインA、プールされたイオン交換画分、および精製された最終物質の純度評価に使用した。

【0379】

精製された物質を、1倍PBSを使用して1mg/mLに希釈し、Zenix SEC-300(4.6×300mm、3μm、300Å、Sepax、カタログ番号213300-4630)を分析カラムとして使用して、UV&FLD検出器を備えたAgilent 1200システムで分析した。

【0380】

カラムを、分析前に0.3mL/分で1時間、0.05w/v%のアジ化ナトリウム緩衝液を用いて、100mMのリン酸ナトリウム、200mMのアルギニン、300mMの塩化ナトリウム(pH6.7)で平衡化した。注入量はおよそ10~15μLであり、カラム温度は300℃であり、UV検出は280nmであり、FLDは励起280nmおよび発光330nmであり、総実行時間は15分間であった。

40

【0381】

サイズ純度の結果を表16に示す。すべての物質が、低レベルの高位種(HOS)のみを示した。

【0382】

(表16) Fc結合アッセイに使用された構築体のサイズ純度

構築体	抗原	SECによるサイズ純度 (標的種%)	SECによるサイズ純度 (HOS %)
mAb	CD20	97.0%	1.7%
構築体13 (S3Y)	CD20	89.6%	0.0%
構築体7 (S3I)	CD20	89.0%	1.7%
構築体8 (S3W)	CD20	83.4%	0.0%
構築体9 (S3A)	CD20	92.4%	1.5%
構築体10 (S5I)	CD20	98.4%	1.6%
(構築体19 (S5X))	CD20	90.0%	0.4%
構築体16 (S5Y)	CD20	73.8%	1.6%
mAb	CD20	97.0%	1.7%

10

【0383】

結合分析

結合実験を、CM3シリーズSセンサーチップを使用してBiacore T200計器 (GE Healthcare) で行った。FcγR結合の結合価分析のために、天然プロテインAを直接アミン結合により固定化した。リガンドを泳動緩衝液中で希釈し、捕捉した。ヒト組換えCD32aまたはCD64 (R&D Systems) の6点希釈系列を捕捉したリガンド上に流した。各リガンドの結合価を以下のように計算した。

20

リガンドの結合価 = $R_{max} / [(MW_{分析物} / MW_{リガンド}) \times \text{リガンド捕捉レベル}]$

【0384】

抗CD20構築体へのCD64結合の分析の結果を表17に示す。いずれの場合でも、CD64結合価はFcドメインの数に等しく、すべてのFcドメインがCD64への結合に機能したことを示す。S3Y-AA-OBIおよびS3Y-AA-AVEと配列が同一であるが、Fabドメインを欠く対照化合物はそれらの構築体と同等にCD64に結合し、Fabドメインの包含がFc受容体への結合を変化させなかったことを示す。

30

【0385】

(表17) 特定の抗CD20構築体の原子価

構築体	抗原	Fcドメイン の数	SPRによるCD64 結合価
mAb	CD20	1	1.5
構築体13 (S3Y)	CD20	3	3.4
構築体7 (S3I)	CD20	3	3.0
構築体8 (S3W)	CD20	3	2.9
構築体9 (S3A)	CD20	3	3.1
構築体10 (S5I)	CD20	5	5.5
(構築体19 (S5X))	CD20	5	4.9
構築体16 (S5Y)	CD20	5	5.5
対照(S3Y)	抗原結合ドメイン なし	3	3.

40

【0386】

50

実施例 36：Fc 構築体は、細胞表面 Fc ガンマ受容体により貪欲に結合する

構築体の細胞表面 CD32a への相対的結合を、抗 CD20 構築体を使用して、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) アッセイ (CisBio) で評価した。アッセイ試薬を製造業者の指示に従って調製した。Freedom EVOWare 150 自動液体ハンドラー (Tecan) を使用して試料毎に 10 点 3 倍連続希釈系列を生成し、これを、標識受容体を有する細胞に添加した。その後、標識競合抗体を添加し、プレートを室温でインキュベートした。PHERAstar 蛍光リーダー (BMG Labtech GmbH) を使用して、アッセイプレートを 665 nm および 620 nm で読み取った。対数変換試料濃度を対応する HTRF シグナル比 (665 nm / 620 nm) に対してプロットした。4 パラメータ非線形回帰分析 (最小二乗適合) を XY プロットに行って非標識試料の EC50 を計算し、EC50 は Fc ガンマ受容体に対する試料の親和性に反比例した。

【0387】

TR-FRET により決定された CD32a への競合結合の測定値を、表 18 に要約する。IC50 値の減少によって反映されるように、Fc ドメインの数の増加により、CD32a について免疫グロブリンと競合する構築体の能力が大いに高まった。S3Y-AA-OBI および S3Y-AA-AVE と配列が同一であるが、Fab ドメインを欠く対照化合物はそれらの構築体と同等に細胞表面 CD32a について競合し、Fab ドメインの包含が Fc 受容体への結合を変化させなかったことを示す。

【0388】

(表 18) 特定の抗 CD20 構築体の Fc 受容体結合

構築体	抗原	FcyRIIIaV158 IC50 (nM)	FcyRIIIaH131 IC50 (nM)	FcyRIIb IC50 (nM)
mAb	CD20	428	1273	3291
構築体 13 (S3Y)	CD20	0.076	0.009	2.146
構築体 7 (S3I)	CD20	0.230	0.014	29.220
構築体 8 (S3W)	CD20	0.476	0.026	34.925
構築体 9 (S3A)	CD20	0.539	0.018	17.361
構築体 10 (S5I)	CD20	0.045	0.002	4.427
(構築体 15 (S5X)	CD20	0.055	0.012	0.086
構築体 1 (S5Y)	CD20	0.017	0.014	1.231
対照 (S3Y)	抗原結合 ドメイン なし	0.097	0.025	3.297

【0389】

実施例 37：抗原結合は、抗 CTLA4 Fc 構築体において保存される

抗原結合を、SPR を使用して評価した。組み換え型、ヒスチジンタグ付きの CTLA4 (9049-B7 R&D Systems) タンパク質を、以前に固定化した抗 6X His 抗体を使用してセンサ上で捕捉した。同族抗体および Fc 構築体の希釈系列は、センサ上を通過し、それは分析物注射の間に低 pH のグリシン溶液で再生成された。結合を、1:1 ラングミュア相互作用モデルを使用して計算した。

【0390】

抗 CTLA4 構築体の結合を表 19 に示す。すべての試験した化合物の SEC による純度は、86% 以上であった。Fc 構築体は、1:1 の結合を支持したアッセイにおいて

対応するモノクローナル抗体のものと同程度の抗原結合を有していた。

【0391】

(表19) ある特定の抗CTLA4 Fc構築体によるCTLA-4結合

構築体	KD (nM)
mAb	7.38
構築体13 (S3Y)	9.44
構築体7 (S3I)	0.013

【0392】

実施例38：抗CTLA4 Fc構築体は、抗CTLA4 mAbと比較して一次ヒト制御性T細胞の強化されたADCCを媒介する

その結果が図28に示される、抗CTLA-4 Fc構築体およびCTLA4抗体による一次ヒト制御性T細胞のNK細胞媒介性殺傷の分析は、S3Y-AA-CTLA4 Fc構築体が、同じFabドメインを有する抗CTLA4 mAbよりも優れていることを示した。

【0393】

実施例39：抗CTLA4 Fc構築体は、Fc受容体に結合する。

Fc受容体結合の分析により、抗CTLA4 Fc構築体13（実施例2、表6）がFc受容体に結合することがわかった。

【0394】

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。

【0395】

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既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が理解されるであろう。

【0396】

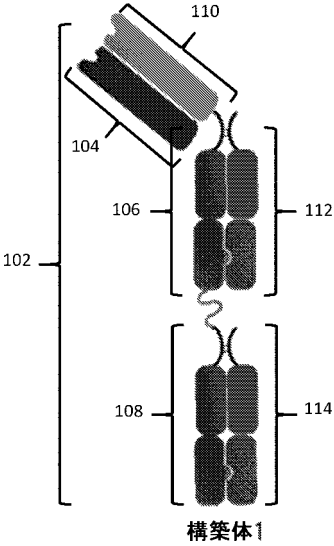
他の実施形態は、特許請求の範囲の範囲内とする。

10

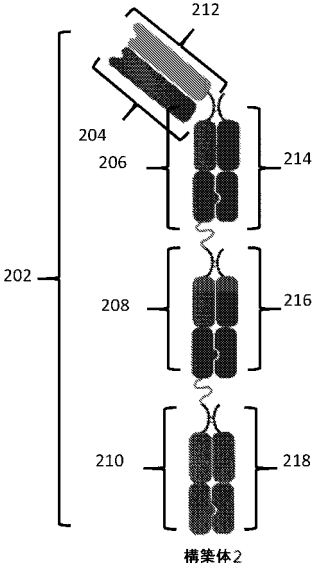
20

30

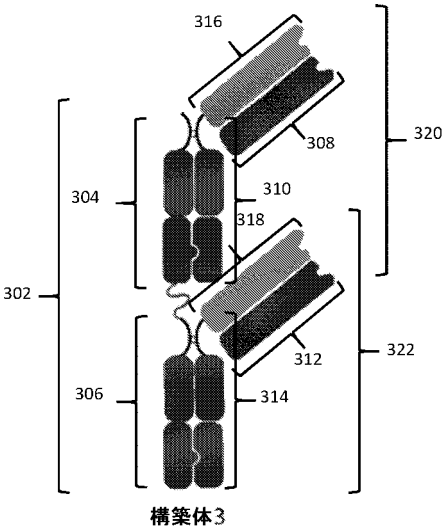
【図 1】



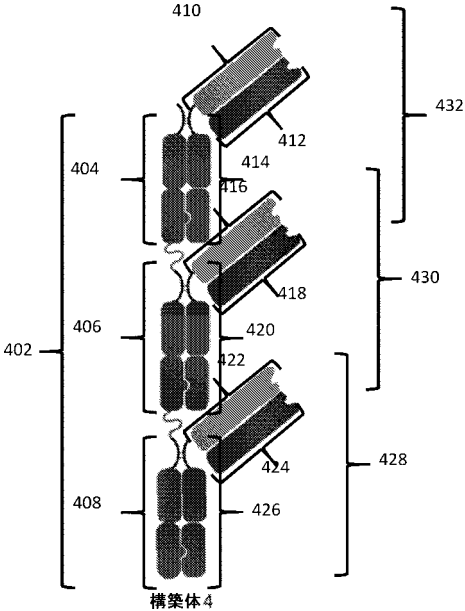
【図 2】



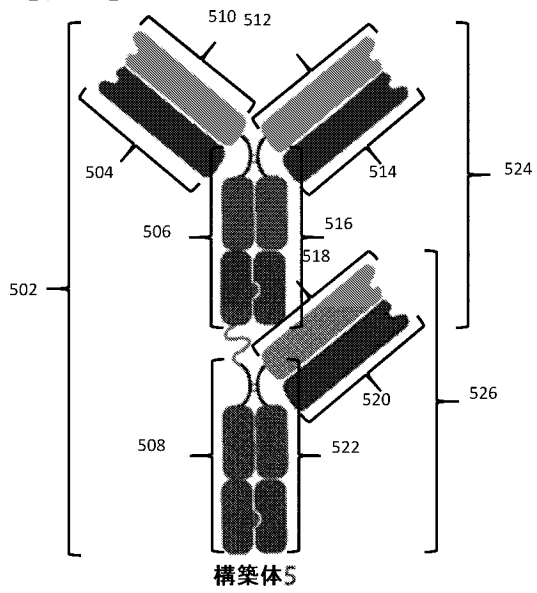
【図 3】



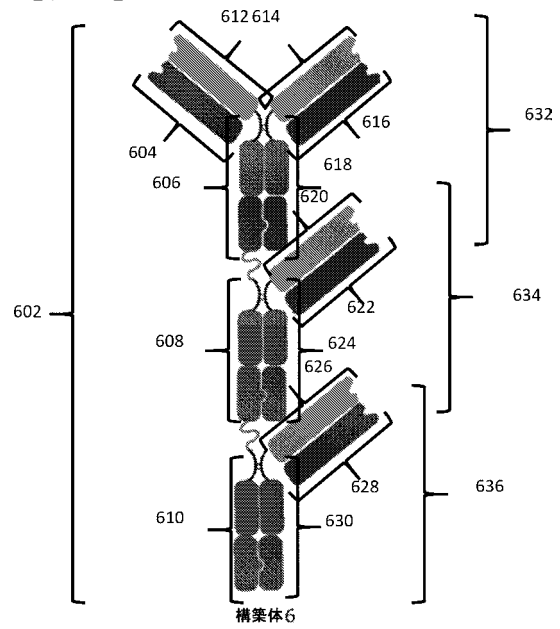
【図 4】



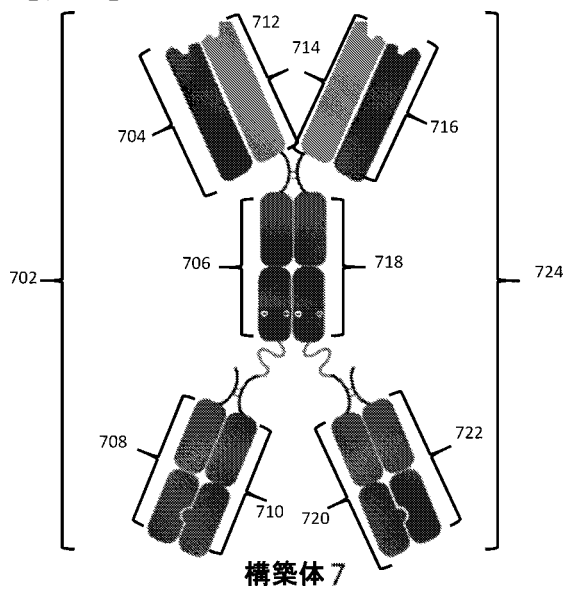
【図 5】



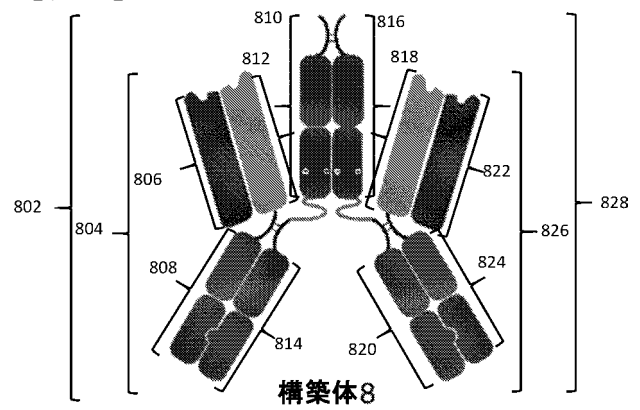
【図 6】



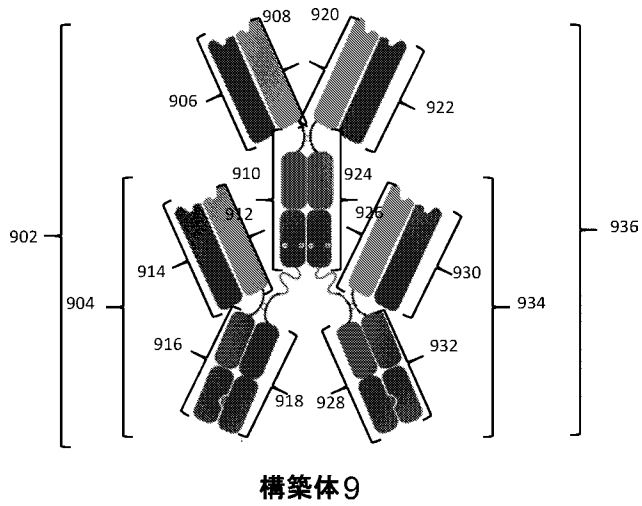
【図 7】



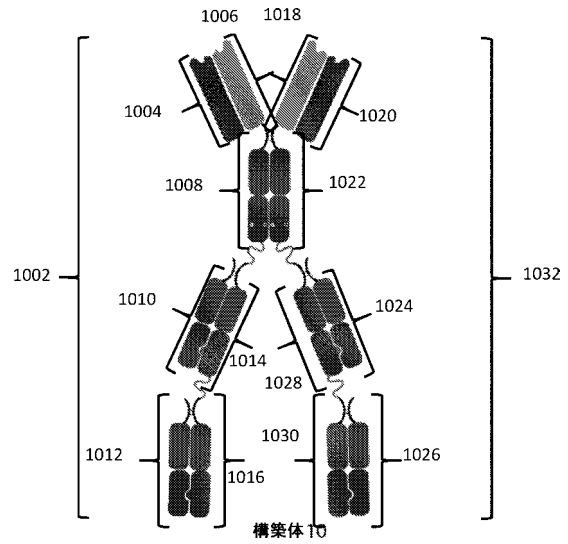
【図 8】



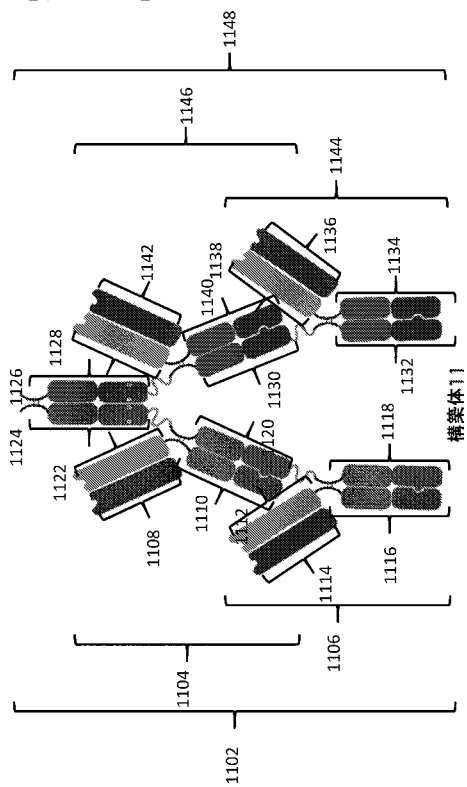
【図 9】



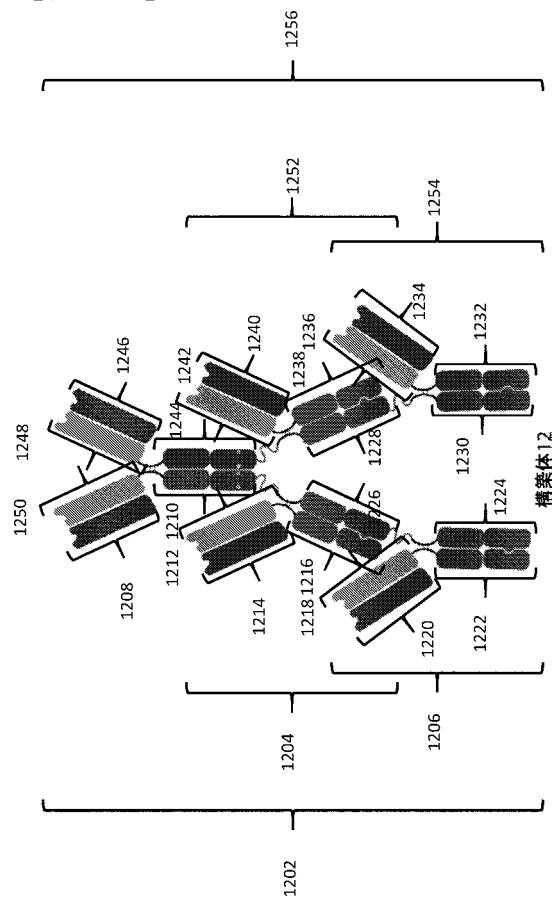
【図 10】



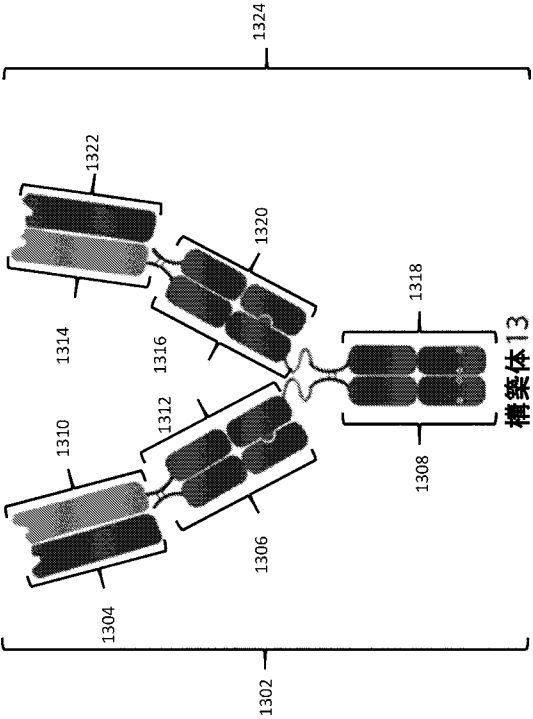
【図 11】



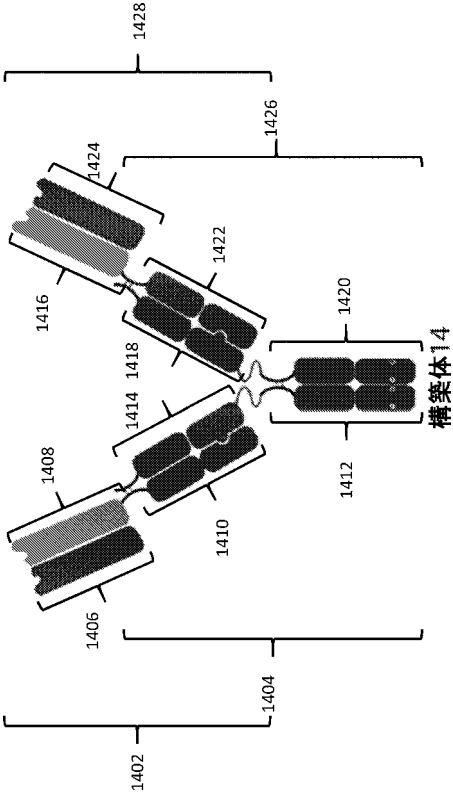
【図 12】



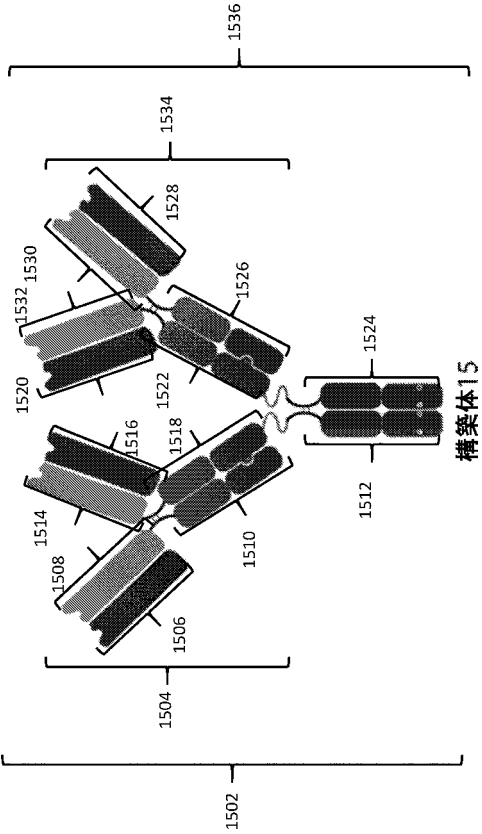
【図 1 3】



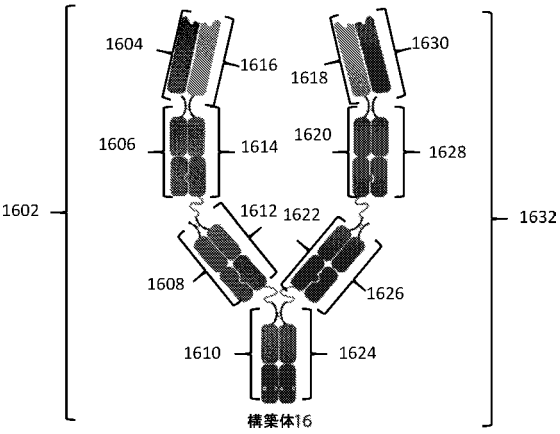
【図 1 4】



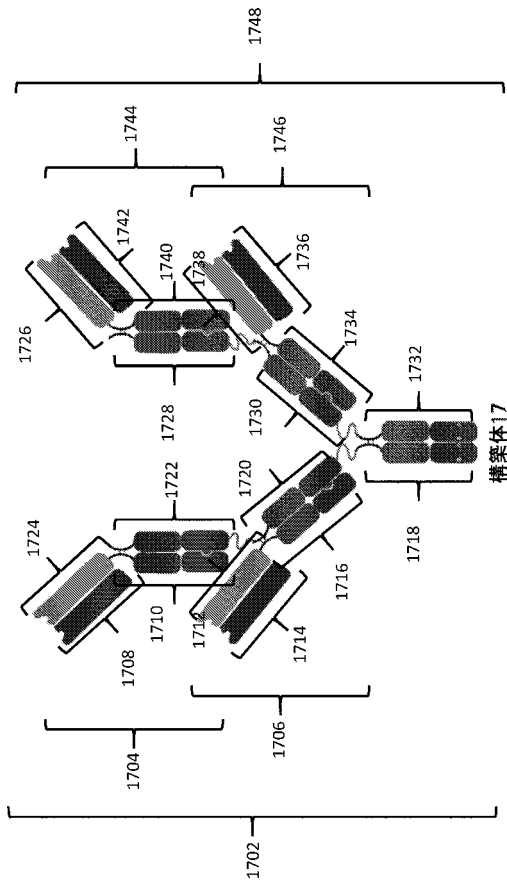
【図 1 5】



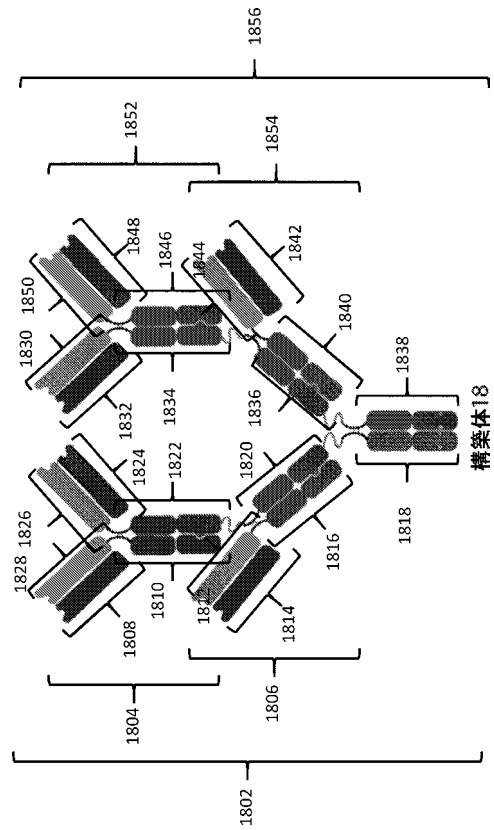
【図 1 6】



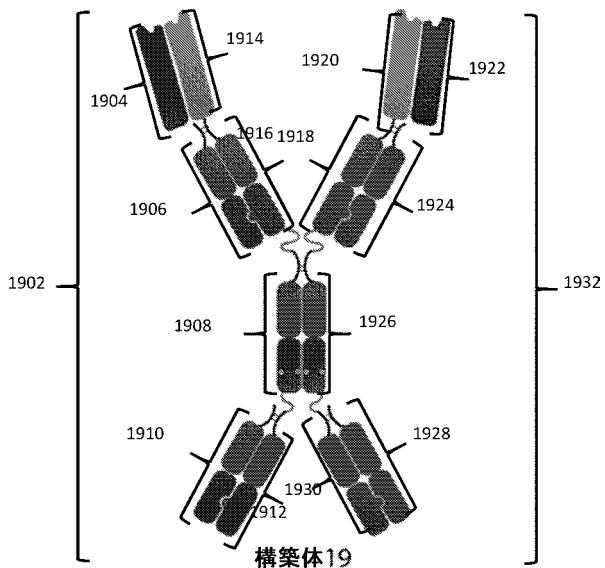
【図 17】



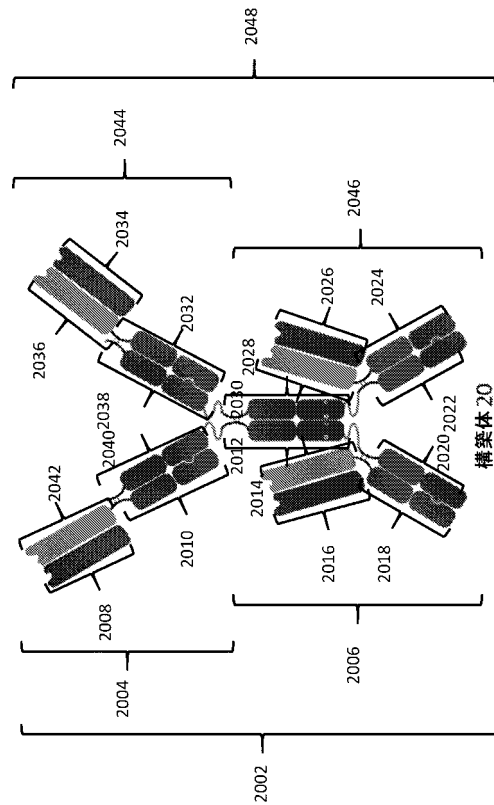
【図 18】



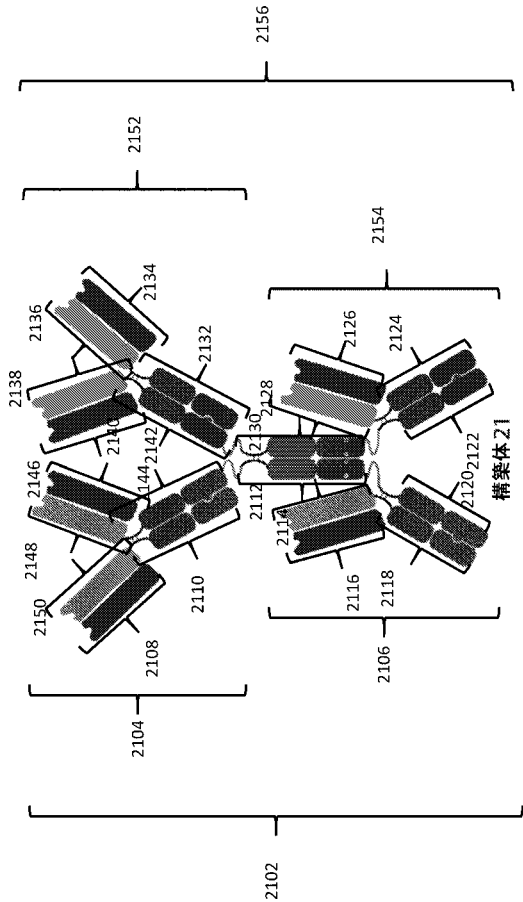
【図 19】



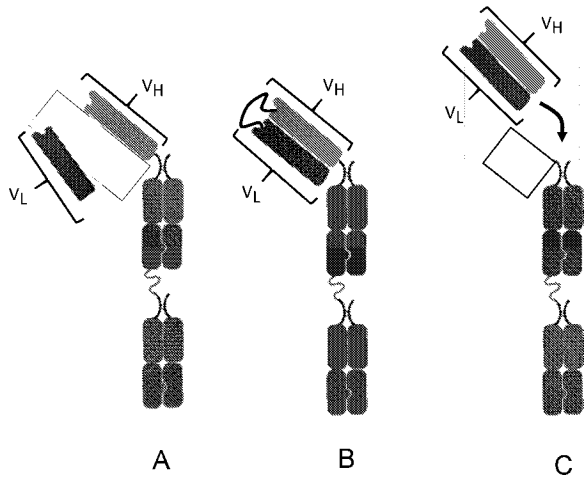
【図 20】



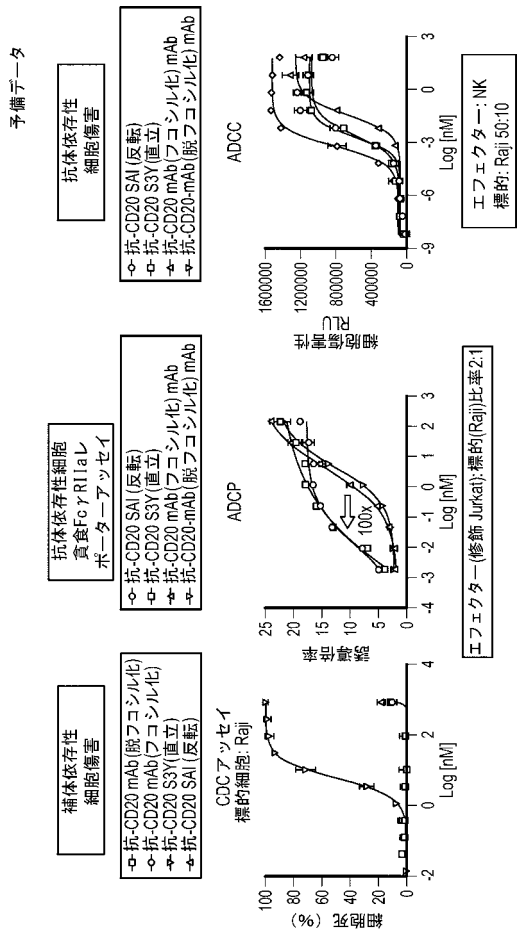
【図 2 1】



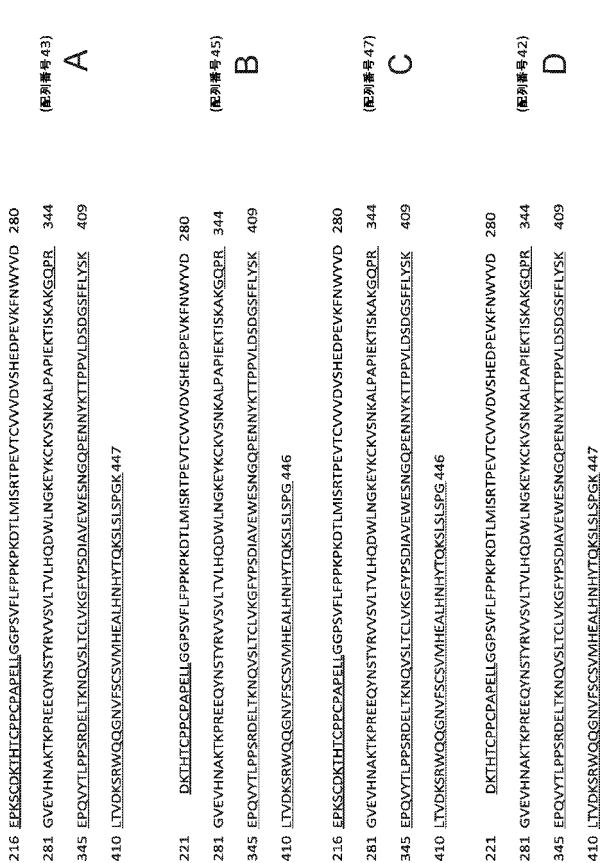
【図 2 3】



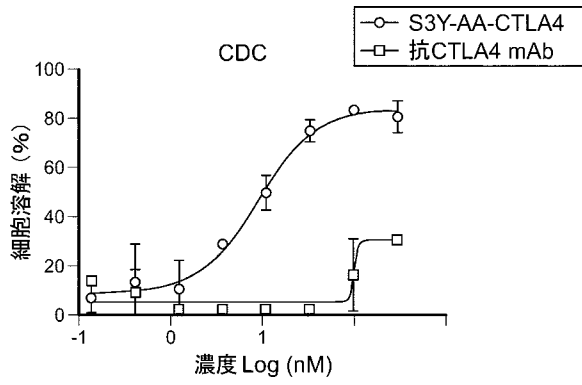
【図 2 2】



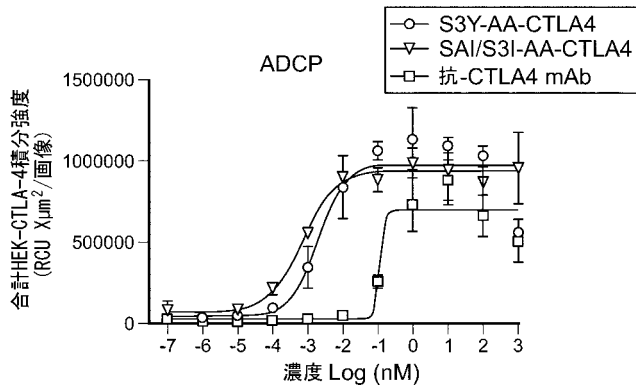
【図 2 4】



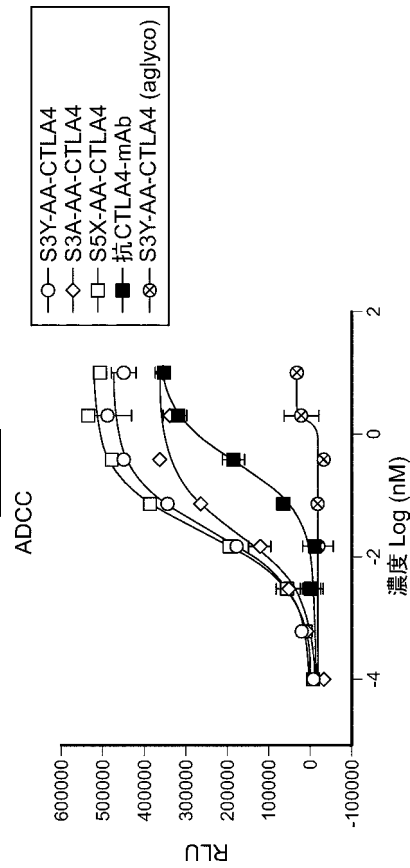
【図 2 5】



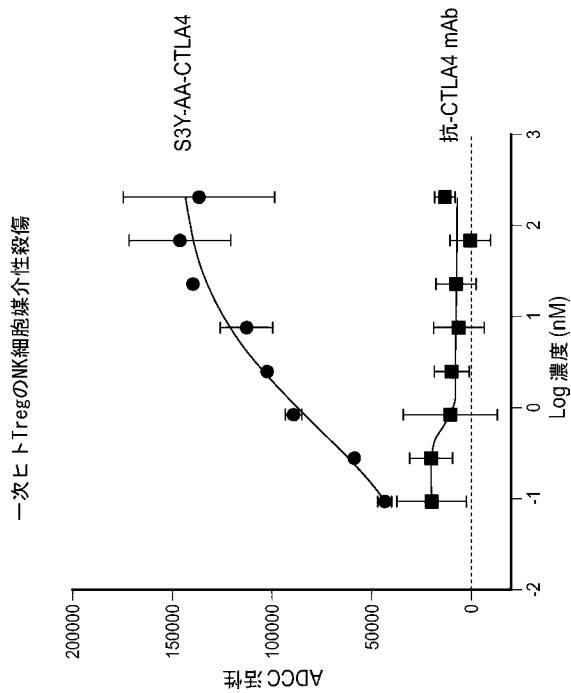
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



【手続補正書】

【提出日】令和3年4月16日(2021.4.16)

【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】

C T L A 4 結合ドメインと、リンカーによって第2のF cドメインに結合された第1のF cドメインとを含むF c抗原結合ドメイン構築体であって、前記第1および第2のF cドメインの各々が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、F c抗原結合ドメイン構築体。

【請求項2】

C T L A 結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第1のI g G 1 F cドメイン単量体；第2のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第2のI g G 1 F c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、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む任意選択の第3のI g G 1 F c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2つのF cドメイン単量体が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、ポリペプチド。

【請求項3】

前記C T L A 4 結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

前記C T L A 4 結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項5】

前記第1のI g G 1 F cドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含み、前記第2のI g G 1 F c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2に記載のポリペプチド。

【請求項6】

前記第1のI g G 1 F c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I g G 1 F cドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項7】

前記第1のI g G 1 F cドメイン単量体および前記第2のI g G 定常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2に記載のポリペプチド。

【請求項8】

第3のリンカーと、第3のI g G 1 F cドメイン単量体と、を含み、

前記第1のI g G 1 F cドメイン単量体、前記第2のI g G 1 F cドメイン単量体、および前記第3のI g G 1 F c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む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項9】

第3のリンカーと、第3のI g G 1 F cドメイン単量体と、を含み、

前記第1のI g G 1 F cドメイン単量体および前記第2のI g G 1 F c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I g G 1 F cドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、

【請求項 10】

請求項 2 に記載のポリペプチド。

請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

【請求項 14】

【請求項 15】

【請求項 16】

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS (配列番号 9), GGS (配列番号 10), GGS (配列番号 11), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 12), GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33).

【請求項 17】

【請求項 18】

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（配列

番号 2 2 0)、4 ~ 2 0 (配列番号 2 2 3)、8 ~ 3 0 (配列番号 2 2 1)、8 ~ 2 0 (配列番号 2 2 4)、1 2 ~ 2 0 (配列番号 2 2 5)、または 1 2 ~ 3 0 個 (配列番号 2 2 2) のグリシン残基からなる、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

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、2 0 個のグリシン残基 (配列番号 2 3) からなる、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の I 2 5 3 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 1】

E U の I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 2】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 A である、請求項 2 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 2 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 P である、請求項 2 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 6】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 6) および D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) 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 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 2 7】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有する、請求項 2 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 0】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 1】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 2】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 3】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 4】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 5】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 6】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 7】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 8】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R

、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、およびD 3 5 6 Rからなる群から選択される、請求項30～37のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項39】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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2～29のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項40】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大6つが、前記CH3ドメイン内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39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、EUのG 3 4 1位～EUのK 4 4 7位（両端を含む）の配列内にある、請求項39に記載のポリペプチド。

【請求項42】

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つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、およびT 3 9 4 Fからなる群から選択される、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項43】

前記2つまたは4つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、およびD 3 5 6 Rから選択される、請求項5、6、および9～29のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項44】

前記CTLA4結合ドメインが、scFvである、請求項2～43のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項45】

前記CTLA4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2～43のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項46】

前記CTLA4結合ドメインが、VLドメインをさらに含む、請求項43に記載のポリペプチド。

【請求項47】

前記VHドメインが、表1に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列のセットを含む、請求項45に記載のポリペプチド。

【請求項48】

前記VHドメインが、表2に記載の抗体の配列を含むVHドメインのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む、請求項45に記載のポリペプチド。

【請求項49】

前記VHドメインが、表2に記載の抗体のVH配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、前記VH配列が、前記CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列を除き、表2に記載の抗体のVH配列と少なくとも95%または98%同一である、請求項45に記載のポリペプチド。

【請求項50】

前記VHドメインが、表2に記載の抗体のVH配列を含む、請求項45に記載のポリペプチド。

【請求項51】

前記CTLA4結合ドメインが、表1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45に記載のポリペプチド。

【請求項52】

前記CTLA4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 C D R-H 1、C D R-H 2、C D R-H 3、C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 の配列を含む、請求項 4 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R-H 1、C D R-H 2、および C D R-H 3 を含む V H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 を含む V L ドメインを含み、前記 V H ドメイン配列および V L ドメイン配列が、C D R-H 1、C D R-H 2、C D R-H 3、C D R-L 1、C D R-L 2、および C D R-L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 9 5 % または 9 8 % 同一である、請求項 4 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含む、請求項 4 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、I g G C L 抗体定常ドメインおよび I g G C H 1 抗体定常ドメインを含む、請求項 2 ～ 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 6】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み、V L ドメインおよび C L ドメインを含むポリペプチドに結合して、F a b を形成することができる、請求項 2 ～ 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

前記第 1 または第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される請求項 2 ～ 5 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドの 2 つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

【請求項 5 8】

ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む I g G 1 F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドに結合される請求項 2 ～ 5 6 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、

前記ポリペプチドと前記第 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 I g G 1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内のシステイン残基と前記第 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との間のジスルフィド結合によって結合される、ポリペプチド複合体。

【請求項 5 9】

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 5 8 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 6 0】

前記改変された空洞を形成する前記変異が、Y 4 0 7 T、Y 4 0 7 A、F 4 0 5 A、T 3 9 4 S、T 3 9 4 W / Y 4 0 7 A、T 3 6 6 W / T 3 9 4 S、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C、S 3 6 4 H / F 4 0 5 A からなる群から選択される、請求項 5 9 に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 6 1】

前記第 2 のポリペプチドが、最大 1 0 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 5 8 ～ 6 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項 6 2】

C T L A 4 結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体；第 2 のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 2 の I g G 1 F c 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、C H 2 ドメイン、および C H 3 ド

メインを含む任意選択の第3のIgG1Fc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、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、ポリペプチド。

【請求項63】

前記CTLA4結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項64】

前記CTLA4結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項65】

前記第1のIgG1Fcドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、前記第2のIgG1Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項66】

前記第1のIgG1Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2のIgG1Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4BAおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項67】

前記第1のIgG1Fcドメイン単量体および前記第2のIgG定常ドメイン単量体の両方が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項68】

第3のリンカーと、第3のIgG1Fcドメイン単量体と、を含み、
前記第1のIgG1Fcドメイン単量体、前記第2のIgG1Fcドメイン単量体、および前記第3のIgG1Fcドメイン単量体が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、
請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項69】

第3のリンカーと、第3のIgG1Fcドメイン単量体と、を含み、
前記第1のIgG1Fcドメイン単量体および前記第2のIgG1Fcドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第3のIgG1Fcドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、
請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項70】

第3のリンカーと、第3のIgG1Fcドメイン単量体と、を含み、
前記第1のIgG1Fcドメイン単量体および前記第3のIgG1Fcドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2のIgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、
請求項62に記載のポリペプチド。

【請求項71】

第3のリンカーと、第3のIgG1Fcドメイン単量体と、を含み、
前記第2のIgG1Fcドメイン単量体および前記第3のIgG1Fcドメイン単

量体の両方が各々、表 4 A および表 4 B から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第 1 の I g G 1 ドメイン単量体が、表 4 A 中のものから選択される 2 つの逆電荷変異のセット、または表 4 B 中のものから選択される 4 つの逆電荷変異のセットを含む、

請求項 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 2】

表 4 から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異を含む前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、同一の C H 3 ドメインを有する、請求項 6 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7 3】

表 4 から選択される 1、2、または 3 つの逆電荷アミノ酸変異が、C H 3 ドメインにある、請求項 6 2 ～ 7 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7 4】

前記変異が、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 7 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 5】

前記変異が各々、単一アミノ酸変化である、請求項 6 2 ～ 7 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7 6】

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、GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GSGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS GGS (配列番号 9), GGS GGS GGS (配列番号 10), GGS GGS GGS GGS (配列番号 11), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS GGS (配列番号 12), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 34), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), および GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 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 7 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 7】

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 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 8】

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 ～ 3 0 (配列番号 2 2 0)、4 ～ 2 0 (配列番号 2 2 3)、8 ～ 3 0 (配列番号 2 2 1)、8 ～ 2 0 (配列番号 2 2 4)、1 2 ～ 2 0 (配列番号 2 2 5)、または 1 2 ～ 3 0 個 (配列番号 2 2 2) のグリシン残基からなる、請求項 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 7 9】

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、2 0 個のグリシン残基 (配列番号 2 3) からなる、請求項 6 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 8 0】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の I 2 5 3 位に単一アミノ酸

変異を含む、請求項 62～79 に記載のポリペプチド。

【請求項 81】

EU の I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択される、請求項 80 に記載のポリペプチド。

【請求項 82】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 A である、請求項 81 に記載のポリペプチド。

【請求項 83】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、EU の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 62～82 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 84】

EU の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 83 に記載のポリペプチド。

【請求項 85】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 P である、請求項 84 に記載のポリペプチド。

【請求項 86】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 226) および D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 227) 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 62～85 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 87】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 227) を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

【請求項 88】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 228) を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

【請求項 89】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 228) を有し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 227) を有する、請求項 86 に記載のポリペプチド。

【請求項 90】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 91】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含む、請求項 62～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 92】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 3】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 4】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、1 0 個以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 5】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 6】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 7】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 8】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択される、請求項 9 0 ～ 9 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9 9】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 1 0 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 2 ～ 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0 0】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、前記 C H 3 ドメイン内の逆電荷変異である

、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 101】

前記単一アミノ酸置換が、EU の G 3 4 1 位～EU の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 102】

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 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択される、請求項 62 に記載のポリペプチド。

【請求項 103】

前記 2 つまたは 4 つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される、請求項 65、66、および 69～89 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 104】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、s c F v である、請求項 62～103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 105】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含む、請求項 62～103 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 106】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V L ドメインをさらに含む、請求項 103 に記載のポリペプチド。

【請求項 107】

前記 V H ドメインが、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列のセットを含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 108】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 109】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列を除き、表 2 に記載の抗体の V H 配列と少なくとも 95% または 98% 同一である、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 110】

前記 V H ドメインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 111】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列のセットを含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 112】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットからの C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を含む、請求項 105 に記載のポリペプチド。

【請求項 113】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V H ドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V L 配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V L ドメインを含み、前記 V H ドメイン配列および V L ドメイン配列が、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 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、少なくとも95%または98%同一である、請求項105に記載のポリペプチド。

【請求項114】

前記CTLA4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105に記載のポリペプチド。

【請求項115】

前記CTLA4結合ドメインが、IgG C_L抗体定常ドメインおよびIgG C_H1抗体定常ドメインを含む、請求項62～103のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項116】

前記CTLA4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62～103のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項117】

前記第1または第2のIgG1 Fcドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される請求項2～56のいずれか一項に記載のポリペプチドの2つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

【請求項118】

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る請求項62～116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、

前記ポリペプチドと前記第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のシステイン残基と前記第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との間のジスルフィド結合によって結合される、ポリペプチド複合体。

【請求項119】

前記第2のポリペプチド単量体が、1、2、または3つの逆電荷変異を含む、請求項118に記載のポリペプチド複合体。

【請求項120】

前記第2のポリペプチド単量体が、表4から選択される1、2、または3つの逆電荷変異を含み、かつポリペプチド中の表4から選択される1、2、または3つの逆電荷変異に対して相補的である、請求項119に記載のポリペプチド複合体。

【請求項121】

前記第2のポリペプチドが、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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118～120のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体。

【請求項122】

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ドメイン単量体と、第2のリンカーと、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ドメイン単量体と、任意選択の第3のリンカーと、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ドメイン単量体とを含む、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む、ポリペプチド。

【請求項123】

前記第1のIgG1単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびCH1ドメインをさらに含む、請求項122に記載のポリペプチド。

【請求項124】

前記第1のIgG1単量体のアミノ末端にscFvをさらに含む、請求項122に記載

のポリペプチド。

【請求項 1 2 5】

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含み、前記第 2 の I g G 1 F c 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 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 6】

前記第 1 の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 7】

前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 2 の I g G 定常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 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 8】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体、前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体、および前記第 3 の I g G 1 F c 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む、
請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 2 9】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 2 の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、
請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 0】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 3 の I g G 1 F c 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 2 の I g G 1 ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、
請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 1】

第 3 のリンカーと、第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第 3 の I g G 1 F c 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 1 の I g G 1 ドメイン単量体が、2 つまたは 4 つの逆電荷変異を含む、
請求項 1 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 2】

改変された突起を形成する変異を含む前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、1、2、または 3 つの逆電荷変異をさらに含む、請求項 1 2 2 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 3】

前記改変された突起を形成する変異および前記逆電荷変異が、前記 C H 3 ドメイン内にある、請求項 1 2 2 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3 4】

ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 1 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、第 2 のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む第 2 の I g G 1 F c ドメイン単量体と、任意選択の第 3 のリンカーと、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む任意選択の第 3 の I g G 1 F c ドメイン単量体と
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、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸修飾を含む、ポリペプチド。

【請求項135】

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびCH1ドメインをさらに含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項136】

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体のアミノ末端にscFvをさらに含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項137】

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表6中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、前記第2のIgG1 Fcドメイン単量体が、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項138】

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体が、表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2のIgG1 Fcドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項139】

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体および前記第2のIgG定常ドメイン単量体の両方が、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項140】

第3のリンカーと、第3のIgG1 Fcドメイン単量体と、を含み、

前記第1のIgG1 Fcドメイン単量体、前記第2のIgG1 Fcドメイン単量体、および前記第3のIgG1 Fcドメイン単量体が各々、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項141】

第3のリンカーと、第3のIgG1 Fcドメイン単量体と、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、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第3のIgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項142】

第3のリンカーと、第3のIgG1 Fcドメイン単量体と、を含み、

前記第1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、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2のIgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、請求項134に記載のポリペプチド。

【請求項143】

第3のリンカーと、第3のIgG1 Fcドメイン単量体と、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、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第1のIgG1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセ

【請求項 144】

【請求項 1 4 5】

【請求項 1 4 6】

【請求項 147】

【請求項 148】

【請求項 149】

【請求項 150】

【請求項 1 5 1】

【請求項 1 5 2】

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、I

2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択される、請求項 1 5 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 3】

I 2 5 3 位の各アミノ酸変異が、I 2 5 3 A である、請求項 1 5 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 4】

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つが、E U の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 5】

E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択される、請求項 1 5 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 6】

R 2 9 2 位の各アミノ酸変異が、R 2 9 2 P である、請求項 1 5 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 7】

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 6) および D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) 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 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 8】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有する、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 1】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 2】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 5】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の

置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 6】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 7】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 8】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6 9】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 0】

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 3 ドメインが独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含む、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 1】

前記単一アミノ酸置換が、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択される、請求項 1 2 2 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7 2】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 122～145 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 173】

前記単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、前記 C H 3 ドメイン内の逆電荷変異である、請求項 99 に記載のポリペプチド。

【請求項 174】

前記単一アミノ酸置換が、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にある、請求項 173 に記載のポリペプチド。

【請求項 175】

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 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、および T 3 9 4 F からなる群から選択される、請求項 122～145 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 176】

前記 2 つまたは 4 つの逆電荷変異が、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R から選択される、請求項 122～145 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 178】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列のセットを含む、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 179】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 180】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、前記 V H 配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 の配列を除き、表 2 に記載の抗体の V H 配列と少なくとも 95 % または 98 % 同一である、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 181】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の V H 配列を含む、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 182】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 配列のセットを含む、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 183】

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表 2 に記載の抗体の V H 配列および V L 配列のセット由来の C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 配列を含む、請求項 123、124、135、および 136 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 184】

前記 V H ドメインまたは s c F v メインが、表 2 に記載の抗体の V H 配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V H ドメインと、表 2 に記載の抗体の V L 配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V L ドメインと、を含み、前記 V H ドメイン配列および前記 V L ドメイン配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H

2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を除き、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列と少なくとも95%または98%同一である、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項185】

前記VHドメインまたはscFvが、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列のセットを含む、請求項123、124、135、および136のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項186】

IgG CL抗体定常ドメインと、IgG CH1抗体定常ドメインと、をさらに含む、請求項122～145のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項187】

請求項2～187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188】

請求項187に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項189】

請求項187に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項190】

請求項188に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項191】

請求項189または請求項190に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現させる条件下で培養することを含む、請求項2～187のいずれか一項に記載のポリペプチドを産生する方法。

【請求項192】

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189に記載の宿主細胞。

【請求項193】

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190に記載の宿主細胞。

【請求項194】

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189に記載の宿主細胞。

【請求項195】

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190に記載の宿主細胞。

【請求項196】

10個以下の単一アミノ酸修飾を有する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189に記載の宿主細胞。

【請求項197】

10個以下の単一アミノ酸修飾を有する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190に記載の宿主細胞。

【請求項199】

前記IgG1 Fcドメイン単量体が、前記CH3ドメイン内に10、8、6、または4つ以下の単一アミノ酸修飾を有する配列番号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196または197に記載の宿主細胞。

【請求項200】

請求項2～186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201】

前記ポリペプチドの40%、30%、20%、10%、5%、2%未満が、Fcドメイン単量体上に少なくとも1つのフコース修飾を有する、請求項200に記載の薬学的組成物。

【請求項 202】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、請求項 1 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 203】

前記単一 F c ドメイン構築体が抗体である、請求項 1 または 202 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 204】

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、組成物。

【請求項 205】

前記 C T L A 4 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 のポリペプチドもしくは前記第 3 のポリペプチドに結合されるか、または前記第 2 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る、請求項 204 に記載の組成物。

【請求項 206】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 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る、請求項 204 に記載の組成物。

【請求項 207】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 208】

前記生物活性が、F c 受容体媒介性エフェクター機能である、請求項 207 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 209】

前記 F c 受容体媒介性エフェクター機能が、A D C C および A D C P および／または C D C 活性である、請求項 208 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 210】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合するスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 211】

前記 C T L A 4 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 のポリペプチドもしくは前記第 3 のポリペプチドに結合されるか、または前記第 2 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る、請求項 202、207、または 210 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 212】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 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る、請求項 202、207、または 210 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 213】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、F a b である、請求項 1 および 202～212 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 214】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1、第 2、または第 3 のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、請求項 202～212 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、s c F vである、請求項 2 1 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 6】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V_Hドメインおよび C_H 1 ドメインを含み、前記 V_Hドメインおよび C_H 1 ドメインが、前記第 1、第 2、または第 3 のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、請求項 2 0 2 ～ 2 1 2 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 7】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 8】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、前記 V_Lドメインを含む第 4 のポリペプチドを含む、請求項 2 1 7 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 1 9】

前記 V_Hドメインが、表 1 に記載の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列のセットを含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 0】

前記 V_Hドメインが、表 2 に記載の抗体の配列を含む V_Hドメインの C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 1】

前記 V_Hドメインが、表 2 に記載の抗体の V_H配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む、前記 V_H配列が、前記 C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 配列を除き、表 2 に記載の抗体の V_H配列と少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 2】

前記 V_Hドメインが、表 2 に記載の抗体の V_H配列を含む、請求項 2 1 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 3】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 1 に記載される C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列のセットを含む、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 4】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H配列および V_L配列のセットからの C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を含む、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 5】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H配列の C D R－H 1、C D R－H 2、および C D R－H 3 を含む V_Hドメイン、ならびに表 2 に記載される抗体の V_L配列の C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 を含む V_Lドメインを含み、前記 V_Hドメイン配列および V_Lドメイン配列が、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、および C D R－L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V_H配列および V_L配列に対し、少なくとも 9 5 % 同一である、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 6】

前記 C T L A 4 結合ドメインが、表 2 に記載される抗体の V_H配列および V_L配列のセットを含む、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 7】

I g G C_L 抗体定常ドメインおよび I g G C_H 1 抗体定常ドメインをさらに含み、前記 I g G C_H 1 抗体定常ドメインが、リンカーを介して前記第 1 のポリペプチドまたは前記第 2 のポリペプチドの N 末端に結合している、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 1 2 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 2 0 2 ～ 2 2 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 2 9】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 2 0 2 ～ 2 2 8 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 0】

前記第 2 のポリペプチドおよび前記第 3 のポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、請求項 2 0 2 ～ 2 2 8 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 1】

前記二量体形成選択性モジュールが、前記 F c ドメイン単量体の一方の前記 C_H 3 ドメイン内に改変された空洞と、前記 F c ドメイン単量体の他方の前記 C_H 3 ドメイン内に改変された突起と、を含み、前記改変された空洞および前記改変された突起が、F c ドメイン単量体の空洞内突起対 (p r o t u b e r a n c e - i n t o - c a v i t y p a i r) を形成するように配置されている、請求項 2 2 8 または 2 2 9 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 2】

前記改変された突起が、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W、T 3 6 6 Y、T 3 9 4 W、T 3 9 4 F、および F 4 0 5 W からなる群から選択される少なくとも 1 つの修飾を含み、前記改変された空洞が、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V、Y 4 0 7 T、Y 4 0 7 A、F 4 0 5 A、および T 3 9 4 S からなる群から選択される少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 2 3 1 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 3】

前記 F c ドメイン単量体の一方が Y 4 0 7 V および Y 3 4 9 C を含み、前記 F c ドメイン単量体の他方が T 3 6 6 W および S 3 5 4 C を含む、請求項 2 2 8 または 2 2 9 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 4】

前記二量体形成選択性モジュールが、前記ドメイン単量体の一方の前記 C_H 3 ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、前記 F c ドメイン単量体の他方の前記 C_H 3 ドメイン内に正に荷電したアミノ酸と、を含み、前記負に荷電したアミノ酸および前記正に荷電したアミノ酸が、F c ドメインの形成を促進するように配置されている、請求項 2 2 8 または 2 2 9 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 5】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 9 9 K と、K 4 0 9 D または K 4 0 9 E のいずれかとを含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 6】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、K 3 9 2 D および D 3 9 9 K を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 7】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7

KおよびK 3 7 0 Eを含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 5 6 K および K 4 3 9 D を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 3 9】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、K 3 9 2 E および D 3 9 9 K を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 0】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7 K および K 3 7 0 D を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 1】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、D 3 5 6 K および K 4 3 9 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 2】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W を含み、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 3】

前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、S 3 5 4 C および T 3 6 6 W を含み、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 4】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、E 3 5 7 K または E 3 5 7 R を含み、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、K 3 7 0 D または K 3 7 0 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 5】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、K 3 7 0 D または K 3 7 0 E を含み、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、E 3 5 7 K または E 3 5 7 R を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 6】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が各々、K 4 0 9 D または K 4 0 9 E を含み、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、D 3 9 9 K または D 3 9 9 R を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 7】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、D 3 9 9 K または D 3 9 9 R を含み、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドが各々、K 4 0 9 D または K 4 0 9 E を含む、請求項 2 3 4 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 8】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体中の 1 つ以上のリンカーが、結合である、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 4 9】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体中の 1 つ以上のリンカーが、スペーサーである、請求項 1 および 2 0 2 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 5 0】

前記スペーサーが、配列

【請求項 260】

R 2 9 2 位の各アミノ酸修飾が独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、およびR 2 9 2 Yからなる群から選択される、請求項 2 5 9 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 1】

R 2 9 2 位の各アミノ酸修飾が、R 2 9 2 Pである、請求項 2 6 0 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 2】

前記 F c ドメイン単量体のうちの 1 つ以上が、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H 2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H 3 抗体定常ドメインを含む、請求項 1 および 2 0 2 ~ 2 6 1 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 3】

前記 F c ドメイン単量体が各々、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H 2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H 3 抗体定常ドメインを含む、請求項 2 6 2 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 4】

前記 I g G が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、および I g G 4 からなる群から選択されるサブタイプのものである、請求項 2 6 2 または 2 6 3 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 5】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドの各々内の N 末端 A s p が、G l n に変異している、請求項 1 および 2 0 2 ~ 2 6 4 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 6】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドのうちの 1 つ以上が、C 末端リシンを欠く、請求項 1 および 2 0 2 ~ 2 6 5 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 7】

前記第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチドが各々、C 末端リシンを欠く、請求項 2 6 6 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 8】

リンカーによって前記ポリペプチドのうちの 1 つ以上の N 末端または C 末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む、請求項 1 および 2 0 2 ~ 2 6 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 2 6 9】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 5 0 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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、前記第 2 のポリペプチド、または前記第 3 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて第 2 の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項 270】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 75 % が、前記第 1 の F c ドメイン、前記第 2 の F c ドメイン、および前記 C T L A 4 結合ドメインを含む、請求項 269 に記載の細胞培養培地。

【請求項 271】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 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り、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも 0.1 mg / L の濃度で前記培養培地中に存在する、細胞培養培地。

【請求項 272】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 75 % が構造的に同一である、請求項 271 に記載の細胞培養培地。

【請求項 273】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも 10 mg / L の濃度で前記培養培地中に存在する、請求項 269 ~ 272 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 274】

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも 100 mg / L の濃度で前記培養培地中に存在する、請求項 269 ~ 273 のいずれか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 275】

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

(3) 第 4 の F c 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ことであって、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記 C T L A 4 結合ドメインが、前記第 1 のポリペプチド、第 2 のポリペプチド、または第 3 のポリペプチドに結合され、それにより F c 抗原結合ドメイン構築体を形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

【請求項 276】

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

iii) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインとを含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

【請求項277】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項276に記載の組成物。

【請求項278】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、E357KおよびK370Dを含み、前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、K370DおよびE357Kを含む、請求項277に記載の組成物。

【請求項279】

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

【請求項280】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項279に記載の組成物。

【請求項281】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、E357KおよびK370Dを含み、前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、K370DおよびE357Kを含む、請求項280に記載の組成物。

【請求項 282】

Fc 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成する、組成物。

【請求項 283】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、

前記第2のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、

前記第4のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第4のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項282に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 284】

Fc 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成する、組成物。

【請求項285】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項284に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項286】

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、前記第3のF

cドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさって第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体が組み合わさって第5のFcドメインを形成する、組成物。

【請求項287】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1のFcドメイン単量体および前記第7のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第4のFcドメイン単量体および前記第8のFcドメイン単量体が各々、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が各々、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項286に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項288】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインとを含む、

前記第1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1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTL A4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項289】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと
を含み、

前記第1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1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項290】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
ii) 第2のFcドメイン単量体、および
iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する
スパーサー

を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと
を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項291】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
ii) 第2のFcドメイン単量体、および
iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと
を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

【請求項292】

Fc 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

(3) 第4のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

(4) 前記第1のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

(5) 前記第2のポリペプチドおよび／または第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第1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CTLA4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

【請求項293】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項288、289、290、291、または292に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項294】

Fc 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1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1、第2、および第3の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよ

び前記 C T L A 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 295】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1、第 2、および第 3 の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 296】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合するスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 3 の F c ドメイン単量体を含む第 2 のポリペプチドと、

c) 第 4 の F c 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 のポリペプチドに結合された第 1 の抗原結合ドメインと、

e) 前記第 2 のポリペプチドに結合された第 2 の抗原結合ドメインと、

f) 前記第 3 のポリペプチドに結合された第 3 の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の抗原結合ドメイン、前記第 2 の抗原結合ドメイン、および前記第 3 の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 297】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

- b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
- c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
- e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、
- f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

【請求項298】

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

- a) (1) 第1のポリペプチドであって、

- i) 第1のFcドメイン単量体、

- i i) 第2のFcドメイン単量体、および

- i i i) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

- (2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

- (3) 第4のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

- (4) 前記第1のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

- (5) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

- (6) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第1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CTL A4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

【請求項299】

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、請求項294、295、296、297、または298に記載の組成物。

【請求項300】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

- a) 第1のポリペプチドであって、

- i) 第1のFcドメイン単量体、

- i i) 第2のFcドメイン単量体、および

- i i i) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3のFcドメイン単量体、
 v) 第4のFcドメイン単量体、および
 v i) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、

前記第1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4のFcドメイン単量体および前記第6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Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTLA4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項301】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、
 a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 i i) 第2のFcドメイン単量体、および
 i i i) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3のFcドメイン単量体、
 v) 第4のFcドメイン単量体、および
 v i) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、

前記第1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4のFcドメイン単量体および前記第6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Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項302】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、
 a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 i i) 第2のFcドメイン単量体、および
 i i i) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する

第 1 のスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第

2 のスパーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 303】

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも 50 % が、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する

第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第

2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項 304】

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する

第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

(3) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

(4) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

(5) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

【請求項 305】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が各々、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項 300、301、302、303、または 304 に記載の F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 306】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 3 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイにおいて、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 307】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のリンカー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のリンカー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、または前記第 4 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第 3 の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 308】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のスパーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i v) 第 3 の F c ドメイン単量体、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のスパーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、ま

たは前記第４のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第２のFcドメイン単量体と前記第４のFcドメイン単量体が組み合わさって第１のFcドメインを形成し、前記第１のFcドメイン単量体と前記第５のFcドメイン単量体が組み合わさって第２のFcドメインを形成し、前記第３のFcドメイン単量体と前記第６のFcドメイン単量体が組み合わさって第３のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項３０９】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第１のポリペプチドであって、

i) 第１のFcドメイン単量体、

ii) 第２のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第１のFcドメイン単量体と前記第２のFcドメイン単量体を結合する第１のリンカー

を含む、第１のポリペプチドと、

b) 第２のポリペプチドであって、

iv) 第３のFcドメイン単量体、

v) 第４のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第３のFcドメイン単量体と前記第４のFcドメイン単量体を結合する第２のリンカー

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６のFcドメイン単量体を含む第４のポリペプチドと、

e) 前記第１のポリペプチド、前記第２のポリペプチド、前記第３のポリペプチド、または前記第４のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含み、

前記第２のFcドメイン単量体と前記第４のFcドメイン単量体が組み合わさって第１のFcドメインを形成し、前記第１のFcドメイン単量体と前記第５のFcドメイン単量体が組み合わさって第２のFcドメインを形成し、前記第３のFcドメイン単量体と前記第６のFcドメイン単量体が組み合わさって第３のFcドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項３１０】

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (１) 第１のポリペプチドであって、

i) 第１のFcドメイン単量体、

ii) 第２のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第１のFcドメイン単量体と前記第２のFcドメイン単量体を結合する第１のリンカー

を含む、第１のポリペプチドと、

(２) 第２のポリペプチドであって、

iv) 第３のFcドメイン単量体、

v) 第４のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第３のFcドメイン単量体と前記第４のFcドメイン単量体を結合する第２のリンカー

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) 第６のFcドメイン単量体を含む第４のポリペプチドと、

(５) 前記第１のポリペプチド、前記第２のポリペプチド、前記第３のポリペプチド、または前記第４のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、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、培養することと、

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ことを含む、方法。

【請求項311】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1のFcドメイン単量体および前記第5のFcドメイン単量体が各々、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、請求項306、307、308、309、または310に記載のFc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項312】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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って、第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わされて、第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTLA4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項313】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わされて、第4のFcドメインを形成し、前記第6の単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項314】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、
 i i i) 第3のFcドメイン単量体、
 i v) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および
 v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー
 を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 v i) 第4のFcドメイン単量体、
 v i i) 第5のFcドメイン単量体、
 v i i i) 第6のFcドメイン単量体、
 i x) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および
 x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のスペーサー
 を含む、第2のポリペプチドと、
 c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
 f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、
 g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含む、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさって第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体が組み合わさって第5のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項315】

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 i i) 第2のFcドメイン単量体、
 i i i) 第3のFcドメイン単量体、
 i v) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および
 v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー
 を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 v i) 第4のFcドメイン単量体、
 v i i) 第5のFcドメイン単量体、
 v i i i) 第6のFcドメイン単量体、
 i x) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および
 x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4

のスペーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 9 の F c ドメイン単量体を含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 10 の F c ドメイン単量体を含む第 6 のポリペプチドと、

g) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、前記第 4 のポリペプチド、前記第 5 のポリペプチド、または前記第 6 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 4 の F c ドメインを形成し、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 5 の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

【請求項 316】

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 2 の F c ドメイン単量体を結合する第 1 のスペーサー、および

v) 前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体を結合する第 2 のスペーサー

を含む、第 1 のポリペプチドと、

(2) 第 2 のポリペプチドであって、

v i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

v i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、

v i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、

i x) 前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体を結合する第 3 のスペーサー、および

x) 前記第 5 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体を結合する第 4 のスペーサー

を含む、第 2 のポリペプチドと、

(3) 第 7 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

(4) 第 8 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

(5) 第 9 の F c ドメイン単量体を含む第 5 のポリペプチドと、

(6) 第 10 の F c ドメイン単量体を含む第 6 のポリペプチドと、

(7) 前記第 1 のポリペプチド、前記第 2 のポリペプチド、前記第 3 のポリペプチド、前記第 4 のポリペプチド、前記第 5 のポリペプチド、または前記第 6 のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 1 の F c ドメインを形成し、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 2 の F c ドメインを形成し、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 3 の F c ドメインを形成し、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 4 の F c ドメイン

を形成し、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体が組み合わさって第 5 の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

【請求項 317】

先行する請求項のいずれか一項に記載の F c 抗原結合構築体を投与することを含む、癌を治療するための方法であって、

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、頭頸部癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、中皮腫、尿路上皮癌、尿路上皮癌、膠芽腫、卵巣癌、前立腺癌、高グレードの中枢神経系悪性腫瘍、肝臓癌、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫からなる群から選択される、方法。

【請求項 318】

先行する請求項のいずれか一項に記載の F c 抗原結合構築体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 319】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 2 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第 1 および第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

ii) 第 4 の F c ドメイン単量体、

iii) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 前記第 3 および第 4 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 第 5 の F c ドメイン単量体を含む第 3 のポリペプチドと、

d) 第 6 の F c ドメイン単量体を含む第 4 のポリペプチドと、

e) 第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 5 のポリペプチドと、

f) 第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインを含む第 6 のポリペプチドと

を含み、

第 1 および第 3 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 1 の F c ドメインを形成し、第 2 および第 5 の F c ドメイン単量体と一緒に、第 2 の F c ドメインを形成し、第 4 および第 6 の F c 単量体と一緒に、第 3 の F c ドメインを形成し、第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 1 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 1 の F a b を形成し、第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメインおよび第 2 の C T L A-4 軽鎖結合ドメインは一緒になって、第 2 の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 320】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 319 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 321】

前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 319 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 322】

前記第 5 のポリペプチドおよび前記第 6 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 319 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 323】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 5 のポリペプチドおよび前記第 6 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3 1 9 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 2 4】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 1 9 ～ 3 2 3 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 2 5】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 1 9 ～ 3 2 3 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 2 6】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 3 1 9 ～ 3 2 3 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 2 7】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 3 2 4 ～ 3 2 6 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 3 2 8】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 3 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 3 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 1 9 ～ 3 2 3 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 2 9】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 1 9 ～ 3 2 3 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 0】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 3 2 8 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 1】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 3 2 9 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 2】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 1 の C T L A - 4 重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第 1 および第 2 の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第 1 のポリペプチド、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第2のポリペプチド、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドとを含み、

第1および第3のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第5のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第4および第6のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項333】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、

i i i) 第1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

i i) 第4のFcドメイン単量体、

i i i) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと

を含み、

第1および第5のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項334】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項333に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項335】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項333に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項336】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項333に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項337】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3

のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 5 のポリペプチドおよび前記第 6 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 3 3 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 8】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 3 9】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 0】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 1】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 3 4 2】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 3】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 3 3 3 ～ 3 3 7 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 4】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 3 4 2 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 5】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 3 4 3 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 3 4 6】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 1 の C T L A - 4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、
ii) 第5のFcドメイン単量体、
iii) 第6のFcドメイン単量体、
iv) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、
v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、
c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、
g) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、
h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含む、

第1および第7のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第4および第8のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第5のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体と一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体と一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項347】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項348】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項349】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項350】

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項351】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項346に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項352】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項346～351のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項353】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項346～351のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項354】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 346～351 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 355】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 346～351 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 356】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 346～351 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 357】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 7 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 7 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 4 の F c ドメイン単量体および前記第 8 の F c ドメイン単量体が、前記第 4 の F c ドメイン単量体と前記第 8 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 9 の F c ドメイン単量体が、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 9 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 6 の F c ドメイン単量体および前記第 10 の F c ドメイン単量体が、前記第 6 の F c ドメイン単量体と前記第 10 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 346～351 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 358】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 357 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 359】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表 3 中の置換から選択される、請求項 358 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 360】

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第 1 のポリペプチドであって、

i) 第 1 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 2 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 3 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 1 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 1 の F c ドメイン単量体と第 2 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第 2 の F c ドメイン単量体と第 3 の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

i) 第 4 の F c ドメイン単量体、

i i) 第 5 の F c ドメイン単量体、

i i i) 第 6 の F c ドメイン単量体、

i v) 第 2 の C T L A-4 重鎖結合ドメイン、

v) 第 4 の F c ドメイン単量体と第 5 の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、
 c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 第9のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、
 f) 第10のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと
 を含み、

第1および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第4および第8のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第5のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項361】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1のFcドメイン単量体、
 i i) 第2のFcドメイン単量体、
 i i i) 第3のFcドメイン単量体、
 i v) 第1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、
 v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、
 i) 第4のFcドメイン単量体、
 i i) 第5のFcドメイン単量体、
 i i i) 第6のFcドメイン単量体、
 i v) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、
 v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
 f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、
 g) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、
 h) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドと
 を含み、

第1および第4のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第5および第8のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重

鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインと一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項362】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項363】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項364】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項365】

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項366】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、請求項361に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項367】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項368】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項369】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項370】

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン単量体。

【請求項371】

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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項372】

前記第2のFcドメイン単量体および前記第7のFcドメイン単量体が、前記第2のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第5のFcドメイン単量体および前記第8のFcドメイン単量体が、前記第5のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、

2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項361～366のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項373】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、請求項371に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項374】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、請求項372に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項375】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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CTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

ii) 第5のFcドメイン単量体、

iii) 第6のFcドメイン単量体、

iv) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含む、

第1および第4のFcドメイン単量体と一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第7のFcドメイン単量体と一緒に、第2のFcドメインを形成し、第5および第8のFc単量体と一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体と一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体と一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項376】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

- i i) 第2のFcドメイン単量体、
 - i i i) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、
 - b) 第2のポリペプチドであって、
 - i) 第3のFcドメイン単量体、
 - i i) 第4のFcドメイン単量体、
 - i i i) 第3のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、
 - c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、
 - d) 第6のFcドメイン単量体第2のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、
 - e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、
 - f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと
- を含み、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFcドメイン単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

【請求項377】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項378】

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項379】

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項380】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、請求項202に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項381】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項382】

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項383】

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項384】

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、請求項376～380の

いずれか一項に記載のFc抗原ドメイン単量体。

【請求項385】

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項386】

前記第1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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、請求項376～380のいずれか一項に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項387】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、請求項385に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項388】

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、請求項386に記載のFc抗原ドメイン構築体。

【請求項389】

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

ii) 第4のFcドメイン単量体、

iii) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

iv) 第3のFcドメイン単量体と第4のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5のFcドメイン単量体および第3のCTLA-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体および第4のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

e) 第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと、

g) 第3のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第4のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドと

を含み、

第1および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第3および第6のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第4のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第3のCTLA-4重鎖結合ドメインは一緒に、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第4のCTLA-4重鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成し、第3のCTLA-4軽鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4重鎖結合ドメインは一緒になって、第3のFabを形成し、第4のCTLA-4軽鎖結合

ドメインおよび第 2 の C T L A－4 軽鎖結合ドメインと一緒に、第 2 の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

【請求項 390】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 389 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 391】

前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 389 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 392】

前記第 5 のポリペプチド、前記第 6 のポリペプチド、前記第 7 のポリペプチド、および前記第 8 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 389 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 393】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 3 のポリペプチドおよび前記第 4 のポリペプチドの配列が同一であり、前記第 5 のポリペプチド、前記第 6 のポリペプチド、前記第 7 のポリペプチド、および前記第 8 のポリペプチドの配列が同一である、請求項 389 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 394】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 395】

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 396】

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大 10、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を有する配列番号 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 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 397】

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、請求項 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン単量体。

【請求項 398】

前記第 2 の F c ドメイン単量体および前記第 4 の F c ドメイン単量体が、前記第 2 の F c ドメイン単量体と前記第 4 の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 399】

前記第 1 の F c ドメイン単量体および前記第 5 の F c ドメイン単量体が、前記第 1 の F c ドメイン単量体と前記第 5 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含み、前記第 3 の F c ドメイン単量体および前記第 6 の F c ドメイン単量体が、前記第 3 の F c ドメイン単量体と前記第 6 の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大 8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの単一アミノ酸置換を含む、請求項 389～393 のいずれか一項に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 400】

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表 4 A および表 4 B 中の置換から選択される、請求項 398 に記載の F c 抗原ドメイン構築体。

【請求項 401】

【請求項 402】

【請求項 403】

【請求項 404】

【請求項 405】

【請求項 406】

【請求項 405】

【請求項 405】

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

本開示の第4、第5、第6、および第7の態様の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つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号23), GGGGS (配列番号1), GSGS (配列番号2), SGGG (配列番号3), GSGS (配列番号4), GSGSGS (配列番号5), GSGSGSGS (配列番号6), GSGSGSGSGS (配列番号7), GSGSGSGSGSGS (配列番号8), GSGSGS (配列番号9), GSGSGSGGS (配列番号10), GSGSGSGSGSGS (配列番号11), GSGS (配列番号2), GSGS (配列番号2), GSGGGSGS (配列番号12),

GSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (配列番号219), GENLYFQSGG (配列番号28), SACYCELS (配列番号29), RSIAT (配列番号30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号33),

GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (配列番号34),

GGGSGGGSGGGGS (配列番号35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号18),

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号36), GGGG (配列番号19), GGGGGGGG (配列番号20), GGGGGGGGGGGGGG (配列番号21), または GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号22)

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、グリシンスペーサー、例えば、4～30 (配列番号220)、8～30 (配列番号221)、または12

～30個 (配列番号222) のグリシン残基からなるスペーサー、例えば、20個のグリシン残基 (配列番号23) からなるスペーサーである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

本開示の第9および第10の態様の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つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS (配列番号 9), GGS (配列番号 10), GGS (配列番号 11), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 12), GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33), GGS (配列番号 34), GGS (配列番号 35), SGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18), GGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), または GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサーは、グリシンスパーサー、例えば、4～30 (配列番号 220)、8～30 (配列番号 221)、または12～30個 (配列番号 222) のグリシン残基からなるスパーサー、例えば、20個のグリシン残基 (配列番号 23) からなるスパーサーである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

本開示の第11および第12の態様の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つ以上のリンカーは、スパーサーである。いくつかの実施形態では、スパーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS (配列番号 9), GGS (配列番号 10), GGS (配列番号 11), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 2), GGS (配列番号 12), GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33), GGS (配列番号 34), GGS (配列番号 35), SGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18), GGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), または GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサーは、グリシンスパーサー、例えば、4～30 (配列番号 220)、8～30 (配列番号 221)、または12～30個 (配列番号 222) のグリシン残基からなるスパーサー、例えば、20個のグリシン残基 (配列番号 23) からなるスパーサーである。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

本開示の第13、第14、および第15の態様の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つ以上のリンカーは、スペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GSGG (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS GGS (配列番号 9), GGS GGS GGS (配列番号 10), GGS GGS GGS GGS (配列番号 11), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS GGS (配列番号 12), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 34), GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18), GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), または GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、グリシンスペーサー、例えば、4～30 (配列番号 220)、8～30 (配列番号 221)、または12～30個 (配列番号 222) のグリシン残基からなるスペーサー、例えば、20個のグリシン残基 (配列番号 23) からなるスペーサーである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

第41の態様の様々な実施形態では、改変された突起を形成する変異を含むIgG1 Fcドメイン単量体は、1、2、または3つの逆電荷変異をさらに含み、改変された突起を形成する変異および逆電荷変異は、CH3ドメイン内にあり、これらの変異は、EUのG341位～EUのK447位（両端を含む）の配列内にあり、これらの変異は、単一アミノ酸変化であり、第2のリンカーおよび任意選択の第3のリンカーは、

(配列番号 229) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、単一アミノ酸置換は、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、および D356R からなる群から選択され、Fc ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、CH3 ドメイン内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り、単一アミノ酸置換は、EU の G341 位～EU の K447 位（両端を含む）の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T、および T394F からなる群から選択され、2 つまたは 4 つの逆電荷変異は、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、および D356R から選択され；CTLA4 結合ドメインは、scFv であり；CTLA4 結合ドメインは、VH ドメインおよび CH1 ドメインを含み；CTLA4 結合ドメインは、VL ドメインをさらに含み；VH ドメインは、表 1 に記載される CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 のセットを含み；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 を含み；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、少なくとも 95% または 98% 同一であり；VH ドメインは、表 2 に記載される抗体の VH 配列を含み；CTLA4 結合ドメインは、表 1 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み；CTLA4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の VH 配列と 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 の配列を含み；CTLA4 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 ドメインと、表 2 に記載される抗体の VL 配列の CDR-L1、CDR

ーL2、およびCDR-L3を含むVLドメインとを含み、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、少なくとも95%または98%同一であり；CTLA4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配列のセットを含み；CTLA4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み；CTLA4結合ドメインは、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。

【手続補正7】

【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】

第42の態様の様々な実施形態では、CTLA4結合ドメインは、抗体重鎖可変ドメインを含み；CTLA4結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインを含み；第1のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；第1のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体は、表4aおよび4bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み；第1のIgG1Fcドメイン単量体および第2のIgG定常ドメイン単量体の両方は、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体、第2のIgG1Fcドメイン単量体、および第3のIgG1Fcドメイン単量体はそれぞれ、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体および第2のIgG1Fcドメイン単量体の両方はそれぞれ、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第3のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体および第3のIgG1Fcドメイン単量体の両方はそれぞれ、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第2のIgG1ドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み；ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体および第3のIgG1Fcドメイン単量体の両方はそれぞれ、表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第1のIgG1ドメイン単量体は、表4Aおよび4Bのものから選択される2つの逆電荷変異のセットまたは表4Aおよび4Bのものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み；表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含むIgG1Fcドメイン単量体は、同一のCH3ドメインを有し；表4Aおよび4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異は、CH3ドメイン内にあり；変異は、EUのG341位～EUのK447位（両端を含む）の配列内にあり；変異はそれぞれ、単一アミノ酸変化であり；変異は、EUのG341位～EUのK446位（両端を含む）の配列内にあり；変異は、単一アミノ酸変化であり；第2のリンカーおよ

び任意選択の第3のリンカーは、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GSGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GSGSGS (配列番号 9), GSGSGSGGS (配列番号 10), GSGSGSGSGSGS (配列番号 11), GSGS (配列番号 2), GSGS (配列番号 2), GSGGGSG (配列番号 12),

GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33),

GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (配列番号 34),

GGGSGGGSGGGGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18),

GGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), および GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、第2のリンカーおよび任意選択の第3のリンカーは、グリシンスパーサーであり、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 (配列番号 220)、4～20 (配列番号 223)、8～30 (配列番号 221)、8～20 (配列番号 224)、12～20 (配列番号 225)、または12～30個 (配列番号 222)のグリシン残基からなり、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 (配列番号 23)からなり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つは、EUのI253位に単一アミノ酸変異を含み、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、I253位の各アミノ酸変異は、I253Aであり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つは、EUのR292位に単一アミノ酸変異を含み、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、R292位の各アミノ酸変異は、R292Pであり、各Fcドメイン単量体は独立して、EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 226)およびDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 227)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、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 (配列番号 227)を有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 228)を有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 228)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 (配列番号 227)を有し、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは独立して、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229)を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229)を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、単一アミノ酸置換は、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、および D356R からなる群から選択され、Fc ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 42、43、45、および 47 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、CH3 ドメイン内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り、単一アミノ酸置換は、EU の G341 位～EU の K447 位（両端を含む）の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T、および T394F からなる群から選択され、2 つまたは 4 つの逆電荷変異は、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、および D356R から選択され；CTLA4 結合ドメインは、scFv であり；CTLA4 結合ドメインは、VH ドメインおよび CH1 ドメインを含み；CTLA4 結合ドメインは、VL ドメインをさらに含み；VH ドメインは、表 1 に記載される CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 のセットを含み；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 を含み；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、少なくとも 95% または 98% 同一であり；VH ドメインは、表 2 に記載される抗体の VH 配列を含み；CTLA4 結合ドメインは、表 1 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み；CTLA4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の VH 配列と 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 の配列を含み；CTLA4 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 ドメインと、表 2 に記載される抗体の VL 配列の CDR-L1、CDR

ー L 2、および C D Rー L 3 を含む V L ドメインとを含み、V H ドメイン配列および V L ドメイン配列は、C D Rー H 1、C D Rー H 2、C D Rー H 3、C D Rー L 1、C D Rー L 2、および C D Rー L 3 の配列を除き、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも 9 5 % または 9 8 % 同一であり；C T L A 4 結合ドメインは、表 2 に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含み；C T L A 4 結合ドメインは、I g Gー C L 抗体定常ドメインおよび I g Gー C H 1 抗体定常ドメインを含み；C T L A 4 結合ドメインは、V H ドメインおよび C H 1 ドメインを含み、V L ドメインおよび C L ドメインを含むポリペプチドに結合して、F a b を形成することができる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 4】

第 4 3 の態様の様々な実施形態では、改変された突起を形成する変異を含む I g G 1 F c ドメイン単量体は、1、2、または 3 つの逆電荷変異をさらに含み、改変された突起を形成する変異および逆電荷変異は、C H 3 ドメイン内にあり、変異は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位（両端を含む）の配列内にあり、変異は、単一アミノ酸変化であり、第 2 のリンカーおよび任意選択の第 3 のリンカーは、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GGSG (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GSGSGS (配列番号 9), GSGSGSGS (配列番号 10), GSGSGSGSGSGS (配列番号 11), GGSG (配列番号 2), GGSG (配列番号 2), GSGGGSG (配列番号 12),

GSGGGSGSGSGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS (配列番号 32),

AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33),

GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (配列番号 34),

GGGSGGGSGGGGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18),

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGGGG (配列番号 21), および GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、第 2 のリンカーおよび任意選択の第 3 のリンカーは、グリシンスパーサーであり、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 (配列番号 220)、4～20 (配列番号 223)、8～30 (配列番号 221)、8～20 (配列番号 224)、12～20 (配列番号 225)、または 12～30 個 (配列番号 222) のグリシン残基からなり、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 (配列番号 23) からなり、F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つは、E U の I 2 5 3 位に単一アミノ酸変異を含み、E U の I 2 5 3 位の各アミノ酸変異は独立して、I 2 5 3 A、I 2 5 3 C、I 2 5 3 D、I 2 5 3 E、I 2 5 3 F、I 2 5 3 G、I 2 5 3 H、I 2 5 3 I、I 2 5 3 K、I 2 5 3 L、I 2 5 3 M、I 2 5 3 N、I 2 5 3 P、I 2 5 3 Q、I 2 5 3 R、I 2 5 3 S、I 2 5 3 T、I 2 5 3 V、I 2 5 3 W、および I 2 5 3 Y からなる群から選択され、I 2 5 3 位の各アミノ酸変異は、I 2 5 3 A であり、F c ドメイン単量体のうちの少なくとも 1 つは、E U の R 2 9 2 位に単一アミノ酸変異を含み、E U の R 2 9 2 位の各アミノ酸変異は独立して、R 2 9 2 D、R 2 9 2 E、R 2 9 2 L、R 2 9 2 P、R 2 9 2 Q、R 2 9 2 R、R 2 9 2 T、および R 2 9 2 Y からなる群から選択され、R 2 9 2 位の各アミノ酸変異は、R 2 9 2 P であり、各 F c ドメイン単量体は独立して、E P K S

C D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 6) および D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、第 2 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有し、第 1 の F c ドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有し、第 1 の F c ドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L (配列番号 2 2 8) を有し、第 2 の F c ドメイン単量体および第 3 の F c ドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L (配列番号 2 2 7) を有し、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは独立して、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、2 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 2 2 9) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含み、各 F c ドメイン単量体の C H 3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 2 3 0) を含み、単一アミノ酸置換は、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、F 4 0 5 A、Y 4 0 7 A、S 3 5 4 C、Y 3 4 9 T、T 3 9 4 F、K 4 0 9 D、K 4 0 9 E、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 3 7 0 D、K 3 7 0 E、D 3 9 9 K、D 3 9 9 R、E 3 5 7 K、E 3 5 7 R、D 3 5 6 K、および D 3 5 6 R からなる群から選択され、F c ドメイン単量体は各々独立して、最大 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 4 2、4 3、4 5、および 4 7 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み、単一アミノ酸置換のうちの最大 6 つが、C H 3 ドメイン内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り、単一アミノ酸置換は、E U の G 3 4 1 位～E U の K 4 4 7 位 (両端を含む) の配列内にあり、改変された突起を形成する変異のうちの少なくとも 1 つが、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 W、T 3 9 4 W、T 3 9 4 Y、F 4 0 5 W、S 3

54C、Y349T、およびT394Fからなる群から選択され、2つまたは4つの逆電荷変異は、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、およびD356Rから選択される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0136】

第44の態様の様々な実施形態では、ポリペプチドは、第1のIgG1Fcドメイン単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびCH1ドメインまたは第1のIgG1Fcドメイン単量体のアミノ末端にscFvをさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4Aおよび表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体は、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体は、表4aおよび表4b中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4Aおよび表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体および第2のIgG定常ドメイン単量体の両方は、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体、第2のIgG1Fcドメイン単量体、および第3のIgG1Fcドメイン単量体が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体および第2のIgG1Fcドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第3のIgG1Fcドメイン単量体が、表4Aおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4Aおよび表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第1のIgG1Fcドメイン単量体および第3のIgG1Fcドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第2のIgG1ドメイン単量体が、表4Aおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4Aおよび表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、ポリペプチドは、第3のリンカーおよび第3のIgG1Fcドメイン単量体をさらに含み、第2のIgG1Fcドメイン単量体および第3のIgG1Fcドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、第1のIgG1ドメイン単量体が、表4Aおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4Aおよび表4B B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含むIgG1Fcドメイン単量体は、同一のCH3ドメインを有し、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異は、CH3ドメイン内にあり、変異は、EUのG341位～EUのK447位（両端を含む）の配列内にあり、変異は各々、単一アミノ酸変化であり、変異は、EUのG341位～EUのK446位（両端を含む）の配列内にあり、変異は、単一アミノ酸変化であり、第2のリンカーおよび任意選択の第3のリンカーは、

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GSGS (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGS GGS (配列番号 9), GGS GGS GGS (配列番号 10), GGS GGS GGS GGS (配列番号 11), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS (配列番号 2), GGS GGS GGS (配列番号 12),
 GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS (配列番号 32),
 AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33),
 GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 34),
 GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18),
 GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGG (配列番号 21), および GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、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り、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 (配列番号 220)、4～20 (配列番号 223)、8～30 (配列番号 221)、8～20 (配列番号 224)、12～20 (配列番号 225)、または12～30個 (配列番号 222)のグリシン残基からなり、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 (配列番号 23) からなり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つは、EUのI253位に単一アミノ酸変異を含み、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、I253位の各アミノ酸変異は、I253Aであり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つは、EUのR292位に単一アミノ酸変異を含み、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、R292位の各アミノ酸変異は、R292Pであり、各Fcドメイン単量体は独立して、EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 226) およびDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 227) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなり、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 (配列番号 227) を有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 228) を有し、第1のFcドメイン単量体のヒンジ部分は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTCPPCPAPELL (配列番号 228) 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 (配列番号 227) を有し、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは独立して、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、各Fcドメイン単量体のCH2ドメインは同一であり、2つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH2 ドメインは同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

(配列番号 229) を含み、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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、8 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、6 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、各 Fc ドメイン単量体の CH3 ドメインは独立して、5 つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 230) を含み、単一アミノ酸置換は、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、および D356R からなる群から選択され；Fc ドメイン単量体の各々は独立して、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 45、および最大で 10 個の単一アミノ酸置換を有する配列番号 45 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含み；単一アミノ酸置換のうちの最大で 6 つが、CH3 ドメイン中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り；単一アミノ酸置換は、EU の G341 位～EU の K447 位（両端を含む）の配列内にあり；VH ドメインまたは scFv は、表 1 に記載される CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 のセットを含み；VH ドメインまたは scFv 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 を含み；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、少なくとも 95% または 98% 同一であり；VH ドメインまたは scFv は、表 2 に記載される抗体の VH 配列を含み；VH ドメインまたは scFv は、表 1 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み；VH ドメインまたは scFv 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 の配列を含み；VH ドメインまたは scFv 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 ドメインと、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、少なくとも 95% または 98% 同一であり；VH ドメインまたは scFv 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。

【 0 1 5 9 】

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 23), GGGGS (配列番号 1), GGSG (配列番号 2), SGGG (配列番号 3), GSGS (配列番号 4), GSGSGS (配列番号 5), GSGSGSGS (配列番号 6), GSGSGSGSGS (配列番号 7), GSGSGSGSGSGS (配列番号 8), GGSGGS (配列番号 9), GGSGGSGGS (配列番号 10), GGSGGSGGSGGS (配列番号 11), GGSG (配列番号 2), GGSG (配列番号 2), GGSGGGSG (配列番号 12),
GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 219), GENLYFQSGG (配列番号 28), SACYCELS (配列番号 29), RSIAT (配列番号 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (配列番号 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (配列番号 32), AAANSSIDLISVPVDSR (配列番号 33),
GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (配列番号 34),
GGGSGGGSGGGGS (配列番号 35), SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (配列番号 18),
GGSGGGSGGGSGGGSGGS (配列番号 36), GGGG (配列番号 19), GGGGGGGG (配列番号 20), GGGGGGGGGGGGGG (配列番号 21), および GGGGGGGGGGGGGGGGGG (配列番号 22)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか3、またはそれからなり、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUのI253位に置換を含み、EUのI253位の各アミノ酸置換は独立して、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、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、EUのR292位に置換を含み、EUのR292位の各アミノ酸置換は独立して、R292D、R292E、R292L、R292P、R292Q、R292R、R292T、およびR292Yからなる群から選択され、Fcドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、およびD356Rからなる群から選択される置換を含み、各Fcドメイン単量体のヒンジは独立して、EPKSCDKTHTCPPCPAPELL（配列番号226）およびDKTHTCPPCPAPELL（配列番号227）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。

【 0 1 6 1 】

本明細書に記載される場合、「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、C_H2ドメインまたはその機能性断片、およびC_H3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（i i

）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において、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において、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CTLA-4結合ドメインに対してアミノ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事例では、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は何も含まない。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つの単一アミノ酸置換が存在する：

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV

MHEALHNHYTQKSLSLSPG

（配列番号230）。好適な変更の例は、この技術分野で既知である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0184】

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（配列番号19）、8（配列番号20）、または12個（配列番号21）のグリシン（例えば、4～30（配列番号220）、8～30（配列番号221）、または12～30個（配列番号222）のグリシン、例えば、12～30個（配列番号222）、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

(表 2) V H および V L 配列

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（配列番号234）、4～180（配列番号235）、4～160（配列番号236）、4～140（配列番号237）、4～40（配列番号238）、4～100（配列番号239）、4～90（配列番号240）、4～80（配列番号241）、4～70（配列番号242）、4～60（配列番号243）、4～50（配列番号244）、4～40（配列番号238）、4～30（配列番号220）、4～20（配列番号223）、4～19（配列番号245）、4～18（配列番号246）、4～17（配列番号247）、4～16（配列番号248）、4～15（配列番号249）、4～14（配列番号250）、4～13（

配列番号 2 5 1)、4～1 2 (配列番号 2 5 2)、4～1 1 (配列番号 2 5 3)、4～1 0 (配列番号 2 5 4)、4～9 (配列番号 2 5 5)、4～8 (配列番号 2 5 6)、4～7 (配列番号 2 5 7)、4～6 (配列番号 2 5 8) または 4～5 (配列番号 2 5 9) のグリシン残基) (例えば、4～2 0 0 (配列番号 2 3 4)、6～2 0 0 (配列番号 2 6 0)、8～2 0 0 (配列番号 2 6 1)、1 0～2 0 0 (配列番号 2 6 2)、1 2～2 0 0 (配列番号 2 6 3)、1 4～2 0 0 (配列番号 2 6 4)、1 6～2 0 0 (配列番号 2 6 5)、1 8～2 0 0 (配列番号 2 6 6)、2 0～2 0 0 (配列番号 2 6 7)、3 0～2 0 0 (配列番号 2 6 8)、4 0～2 0 0 (配列番号 2 6 9)、5 0～2 0 0 (配列番号 2 7 0)、6 0～2 0 0 (配列番号 2 7 1)、7 0～2 0 0 (配列番号 2 7 2)、8 0～2 0 0 (配列番号 2 7 3)、9 0～2 0 0 (配列番号 2 7 4)、1 0 0～2 0 0 (配列番号 2 7 5)、1 2 0～2 0 0 (配列番号 2 7 6)、1 4 0～2 0 0 (配列番号 2 7 7)、1 6 0～2 0 0 (配列番号 2 7 8)、1 8 0～2 0 0 (配列番号 2 7 9)、または 1 9 0～2 0 0 (配列番号 2 8 0) 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、4～3 0 (配列番号 2 2 0) のグリシン残基 (例えば、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 または 3 0 のグリシン残基 (配列番号 2 2 0)) 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、S G G G S G G G S G G G S G G G (配列番号 1 8)) 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 (F u c) および/またはガラクトース (G a l) などのグリカン (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 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 9 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 9 3】

いくつかの事例では、F c 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、F c 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などの固相支持体に付加する。F c 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 (配列番号 3 8) ペプチド、F L A G ペプチド、m y c ペプチドおよび赤血球凝集素 (H A) 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 (配列番号 3 8) ペプチド (H H H H H H (配列番号 3 8)) 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、F L A G ペプチドは、配列 D Y K D D D D K (配列番号 3 9) を含む。いくつかの実施形態では、F L A G ペプチドは、直列にした、整数倍にした配列 D Y K D D D D K (配列番号 3 9)、例えば 3 × D Y K D D D D K (配列番号 2 8 1) を含む。いくつかの実施形態では、m y c ペプチドは、配列 E Q K L I S E E D L (配列番号 4 0) を含む。いくつかの実施形態では、m y c ペプチドは、直列にした、整数倍にした配列 E Q K L I S E E D L (配列番号 4 0)、例えば 3 × E Q K L I S E E D L (配列番号 2 8 2) を含む。いくつかの実施形態では、H A ペプチドは、配列 Y P Y D V P D Y A (配列番号 4 1) を含む。いくつかの実施形態では、H A ペプチドは、直列にした、整数倍にした配列 Y P Y D V P D Y A (配列番号 4 1)、例えば 3 × Y P Y D V P D Y A (配列番号 2 8 3) を含む。F L A G、m y c または H A 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、F L A G、m y cまたはH A ペプチドを含むF c 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16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0314

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0314】

（表5）構築体7（CTLA-4）配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)	短鎖Fc
構築体7 (CTLA-4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 285 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVPEKSC DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGDKHTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSIVTLVH QDWLNKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	配列番号 48 DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0317

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0317】

実施例2. CTLA-4結合ドメインを含むFc抗原結合ドメイン構築体13の設計および精製

タンパク質発現

分岐点がC末端Fcドメインにある単独で分岐したFcドメインから形成された構築体を、以下に記載されるように作製した。Fc抗原結合ドメイン構築体13(CTLA-4)は、各々、2つの別個のFcドメイン単量体含有ポリペプチド(抗CTLA-4長鎖Fcの2つのコピー(配列番号ZZのいずれか1つ、および短鎖Fc(配列番号ZZ)の2つのコピー)と、抗CTLA-4軽鎖ポリペプチド(配列番号ZZ)の2つのコピーとを含む。長鎖Fcは、電荷変異(K409D/D399K変異)Fcドメイン単量体(ホモ二量体化を促進する)を、E357K電荷変異ならびにS354CおよびT366W突起形成変異(ヘテロ二量体化を促進する)を有するFcドメイン単量体とともに、直列に連続して含み、N末端で抗CTLA-4 VHおよびCH1ドメイン(EUの1~220位)(構築体13(CTLA-4))を含む。短鎖Fcは、K370D電荷変異、ならびにY349C、T366S、L368A、およびY407V空洞形成変異(ヘテロ二量体形成を促進するため)を含有する。抗CTLA-4軽鎖ならびに抗CTLA-4 VHおよびCH1は、抗CTLA-4 mAbから取られる。CTLA-4軽鎖はまた、scFvの一部として長鎖FcのN末端に融合されて発現され得る。他の型の構築体13は、抗CTLA-4重鎖とともに作製され得、各型は、長鎖Fcポリペプチド中のFcドメイン単量体間に異なる大きさのグリシン Spacer (G4(配列番号19)、G10(配列番号25)、G15(配列番号26)、またはG20(配列番号23)リンカー)を保有する。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ボソームを介して、ヒト胎生腎(HEK)293細胞にトランスフェクトされた。以下の構築体の各々のアミノ酸配列は、3つの別個のプラスミド(1つのプラスミドは軽鎖(抗CTLA-4)をコードし、1つのプラスミドは長鎖Fc(抗CTLA-4)をコードし、1つのプラスミドは短鎖Fcをコードする)によりコードされた。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0318

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0318】

(表6) 構築体13(CTLA-4)配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体 13 (CTLA-4), G ₂₀ (配列番号 23) リンカー	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 286 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGGGGGGGGGGG	配列番号 48 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHLDWLNKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

		GGGGGGGGDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGGSFFLYSDLTVDKS RWQQGNVFSVCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
構築体13 (CTLA-4), G ₂₀ (配列番号 23) リンカー CC変異	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 287 QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYTMH WVRQAPGKGLEWVTFISY DGNKNKYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGDK THTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPPEEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLKSDGGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	配列番号 288 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPPE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMSHEALHNHYTQ KSLSLSPG

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 3 5 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 5 1 】

(表 7) 構築体 4 (C T L A 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc	短鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1を含む)
構築体4 (CTLA4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号66 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSV MHEALHNHYTQKSLSLSP G	配列番号 68 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPG

【手続補正 2 0】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 3 5 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 5 4 】

(表 8) 構築体 8 (C T L A 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc	短鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1を含む)
構築体 8 (CTLA4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 69 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLSKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDRLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV MEALHNHYTQKSLSLSPG	配列番号 68 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDEAIYFCART GWLGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPG

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 3 5 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 5 8 】

(表 9) 構築体 9 (C T L A - 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)	短鎖Fc (抗CTLA-4 VHおよびCH1を含む)
構築体9 (CTLA-4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFLTISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 285 QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYTMH WVRQAPGKGLEWVTFISY DGNNKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPK SCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	配列番号 68 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPSRDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSG GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0360

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0360】

(表10) 構築体10 (CTLA4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体10 (CTLA4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号71 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLR AEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLKSDGS FFLYSDLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK	配列番号63 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

		GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGDKHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCR DKLTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP G	

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 2】

(表 1 1) 構築体 1 6 (C T L A 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体16 (CTLA4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号73 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDKLTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCRDKLTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK	配列番号63 DKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSC AVDGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

		EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 4】

(表 1 2) 構築体 1 9 (C T L A - 4) 配列

構築体	軽鎖	長鎖Fc (抗CTLA4 VHおよびCH1)	短鎖Fc
構築体 19 (CTLA-4)	配列番号 284 EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGAFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDF AVYYCQYGGSPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	配列番号 231 QVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYTMHWVR QAPGKGLEWVTFISYDGNN KYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGGTGLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPSK DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDKLTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGDKHTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLKSDGSFFLYSLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGDK THTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDKLTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGFS FLYSLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL PG	配列番号 48 DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSIVTLVHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPDELTKN QVSLSCAVDGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 3 6 8 】

(表 1 3) C T L A - 4 でトランスフェクトされた H E K 細胞を含む抗 C T L A - 4 構築体の C D C 活性

構築体 番号 ¹	n	範囲	平均
抗CTLA4 mAb	1	不明瞭	約101.3/活性なし
S3Y-AA-CTLA4 構築体13 G ₂₀ (配列番号 23) リンカー	1	5.474 ~ 14.38	8.889

¹ 別段の記載がない限り、すべての構築体は G 2 0 (配列番号 2 3) リンカーを含んだ。

【 手 続 補 正 2 6 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 3 7 0 】

(表 1 4) H E K - C T L A - 4 細胞を含む抗 C T L A - 4 構築体の A D C P 活性

構築体 番号 ¹	n	範囲	平均
抗CTLA4 mAb	1	不明瞭	約0.1124
S3Y-AA-CLTA4 構築体13 G ₂₀ (配列番号 23) リンカー	1	0.0005506 ~ 0.006575	0.001903
S3I-AA-CTLA4 構築体7 ² (抗CTLA-4)	1	0.0002413 ~ 0.001917	0.0006801

¹ 別段の記載がない限り、すべての構築体は G 2 0 (配列番号 2 3) リンカーを含んだ。

【 手 続 補 正 2 7 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 3 7 2 】

(表 1 5) H E K - C T L A - 4 細胞を含む抗 C T L A - 4 構築体の A D C C 活性

構築体 番号 ¹	n	EC50 (nM)		
		範囲	平均	SD
抗CTLA4 mAb	1	0.2533 ~ 0.5156	0.3525	
S3Y-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体13 G ₂₀ (配列番号 23) リンカー	1	0.01889 ~ 0.03991	0.02759	
S3Y-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体13 G ₂₀ (配列番号 23) リンカー 脱グリコシル化	1	不明瞭	約1.743/活性なし	
S3A-AA-CTLA4 (抗CTLA-4) 構築体9	1	0.01494 ~ 0.03929	0.02515	
S5X-AA-CTLA4 構築体19 (抗CTLA-4)	1	0.0229 ~ 0.03298	0.02749	

¹ 別段の記載がない限り、すべての構築体は G 2 0 (配列番号 2 3) リンカーを含んだ。

【手続補正 2 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 3】

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。

[本発明1001]

C T L A 4結合ドメインと、リンカーによって第2の F c ドメインに結合された第1の F c ドメインとを含む F c 抗原結合ドメイン構築体であって、前記第1および第2の F c ドメインの各々が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1002]

C T L A 結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第1の I g G 1 F c ドメイン単量体；第2のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第2の I g G 1 F c 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、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む任意選択の第3の I g G 1 F c 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2つの F c ドメイン単量体が、ヘテロ二量体化選択性モジュールまたはホモ二量体化選択性モジュールのいずれかを含む、ポリペプチド。

[本発明1003]

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1004]

前記 C T L A 4 結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1005]

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含み、前記第2の I g G 1 F c 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、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1006]

前記第1の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1007]

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 定常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、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1008]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体、および前記第3の I g G 1 F c 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む、
本発明1002のポリペプチド。

[本発明1009]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 1 F c 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 I g G 1 F c ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1002のポリペプチド。

[本発明1010]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G 1 F c 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2の I g G 1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1002のポリペプチド。

[本発明1011]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G 1 F c 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1の I g G 1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1002のポリペプチド。

[本発明1012]

改変された突起を形成する変異を含む前記 I g G 1 F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷変異をさらに含む、本発明1002～1011のいずれかのポリペプチド。

[本発明1013]

前記改変された突起を形成する変異および前記逆電荷変異が、C H 3 ドメイン内にある、本発明1002～1012のいずれかのポリペプチド。

[本発明1014]

前記変異が、E U の G 341 位～E U の K 447 位（両端を含む）の配列内にある、本発明1013のポリペプチド。

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、本発明1026のポリペプチド。

[本発明1028]

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、本発明1026のポリペプチド。

[本発明1029]

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、本発明1026のポリペプチド。

[本発明1030]

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1031]

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1032]

各Fcドメイン単量体の前記CH2ドメインが同一であり、2つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1033]

各Fcドメイン単量体の前記CH2ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1034]

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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1035]

各Fcドメイン単量体の前記CH3ドメインが独立して、8つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1036]

各Fcドメイン単量体の前記CH3ドメインが独立して、6つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1037]

各Fcドメイン単量体の前記CH3ドメインが独立して、5つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1038]

前記単一アミノ酸置換が、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、F405A、Y407A、S354C、Y349T、T394F、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、およびD356Rからなる群から選択される、本発明1030～1037のいずれかのポリペプチド。

[本発明1039]

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1002～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1040]

前記単一アミノ酸置換のうちの最大6つが、前記CH3ドメイン内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、本発明1039のポリペプチド。

[本発明1041]

前記単一アミノ酸置換が、EUのG341位～EUのK447位（両端を含む）の配列内にある、本発明1039のポリペプチド。

[本発明1042]

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つが、T366Y、T366W、T394W、T394Y、F405W、S354C、Y349T、およびT394Fからなる群から選択される、本発明1002のポリペプチド。

[本発明1043]

前記2つまたは4つの逆電荷変異が、K409D、K409E、K392D、K392E、K370D、K370E、D399K、D399R、E357K、E357R、D356K、およびD356Rから選択される、本発明1005、1006、および1009～1029のいずれかのポリペプチド。

[本発明1044]

前記CTLA4結合ドメインが、scFvである、本発明1002～1043のいずれかのポリペプチド。

[本発明1045]

前記CTLA4結合ドメインが、VHドメインおよびCH1ドメインを含む、本発明1002～1043のいずれかのポリペプチド。

[本発明1046]

前記CTLA4結合ドメインが、VLドメインをさらに含む、本発明1043のポリペプチド。

[本発明1047]

前記VHドメインが、表1に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列のセットを含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1048]

前記VHドメインが、表2に記載の抗体の配列を含むVHドメインのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1049]

前記 V H ドメインが、表2に記載の抗体の V H 配列の C D R - H1、C D R - H2、および C D R - H3を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R - H1、C D R - H2、および C D R - H3配列を除き、表2に記載の抗体の V H 配列と少なくとも95%または98%同一である、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1050]

前記 V H ドメインが、表2に記載の抗体の V H 配列を含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1051]

前記 C T L A4結合ドメインが、表1に記載される C D R - H1、C D R - H2、C D R - H3、C D R - L1、C D R - L2、および C D R - L3の配列のセットを含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1052]

前記 C T L A4結合ドメインが、表2に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットからの C D R - H1、C D R - H2、C D R - H3、C D R - L1、C D R - L2、および C D R - L3の配列を含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1053]

前記 C T L A4結合ドメインが、表2に記載される抗体の V H 配列の C D R - H1、C D R - H2、および C D R - H3を含む V H ドメイン、ならびに表2に記載される抗体の V L 配列の C D R - L1、C D R - L2、および C D R - L3を含む V L ドメインを含み、前記 V H ドメイン配列および V L ドメイン配列が、C D R - H1、C D R - H2、C D R - H3、C D R - L1、C D R - L2、および C D R - L3の配列を除き、表2に記載される抗体の V H 配列および V L 配列に対し、少なくとも95%または98%同一である、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1054]

前記 C T L A4結合ドメインが、表2に記載される抗体の V H 配列および V L 配列のセットを含む、本発明1045のポリペプチド。

[本発明1055]

前記 C T L A4結合ドメインが、I g G C L 抗体定常ドメインおよび I g G C H1 抗体定常ドメインを含む、本発明1002~1043のいずれかのポリペプチド。

[本発明1056]

前記 C T L A4結合ドメインが、V H ドメインおよび C H1 ドメインを含み、V L ドメインおよび C L ドメインを含むポリペプチドに結合して、F a b を形成することができる、本発明1002~1043のいずれかのポリペプチド。

[本発明1057]

前記第1または第2の I g G1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される本発明1002~1056のいずれかのポリペプチドの2つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

[本発明1058]

ヒンジドメイン、C H2ドメイン、および C H3ドメインを含む I g G1 F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドに結合される本発明1002~1056のいずれかのポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチドと前記第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 I g G1 F c ドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内のシステイン残基と前記第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との間のジスルフィド結合によって結合される、ポリペプチド複合体。

[本発明1059]

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、本発明1058のポリペプチド複合体。

[本発明1060]

前記改変された空洞を形成する前記変異が、Y 407 T、Y 407 A、F 405 A、T 394 S、T 394 W / Y 407 A、T 366 W / T 394 S、T 366 S / L 368 A / Y 407 V / Y 349 C、S 364 H / F 405 A からなる群から選択される、本発明1059のポリペプチド複合体。

[本発明1061]

前記第2のポリペプチドが、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1058～1060のいずれかのポリペプチド複合体。

[本発明1062]

C T L A 4結合ドメイン；リンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第1の I g G 1 F c ドメイン単量体；第2のリンカー；ヒンジドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む第2の I g G 1 F c 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、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含む任意選択の第3の I g G 1 F c 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 F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、ポリペプチド。

[本発明1063]

前記 C T L A 4結合ドメインが、抗体重鎖可変ドメインを含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1064]

前記 C T L A 4結合ドメインが、抗体軽鎖可変ドメインを含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1065]

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1066]

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表4Aおよび表4B Aおよび表4B中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1067]

前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 定常ドメイン単量体の両方が、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1068]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体、前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体、および前記第3の I g G 1 F c ドメイン単量体が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1069]

第3のリンカーと、第3の I g G 1 F c ドメイン単量体と、を含み、前記第1の I g G 1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第3の I g G 1 F c ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、

本発明1062のポリペプチド。

[本発明1070]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の I g G1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1071]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、

前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aおよび表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第1の I g G1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1072]

表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む前記 I g G1 F c ドメイン単量体が、同一の C H3ドメインを有する、本発明1062～1071のいずれかのポリペプチド。

[本発明1073]

表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異が、C H3ドメインにある、本発明1062～1072のいずれかのポリペプチド。

[本発明1074]

前記変異が、E UのG 341位～E UのK 447位（両端を含む）の配列内にある、本発明1073のポリペプチド。

[本発明1075]

前記変異が各々、単一アミノ酸変化である、本発明1062～1073のいずれかのポリペプチド。

[本発明1076]

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、GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GGSGGS, GGSGSGSGS, GGSGSGSGSGSGS, GGSG, GGSG, GGSGGGSG, GGSGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 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、本発明1072のポリペプチド。

[本発明1077]

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、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1078]

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、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1079]

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、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1080]

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E U の I 253 位に単一アミノ酸変異を含む、本発明1062～1079のポリペプチド。

[本発明1081]

E U の I 253 位の各アミノ酸変異が独立して、I 253 A、I 253 C、I 253 D、I 253 E、I 253 F、I 253 G、I 253 H、I 253 I、I 253 K、I 253 L、I 253 M、I 253 N、I 253 P、I 253 Q、I 253 R、I 253 S、I 253 T、I 253 V、I 253 W、および I 253 Y からなる群から選択される、本発明1080のポリペプチド。

[本発明1082]

I 253 位の各アミノ酸変異が、I 253 A である、本発明1081のポリペプチド。

[本発明1083]

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E U の R 292 位に単一アミノ酸変異を含む、本発明1062～1082のいずれかのポリペプチド。

[本発明1084]

E U の R 292 位の各アミノ酸変異が独立して、R 292 D、R 292 E、R 292 L、R 292 P、R 292 Q、R 292 R、R 292 T、および R 292 Y からなる群から選択される、本発明1083のポリペプチド。

[本発明1085]

R 292 位の各アミノ酸変異が、R 292 P である、本発明1084のポリペプチド。

[本発明1086]

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L 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、本発明1062～1085のいずれかのポリペプチド。

[本発明1087]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、本発明1086のポリペプチド。

[本発明1088]

前記第1の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L を有する、本発明1086のポリペプチド。

[本発明1089]

前記第1の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L を有し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体の前記ヒンジ部分が、アミノ酸配列 D K T H T C P P C P A P E L L を有する、本発明1086のポリペプチド。

[本発明1090]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが独立して、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1091]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の欠失または置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1092]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H 2 ドメインが同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1093]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H2ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1094]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H3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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1095]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H3ドメインが独立して、8つ以下の単一アミノ酸置換を
伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1096]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H3ドメインが独立して、6つ以下の単一アミノ酸置換を
伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1097]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H3ドメインが独立して、5つ以下の単一アミノ酸置換を
伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1062～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1098]

前記単一アミノ酸置換が、T 366 Y、T 366 W、T 394 W、T 394 Y、F 405 W、F 405 A、
Y 407 A、S 354 C、Y 349 T、T 394 F、K 409 D、K 409 E、K 392 D、K 392 E、K 370 D
、K 370 E、D 399 K、D 399 R、E 357 K、E 357 R、D 356 K、および D 356 R からなる群
から選択される、本発明1090～1097のいずれかのポリペプチド。

[本発明1099]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番
号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、本発明1062～1089のい
ずれかのポリペプチド。

[本発明1100]

前記単一アミノ酸置換のうちの最大6つが、前記 C H3ドメイン内の逆電荷変異である、
本発明1099のポリペプチド。

[本発明1101]

前記単一アミノ酸置換が、E U の G 341 位～E U の K 447 位（両端を含む）の配列内にあ

る、本発明1099のポリペプチド。

[本発明1102]

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つが、T 366 Y、T 366 W、T 394 W、T 394 Y、F 405 W、S 354 C、Y 349 T、およびT 394 Fからなる群から選択される、本発明1062のポリペプチド。

[本発明1103]

前記2つまたは4つの逆電荷変異が、K 409 D、K 409 E、K 392 D、K 392 E、K 370 D、K 370 E、D 399 K、D 399 R、E 357 K、E 357 R、D 356 K、およびD 356 Rから選択される、本発明1065、1066、および1069～1089のいずれかのポリペプチド。

[本発明1104]

前記C T L A 4結合ドメインが、s c F vである、本発明1062～1103のいずれかのポリペプチド。

[本発明1105]

前記C T L A 4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、本発明1062～1103のいずれかのポリペプチド。

[本発明1106]

前記C T L A 4結合ドメインが、V Lドメインをさらに含む、本発明1103のポリペプチド。

[本発明1107]

前記V Hドメインが、表1に記載のC D R－H1、C D R－H2、およびC D R－H3配列のセットを含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1108]

前記V Hドメインが、表2に記載の抗体の配列を含むV HドメインのC D R－H1、C D R－H2、およびC D R－H3を含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1109]

前記V Hドメインが、表2に記載の抗体のV H配列のC D R－H1、C D R－H2、およびC D R－H3を含み、前記V H配列が、前記C D R－H1、C D R－H2、およびC D R－H3配列を除き、表2に記載の抗体のV H配列と少なくとも95%または98%同一である、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1110]

前記V Hドメインが、表2に記載の抗体のV H配列を含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1111]

前記C T L A 4結合ドメインが、表1に記載されるC D R－H1、C D R－H2、C D R－H3、C D R－L1、C D R－L2、およびC D R－L3の配列のセットを含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1112]

前記C T L A 4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV H配列およびV L配列のセットからのC D R－H1、C D R－H2、C D R－H3、C D R－L1、C D R－L2、およびC D R－L3の配列を含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1113]

前記C T L A 4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV H配列のC D R－H1、C D R－H2、およびC D R－H3を含むV Hドメイン、ならびに表2に記載される抗体のV L配列のC D R－L1、C D R－L2、およびC D R－L3を含むV Lドメインを含み、前記V Hドメイン配列およびV Lドメイン配列が、C D R－H1、C D R－H2、C D R－H3、C D R－L1、C D R－L2、およびC D R－L3の配列を除き、表2に記載される抗体のV H配列およびV L配列に対し、少なくとも95%または98%同一である、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1114]

前記C T L A 4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV H配列およびV L配列のセッ

トを含む、本発明1105のポリペプチド。

[本発明1115]

前記C T L A4結合ドメインが、I g G C L抗体定常ドメインおよびI g G C H1抗体定常ドメインを含む、本発明1062～1103のいずれかのポリペプチド。

[本発明1116]

前記C T L A4結合ドメインが、V HドメインおよびC H1ドメインを含み、V LドメインおよびC Lドメインを含むポリペプチドに結合して、F a bを形成することができる、本発明1062～1103のいずれかのポリペプチド。

[本発明1117]

前記第1または第2のI g G1 F cドメイン単量体の前記ヒンジ内のシステイン残基間のジスルフィド結合によって結合される本発明1002～1056のいずれかのポリペプチドの2つのコピーを含む、ポリペプチド複合体。

[本発明1118]

ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含むI g G1 F cドメイン単量体を含む第2のポリペプチドに結合される本発明1062～1116のいずれかのポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチドと前記第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I g G1 F cドメイン単量体の前記ヒンジドメイン内のシステイン残基と前記第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との間のジスルフィド結合によって結合される、
ポリペプチド複合体。

[本発明1119]

前記第2のポリペプチド単量体が、1、2、または3つの逆電荷変異を含む、本発明1118のポリペプチド複合体。

[本発明1120]

前記第2のポリペプチド単量体が、表4から選択される1、2、または3つの逆電荷変異を含み、かつポリペプチド中の表4から選択される1、2、または3つの逆電荷変異に対して相補的である、本発明1119のポリペプチド複合体。

[本発明1121]

前記第2のポリペプチドが、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1118～1120のいずれかのポリペプチド複合体。

[本発明1122]

ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む第1のI g G1 F cドメイン単量体と、第2のリンカーと、ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む第2のI g G1 F cドメイン単量体と、任意選択の第3のリンカーと、ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む任意選択の第3のI g G1 F cドメイン単量体と
を含む、ポリペプチドであって、

少なくとも1つのF c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、ポリペプチド。

[本発明1123]

前記第1のI g G1単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよびC H1ドメインをさらに含む、本発明1122のポリペプチド。

[本発明1124]

前記第1のI g G1単量体のアミノ末端にs c F vをさらに含む、本発明1122のポリペプチド。

[本発明1125]

前記第1のI g G1 F cドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含み、前記第2のI g G1 F c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、本発明1122

のポリペプチド。

[本発明1126]

前記第1の I g G1 F c 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 I g G1 F c ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、本発明1122のポリペプチド。

[本発明1127]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 定常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、本発明1122のポリペプチド。

[本発明1128]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体、前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体、および前記第3の I g G1 F c 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む、
本発明1002のポリペプチド。

[本発明1129]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G1 F c 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 I g G1 F c ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1122のポリペプチド。

[本発明1130]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c 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2の I g G1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1122のポリペプチド。

[本発明1131]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c 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1の I g G1 ドメイン単量体が、2つまたは4つの逆電荷変異を含む、
本発明1122のポリペプチド。

[本発明1132]

改変された突起を形成する変異を含む前記 I g G1 F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷変異をさらに含む、本発明1122～1131のいずれかのポリペプチド。

[本発明1133]

前記改変された突起を形成する変異および前記逆電荷変異が、前記 C H3ドメイン内にある、本発明1122～1131のいずれかのポリペプチド。

[本発明1134]

ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む第1の I g G1 F c ドメイン単量体と、第2のリンカーと、ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む第2の I g G1 F c ドメイン単量体と、任意選択の第3のリンカーと、ヒンジドメイン、C H2ドメイン、およびC H3ドメインを含む任意選択の第3の I g G1 F c ドメイン単量体と
を含む、ポリペプチドであって、

少なくとも1つの F c ドメイン単量体が、1、2、または3つの逆電荷アミノ酸修飾を含む、ポリペプチド。

[本発明1135]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体のアミノ末端に抗体重鎖可変ドメインおよび C H1ドメインをさらに含む、本発明1134のポリペプチド。

[本発明1136]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体のアミノ末端に s c F v をさらに含む、本発明1134のポリペプチド。

[本発明1137]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表6中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含み、前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体が、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、本発明1134のポリペプチド。

[本発明1138]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体が、表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、本発明1134のポリペプチド。

[本発明1139]

前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G 定常ドメイン単量体の両方が、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、本発明1134のポリペプチド。

[本発明1140]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体、前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体、および前記第3の I g G1 F c ドメイン単量体が各々、表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む、
本発明1134のポリペプチド。

[本発明1141]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第3の I g G1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、
本発明1134のポリペプチド。

[本発明1142]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第1の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第2の I g G1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、
本発明1134のポリペプチド。

[本発明1143]

第3のリンカーと、第3の I g G1 F c ドメイン単量体と、を含み、
前記第2の I g G1 F c ドメイン単量体および前記第3の I g G1 F c ドメイン単量体の両方が各々、表4Aまたは表4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含み、前記第1の I g G1ドメイン単量体が、表4A中のものから選択される2つの逆電荷変異のセット、または表4B中のものから選択される4つの逆電荷変異のセットを含む、
本発明1134のポリペプチド。

[本発明1144]

表4Aまたは4Bから選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異を含む前記 I g G1 F c ドメイン単量体が、同一の C H3ドメインを有する、本発明1134～1143のいずれかのポリペプチド。

[本発明1145]

表4から選択される1、2、または3つの逆電荷アミノ酸変異が、C H3ドメインにある、

本発明1134～1143のいずれかのポリペプチド。

[本発明1146]

前記変異が、E UのG 341位～E UのK 447位（両端を含む）の配列内にある、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1147]

前記変異が各々、単一アミノ酸変化である、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1148]

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、GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GSGS, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GGS GGS, GGS GGS GGS, GGS GGS GGS GGS, GGS G, GGS G, GGS G GGS G, GGS G GGS G GGS G GGS G GGS G GGS G GGS G GGS G, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, GGS GGS GSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS, GGS GGS GSGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GGS GGS GSGGGSGGGSGGGS, GGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1149]

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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1150]

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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1151]

前記F cドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E UのI 253位に単一アミノ酸変異を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1152]

E UのI 253位の各アミノ酸変異が独立して、I 253 A、I 253 C、I 253 D、I 253 E、I 253 F、I 253 G、I 253 H、I 253 I、I 253 K、I 253 L、I 253 M、I 253 N、I 253 P、I 253 Q、I 253 R、I 253 S、I 253 T、I 253 V、I 253 W、およびI 253 Yからなる群から選択される、本発明1151のポリペプチド。

[本発明1153]

I 253位の各アミノ酸変異が、I 253 Aである、本発明1152のポリペプチド。

[本発明1154]

前記F cドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E UのR 292位に単一アミノ酸変異を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1155]

E UのR 292位の各アミノ酸変異が独立して、R 292 D、R 292 E、R 292 L、R 292 P、R 292 Q、R 292 R、R 292 T、およびR 292 Yからなる群から選択される、本発明1154のいずれかのポリペプチド。

[本発明1156]

R 292位の各アミノ酸変異が、R 292 Pである、本発明1155のポリペプチド。

[本発明1157]

各F cドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L 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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1158]

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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1159]

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EPKSCDKTHTCPPCPAPELLを有する、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1160]

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EPKSCDKTHTCPPCPAPELL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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1161]

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1162]

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

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1165]

各Fcドメイン単量体の前記CH2ドメインが同一であり、2つ以下の単一アミノ酸の置換を伴う、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1166]

各Fcドメイン単量体の前記CH2ドメインが同一であり、アミノ酸配列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1167]

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、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1168]

各Fcドメイン単量体の前記CH3ドメインが独立して、8つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1169]

各Fcドメイン単量体の前記CH3ドメインが独立して、6つ以下の単一アミノ酸置換を

伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1170]

各 F c ドメイン単量体の前記 C H3ドメインが独立して、5つ以下の単一アミノ酸置換を伴う、アミノ酸配列

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

を含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1171]

前記単一アミノ酸置換が、T 366 Y、T 366 W、T 394 W、T 394 Y、F 405 W、F 405 A、Y 407 A、S 354 C、Y 349 T、T 394 F、K 409 D、K 409 E、K 392 D、K 392 E、K 370 D、K 370 E、D 399 K、D 399 R、E 357 K、E 357 R、D 356 K、および D 356 R からなる群から選択される、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1172]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10個の単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1173]

前記単一アミノ酸置換のうちの最大6つが、前記 C H3ドメイン内の逆電荷変異である、本発明1099のポリペプチド。

[本発明1174]

前記単一アミノ酸置換が、E U の G 341 位～E U の K 447 位（両端を含む）の配列内にある、本発明1173のポリペプチド。

[本発明1175]

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つが、T 366 Y、T 366 W、T 394 W、T 394 Y、F 405 W、S 354 C、Y 349 T、および T 394 F からなる群から選択される、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1176]

前記2つまたは4つの逆電荷変異が、K 409 D、K 409 E、K 392 D、K 392 E、K 370 D、K 370 E、D 399 K、D 399 R、E 357 K、E 357 R、D 356 K、および D 356 R から選択される、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1178]

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表1に記載の C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3配列のセットを含む、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1179]

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表2に記載の抗体の配列を含む V H ドメインの C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3を含む、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1180]

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表2に記載の抗体の V H 配列の C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3を含み、前記 V H 配列が、前記 C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3の配列を除き、表2に記載の抗体の V H 配列と少なくとも95%または98%同一である、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1181]

前記 V H ドメインまたは s c F v が、表2に記載の抗体の V H 配列を含む、本発明1123

、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1182]

前記VHドメインまたはs c F vが、表1に記載のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3配列のセットを含む、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1183]

前記VHドメインまたはs c F vが、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列のセット由来のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3配列を含む、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1184]

前記VHドメインまたはs c F vメインが、表2に記載の抗体のVH配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むVHドメインと、表2に記載の抗体のVL配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むVLドメインと、を含み、前記VHドメイン配列および前記VLドメイン配列が、前記CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の配列を除き、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列と少なくとも95%または98%同一である、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1185]

前記VHドメインまたはs c F vが、表2に記載の抗体のVH配列およびVL配列のセットを含む、本発明1123、1124、1135、および1136のいずれかのポリペプチド。

[本発明1186]

I g G C L抗体定常ドメインと、I g G C H1抗体定常ドメインと、をさらに含む、本発明1122～1145のいずれかのポリペプチド。

[本発明1187]

本発明1002～1187のいずれかのポリペプチドをコードする、核酸分子。

[本発明1188]

本発明1187の核酸分子を含む、発現ベクター。

[本発明1189]

本発明1187の核酸分子を含む、宿主細胞。

[本発明1190]

本発明1188の発現ベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1191]

本発明1189または本発明1190の宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現させる条件下で培養することを含む、本発明1002～1187のいずれかのポリペプチドを産生する方法。

[本発明1192]

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、本発明1189の宿主細胞。

[本発明1193]

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、本発明1190の宿主細胞。

[本発明1194]

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、本発明1189の宿主細胞。

[本発明1195]

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、本発明1190の宿主細胞。

[本発明1196]

10個以下の単一アミノ酸修飾を有するI g G1 F c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、本発明1189の宿主細胞。

[本発明1197]

10個以下の単一アミノ酸修飾を有する I g G1 F c 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、本発明1190の宿主細胞。

[本発明1199]

前記 I g G1 F c ドメイン単量体が、前記 C H3ドメイン内に10、8、6、または4つ以下の単一アミノ酸修飾を有する配列番号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、本発明1196または1197の宿主細胞。

[本発明1200]

本発明1002～1186のいずれかのポリペプチドを含む、薬学的組成物。

[本発明1201]

前記ポリペプチドの40%、30%、20%、10%、5%、2%未満が、F c ドメイン単量体上に少なくとも1つのフコース修飾を有する、本発明1200の薬学的組成物。

[本発明1202]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて第2の F c ドメインを形成する、本発明1001の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1203]

前記単一 F c ドメイン構築体が抗体である、本発明1001または1202の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1204]

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて第2の F c ドメインを形成する、組成物。

[本発明1205]

前記 C T L A4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

もしくは前記第3のポリペプチドに結合されるか、または前記第2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る、本発明1204の組成物。

[本発明1206]

前記 C T L A4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、前記第2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る、本発明1204の組成物。

[本発明1207]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第2の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1208]

前記生物活性が、F c 受容体媒介性エフェクター機能である、本発明1207の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1209]

前記 F c 受容体媒介性エフェクター機能が、A D C C および A D C P および／または C D C 活性である、本発明1208の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1210]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合するスパーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて第2の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1211]

前記 C T L A4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のポリペプチドもしくは前記第3のポリペプチドに結合されるか、または前記第2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る、本発明1202、1207、または1210の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1212]

前記 C T L A4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、前記第2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る、本発明1202、1207、または1210の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1213]

前記 C T L A4結合ドメインが、F a bである、本発明1001および1202～1212のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1214]

前記 C T L A4結合ドメインが、前記第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、本発明1202～1212のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1215]

前記 C T L A4結合ドメインが、s c F vである、本発明1214の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1216]

前記 C T L A4結合ドメインが、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含み、前記V_HドメインおよびC_H1ドメインが、前記第1、第2、または第3のポリペプチドのアミノ酸配列の一部である、本発明1202～1212のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1217]

前記 C T L A4結合ドメインが、V_Lドメインをさらに含む、本発明1216の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1218]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、前記V_Lドメインを含む第4のポリペプチドを含む、本発明1217の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1219]

前記V_Hドメインが、表1に記載の C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3配列のセットを含む、本発明1216の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1220]

前記V_Hドメインが、表2に記載の抗体の配列を含むV_Hドメインの C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3を含む、本発明1216の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1221]

前記V_Hドメインが、表2に記載の抗体のV_H配列の C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3を含み、前記V_H配列が、前記 C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3配列を除き、表2に記載の抗体のV_H配列と少なくとも95%同一である、本発明1216の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1222]

前記V_Hドメインが、表2に記載の抗体のV_H配列を含む、本発明1216の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1223]

前記 C T L A4結合ドメインが、表1に記載される C D R－H1、C D R－H2、C D R－H3、C D R－L1、C D R－L2、および C D R－L3の配列のセットを含む、本発明1001および1202～1215のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1224]

前記 C T L A4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV_H配列およびV_L配列のセットからの C D R－H1、C D R－H2、C D R－H3、C D R－L1、C D R－L2、および C D R－L3の配列を含む、本発明1001および1202～1215のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1225]

前記 C T L A4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV_H配列の C D R－H1、C D R－H2、および C D R－H3を含むV_Hドメイン、ならびに表2に記載される抗体のV_L配列の C D R－L1、C D R－L2、および C D R－L3を含むV_Lドメインを含み、前記

V_Hドメイン配列およびV_Lドメイン配列が、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V_H配列およびV_L配列に対し、少なくとも95%同一である、本発明1001および1202～1215のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1226]

前記CTLA4結合ドメインが、表2に記載される抗体のV_H配列およびV_L配列のセットを含む、本発明1001および1202～1215のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1227]

IgG₁C_L抗体定常ドメインおよびIgG₁C_{H1}抗体定常ドメインをさらに含み、前記IgG₁C_{H1}抗体定常ドメインが、リンカーを介して前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドのN末端に結合している、本発明1001および1202～1212のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1228]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1202～1227のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1229]

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1202～1228のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1230]

前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、本発明1202～1228のいずれかのFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1231]

前記二量体形成選択性モジュールが、前記Fcドメイン単量体の一方の前記C_{H3}ドメイン内に改変された空洞と、前記Fcドメイン単量体の他方の前記C_{H3}ドメイン内に改変された突起と、を含み、前記改変された空洞および前記改変された突起が、Fcドメイン単量体の空洞内突起対 (protuberance-into-cavity pair) を形成するように配置されている、本発明1228または1229のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1232]

前記改変された突起が、S354C、T366W、T366Y、T394W、T394F、およびF405Wからなる群から選択される少なくとも1つの修飾を含み、前記改変された空洞が、Y349C、T366S、L368A、Y407V、Y407T、Y407A、F405A、およびT394Sからなる群から選択される少なくとも1つの修飾を含む、本発明1231のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1233]

前記Fcドメイン単量体の一方がY407VおよびY349Cを含み、前記Fcドメイン単量体の他方がT366WおよびS354Cを含む、本発明1228または1229のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1234]

前記二量体形成選択性モジュールが、前記ドメイン単量体の一方の前記C_{H3}ドメイン内に負に荷電したアミノ酸と、前記Fcドメイン単量体の他方の前記C_{H3}ドメイン内に正に荷電したアミノ酸と、を含み、前記負に荷電したアミノ酸および前記正に荷電したアミノ酸が、Fcドメインの形成を促進するように配置されている、本発明1228または1229のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1235]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、D399Kと

、K 409 D または K 409 E のいずれかとを含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1236]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、K 392 D および D 399 K を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1237]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、E 357 K および K 370 E を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1238]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、D 356 K および K 439 D を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1239]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、K 392 E および D 399 K を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1240]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、E 357 K および K 370 D を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1241]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、D 356 K および K 439 E を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1242]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、S 354 C および T 366 W を含み、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、Y 349 C、T 366 S、L 368 A、および Y 407 V を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1243]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、S 354 C および T 366 W を含み、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、Y 349 C、T 366 S、L 368 A、および Y 407 V を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1244]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、E 357 K または E 357 R を含み、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、K 370 D または K 370 E を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1245]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が、K 370 D または K 370 E を含み、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、E 357 K または E 357 R を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1246]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、K 409 D または K 409 E を含み、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、D 399 K または D 399 R を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1247]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が、D 399 K または D 399 R を含み、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドが各々、K 409 D または K 409 E を含む、本発明1234の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1248]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体中の1つ以上のリンカーが、結合である、本発明1001 および1202～1247のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1249]

[本 発 明 1250]

[illegible]

[本 発 明 1251]

[本發明1252]

[本 発 明 1253]

[本 発 明 1254]

[本 発 明 1255]

[本 発 明 1256]

[本 発 明 1257]

[本發明1258]

[本發明1259]

[本 発 明 1260]

[本 発 明 1261]

[本發明1262]

前記 F c ドメイン単量体のうちの1つ以上が、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H3 抗体定常ドメインを含む、本発明1001および1202～1261のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1263]

前記 F c ドメイン単量体が各々、I g G ヒンジドメイン、I g G C_H2 抗体定常ドメイン、および I g G C_H3 抗体定常ドメインを含む、本発明1262の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1264]

前記 I g G が、I g G1、I g G2a、I g G2b、I g G3、および I g G4 からなる群から選択されるサブタイプのものである、本発明1262または1263の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1265]

前記第1、第2、第3、および第4のポリペプチドの各々内の N 末端 A s p が、G l n に変異している、本発明1001および1202～1264のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1266]

前記第1、第2、第3、および第4のポリペプチドのうちの1つ以上が、C 末端リシンを欠く、本発明1001および1202～1265のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1267]

前記第1、第2、第3、および第4のポリペプチドが各々、C 末端リシンを欠く、本発明1266の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1268]

リンカーによって前記ポリペプチドのうちの1つ以上の N 末端または C 末端に結合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001および1202～1267のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1269]

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも50%が、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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、前記第2のポリペプチド、または前記第3のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて第2の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

[本発明1270]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも75%が、前記第1の F c ドメイン、前記第2の F c ドメイン、および前記 C T L A4 結合ドメインを含む、本発明1269の細胞培養培地。

[本発明1271]

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 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り、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも0.1mg/Lの濃度で前記培養培地中に存在する、細胞培養培地。

[本発明1272]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも75%が構造的に同一である、
本発明1271の細胞培養培地。

[本発明1273]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも10m g / L の濃度で前記培養培地中に
存在する、本発明1269～1272のいずれかの細胞培養培地。

[本発明1274]

前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、少なくとも100m g / L の濃度で前記培養培地中
に存在する、本発明1269～1273のいずれかの細胞培養培地。

[本発明1275]

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合さ
せるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

(3) 第4の F c 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ことであって、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わされて
、第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメ
イン単量体が組み合わされて、第2の F c ドメインを形成し、前記 C T L A4結合ドメイン
が、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され
、それにより F c 抗原結合ドメイン構築体を形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することと
を含む、方法。

[本発明1276]

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第2の F c ドメイン単量体を結合さ
せるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3の F c ドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4の F c 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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の
抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の
F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体が
組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2
の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

[本発明1277]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が、前記第1の F c
ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な

二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、本発明1276の組成物。

[本発明1278]

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、E357KおよびK370Dを含み、前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、K370DおよびE357Kを含む、本発明1277の組成物。

[本発明1279]

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、組成物。

[本発明1280]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、本発明1279の組成物。

[本発明1281]

前記第2のFcドメイン単量体および前記第4のFcドメイン単量体が各々、E357KおよびK370Dを含み、前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が各々、K370DおよびE357Kを含む、本発明1280の組成物。

[本発明1282]

Fc抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を含み、

前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、組成物。

[本発明1283]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が各々、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第4の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が各々、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1282の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1284]

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i v) 第3の F c ドメイン単量体、

v) 第4の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を含み、

前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、組成物。

[本発明1285]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が各々、前記第1の

F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が各々、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1284の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1286]

F c 抗原結合ドメイン構築体の実質的に均質な集団を含む組成物であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第3の F c ドメイン単量体、

i v) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

v i) 第4の F c ドメイン単量体、

v i i) 第5の F c ドメイン単量体、

v i i i) 第6の F c ドメイン単量体、

i x) 前記第4の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9の F c ドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10の F c ドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第7の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第8の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第9の F c ドメイン単量体が組み合わさって第4の F c ドメインを形成し、前記第6の F c ドメイン単量体と前記第10の F c ドメイン単量体が組み合わさって第5の F c ドメインを形成する、組成物。

[本発明1287]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が各々、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第7の F c ドメイン単量体が各々、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第7の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第4の F c ドメイン単量体および前記第8の F c ドメイン単量体が各々、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第8の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が各々、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1286のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1288]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1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1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTLA4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1289]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1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1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1290]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
ii) 第2のFcドメイン単量体、および
iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合するス
ペーサー
を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の
抗原結合ドメインと
を含み、
前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1の
Fcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が
組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2
の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1291]

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、
a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
ii) 第2のFcドメイン単量体、および
iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合さ
せるリンカー
を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
e) 前記第2のポリペプチドおよび／または前記第3のポリペプチドに結合された第2の
抗原結合ドメインと
を含み、
前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1の
Fcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が
組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメインおよび前記第2
の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

[本発明1292]

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、
a) (1) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
ii) 第2のFcドメイン単量体、および
iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合さ
せるリンカー
を含む、第1のポリペプチドと、
(2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
(3) 第4のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
(4) 前記第1のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
(5) 前記第2のポリペプチドおよび／または第3のポリペプチドに結合された第2の抗原
結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養することであって、
前記第1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CTLA4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、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、培養することと、

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こととを含む、方法。

[本発明1293]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、本発明1288、1289、1290、1291、または1292のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1294]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、および

i i i) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと

を含み、

前記第1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1、第2、および第3の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTLA4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1295]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、および

i i i) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインとを含み、

前記第1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1、第2、および第3の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTLA4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1296]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合するスパーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインとを含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1297]

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、

c) 第4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のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、

e) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、

f) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインとを含み、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第1の抗原結合ドメイン、前記第2の抗原結合ドメイン、および前記第3の抗原結合ドメインが異なる抗原に結合する、細胞培養培地。

[本発明1298]

Fc抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、
i i) 第2のFcドメイン単量体、および
i i i) 前記第1のFcドメイン単量体および前記第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカー
を含む、第1のポリペプチドと、
(2) 第3のFcドメイン単量体を含む第2のポリペプチドと、
(3) 第4のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
(4) 前記第1のポリペプチドに結合された第1の抗原結合ドメインと、
(5) 前記第2のポリペプチドに結合された第2の抗原結合ドメインと、
(6) 前記第3のポリペプチドに結合された第3の抗原結合ドメインと
を発現する宿主細胞を培養することであって、
前記第1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CTL A4結合ドメインが、前記第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第3のポリペプチドに結合され、それによりFc抗原結合ドメイン構築体を形成し、前記第1および第2の抗原結合ドメインが、異なる抗原に結合し、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、培養することと、
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ことと
を含む、方法。

[本発明1299]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、前記第2のポリペプチドおよび前記第3のポリペプチドが異なるアミノ酸配列を有する、本発明1294、1295、1296、1297、または1298の組成物。

[本発明1300]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、
a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
i i) 第2のFcドメイン単量体、および
i i i) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー
を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第2のポリペプチドであって、
i v) 第3のFcドメイン単量体、
v) 第4のFcドメイン単量体、および
v i) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー
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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を含み、

前記第1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4のFcドメイン単量体

および前記第6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Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTL A4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1301]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第1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4のFcドメイン単量体および前記第6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Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTL A4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1302]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、および

iii) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

iv) 第3のFcドメイン単量体、

v) 第4のFcドメイン単量体、および

vi) 前記第3のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

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6のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体が組み合わさって第1の

F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1303]

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体のモル基準で少なくとも50%が、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i v) 第3の F c ドメイン単量体、

v) 第4の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

[本発明1304]

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第2のポリペプチドであって、

i v) 第3の F c ドメイン単量体、

v) 第4の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

(3) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

(4) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

(5) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6

の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

[本発明1305]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第3の F c ドメイン単量体が各々、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が各々、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第4の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が各々、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1300、1301、1302、1303、または1304の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1306]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i v) 第3の F c ドメイン単量体、

v) 第4の F c ドメイン単量体、および

v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインとを含む、

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第3の F c ドメインを形成し、前記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ、および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイにおいて、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 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強化されている、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1307]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、および

i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3の F c ドメイン単量体、
 v) 第4の F c ドメイン単量体、および
 v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2
 のリンカー
 を含む、第2のポリペプチドと、
 c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または
 前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、
 前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わされて、
 第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイ
 ン単量体が組み合わされて、第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体
 および前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わされて、第3の F c ドメインを形成し、前
 記 F c 抗原結合ドメイン構築体が、単一 F c ドメインおよび前記 C T L A 4 結合ドメイン
 を有する構築体では呈されない生物活性を含む、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1308]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、
 a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1の F c ドメイン単量体、
 i i) 第2の F c ドメイン単量体、および
 i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第
 1のスペーサー
 を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3の F c ドメイン単量体、
 v) 第4の F c ドメイン単量体、および
 v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2
 のスペーサー
 を含む、第2のポリペプチドと、
 c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、また
 は前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、
 前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の
 F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が
 組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の
 F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、F c 抗原結合ドメ
 イン構築体。

[本発明1309]

F c 抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、前記 F c 抗原結合ド
 メイン構築体のモル基準で少なくとも50%が、
 a) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1の F c ドメイン単量体、
 i i) 第2の F c ドメイン単量体、および
 i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第
 1のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、
 b) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3の F c ドメイン単量体、
 v) 第4の F c ドメイン単量体、および
 v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー
 を含む、第2のポリペプチドと、
 c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 e) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を含み、
 前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成する、細胞培養培地。

[本発明1310]

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、
 a) (1) 第1のポリペプチドであって、
 i) 第1の F c ドメイン単量体、
 i i) 第2の F c ドメイン単量体、および
 i i i) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のリンカー
 を含む、第1のポリペプチドと、
 (2) 第2のポリペプチドであって、
 i v) 第3の F c ドメイン単量体、
 v) 第4の F c ドメイン単量体、および
 v i) 前記第3の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体を結合する第2のリンカー
 を含む、第2のポリペプチドと、
 (3) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
 (4) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
 (5) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、または前記第4のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
 を発現する宿主細胞を培養することであって、
 前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、
 b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することと
 を含む、方法。

[本発明1311]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が各々、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、
 前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が各々、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含み、

前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が各々、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間の二量体形成を促進する相補的な二量体形成選択性モジュールを含む、本発明1306、1307、1308、1309、または1310のFc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1312]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vii) 第4のFcドメイン単量体、

viii) 第5のFcドメイン単量体、

ix) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わされて、第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、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、単一Fcドメインおよび前記CTL A4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強化されている、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1313]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1

のリンカー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のリンカー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のリンカー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を含み、

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1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体および前記第7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4のFcドメイン単量体および前記第8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、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が組み合わされて、第4のFcドメインを形成し、前記第6の単量体および前記第10のFcドメイン単量体が組み合わされて、第5のFcドメインを形成し、前記Fc抗原結合ドメイン構築体が、単一Fcドメインおよび前記CTL A4結合ドメインを有する構築体では呈されない生物活性を含む、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1314]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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ドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および

v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

vi) 第4のFcドメイン単量体、

vii) 第5のFcドメイン単量体、

viii) 第6のFcドメイン単量体、

ix) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および

x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のスペーサー

を含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、
g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を含み、
前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさって第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体が組み合わさって第5のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1315]

Fc抗原結合ドメイン構築体の集団を含む細胞培養培地であって、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、

a) 第1のポリペプチドであって、
i) 第1のFcドメイン単量体、
i i) 第2のFcドメイン単量体、
i i i) 第3のFcドメイン単量体、
i v) 前記第1のFcドメイン単量体と前記第2のFcドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および
v) 前記第2のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体を結合する第2のスペーサー
を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第2のポリペプチドであって、
v i) 第4のFcドメイン単量体、
v i i) 第5のFcドメイン単量体、
v i i i) 第6のFcドメイン単量体、
i x) 前記第4のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および
x) 前記第5のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体を結合する第4のスペーサー

を含む、第2のポリペプチドと、
c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
e) 第9のFcドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、
f) 第10のFcドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、
g) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと
を含み、

前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体が組み合わさって第1のFcドメインを形成し、前記第1のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体が組み合わさって第2のFcドメインを形成し、前記第4のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体が組み合わさって第3のFcドメインを形成し、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体が組み合わさって第4のFcドメインを形成し、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体が組み合わさって第5のFcドメインを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

c ドメインを形成する、細胞培養培地。

[本発明1316]

F c 抗原結合ドメイン構築体を製造する方法であって、

a) (1) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第3の F c ドメイン単量体、

i v) 前記第1の F c ドメイン単量体と前記第2の F c ドメイン単量体を結合する第1のスペーサー、および

v) 前記第2の F c ドメイン単量体と前記第3の F c ドメイン単量体を結合する第2のスペーサー

を含む、第1のポリペプチドと、

(2) 第2のポリペプチドであって、

v i) 第4の F c ドメイン単量体、

v i i) 第5の F c ドメイン単量体、

v i i i) 第6の F c ドメイン単量体、

i x) 前記第4の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体を結合する第3のスペーサー、および

x) 前記第5の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体を結合する第4のスペーサー

を含む、第2のポリペプチドと、

(3) 第7の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

(4) 第8の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

(5) 第9の F c ドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

(6) 第10の F c ドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

(7) 前記第1のポリペプチド、前記第2のポリペプチド、前記第3のポリペプチド、前記第4のポリペプチド、前記第5のポリペプチド、または前記第6のポリペプチドに結合された抗原結合ドメインと

を発現する宿主細胞を培養することであって、

前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体が組み合わさって第1の F c ドメインを形成し、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第7の F c ドメイン単量体が組み合わさって第2の F c ドメインを形成し、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第8の F c ドメイン単量体が組み合わさって第3の F c ドメインを形成し、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第9の F c ドメイン単量体が組み合わさって第4の F c ドメインを形成し、前記第6の F c ドメイン単量体と前記第10の F c ドメイン単量体が組み合わさって第5の F c ドメインを形成し、細胞培養上清中の前記 F c 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、培養することと、

b) 前記細胞培養上清から前記 F c 抗原結合ドメイン構築体を精製することとを含む、方法。

[本発明1317]

先行する本発明のいずれかの F c 抗原結合構築体を投与することを含む、癌を治療するための方法であって、

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、頭頸部癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、中皮腫、尿路上皮癌、尿路上皮癌、膠芽腫、卵巣癌、前立腺癌、高グレードの中枢神経系悪性腫瘍、肝臓癌、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫からなる群から選択される、方法。

[本発明1318]

先行する本発明のいずれかの F c 抗原結合構築体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[本発明1319]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第1および第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3の F c ドメイン単量体、

i i) 第4の F c ドメイン単量体、

i i i) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第3および第4の F c ドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含む、

第1および第3の F c ドメイン単量体と一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第2および第5の F c ドメイン単量体と一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第4および第6の F c 単量体と一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1の F a b を形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1320]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1319の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1321]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1319の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1322]

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1319の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1323]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1319の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1324]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1319～1323のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1325]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H3ドメインが、ヒト I g G1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1319～1323のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1326]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1319～1323のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1327]

前記単一アミノ酸置換が、前記C H3ドメイン内のみにある、本発明1324～1326のいずれかのFc抗原ドメイン単量体。

[本発明1328]

前記第1のFcドメイン単量体および前記第3のFcドメイン単量体が、前記第1のFcドメイン単量体と前記第3のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1319～1323のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1329]

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第4のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が、前記第4のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1319～1323のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1330]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1328のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1331]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1329のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1332]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2のFcドメイン単量体、

i i i) 第1のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第1および第2のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第1のポリペプチド、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3のFcドメイン単量体、

i i) 第4のFcドメイン単量体、

i i i) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 前記第3および第4のFcドメイン単量体を結合させるリンカーを含む、第2のポリペプチド、

c) 第5のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと

を含み、

第1および第3のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第2および第5のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第4および第6のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1333]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、
i i) 第2の F c ドメイン単量体、
i i i) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに
i v) 前記第1および第2の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー
を含む、第1のポリペプチドと、
b) 第2のポリペプチドであって、
i) 第3の F c ドメイン単量体、
i i) 第4の F c ドメイン単量体、
i i i) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに
i v) 前記第3および第4の F c ドメイン単量体を結合させるリンカー
を含む、第2のポリペプチドと、
c) 第5の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、
d) 第6の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、
e) 第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、
f) 第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと
を含み、

第1および第5の F c ドメイン単量体は一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第3および
第6の F c ドメイン単量体は一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第2および第4の F c 単
量体は一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび
第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1の F a b を形成し、第2の C T L
A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2の F a b
を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1334]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1333
の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1335]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1333
の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1336]

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1333
の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1337]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3の
ポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチド
および前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1333の F c 抗原ドメイン構築
体。

[本発明1338]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、ま
たは1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1333～1337のいずれかの F c 抗原ドメイン構
築体。

[本発明1339]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と
比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1333
～1337のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1340]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの
単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1333～1337のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1341]

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、本発明1333～1337のい

れかの F c 抗原ドメイン単量体。

[本発明1342]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1333～1337のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1343]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1333～1337のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1344]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1342の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1345]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1343の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1346]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第3の F c ドメイン単量体、

i v) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1の F c ドメイン単量体と第2の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第2の F c ドメイン単量体と第3の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4の F c ドメイン単量体、

i i) 第5の F c ドメイン単量体、

i i i) 第6の F c ドメイン単量体、

i v) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4の F c ドメイン単量体と第5の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5の F c ドメイン単量体と第6の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9の F c ドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10の F c ドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含み、

第1および第7の F c ドメイン単量体は一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第4および第8の F c ドメイン単量体は一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第2および第5の F c 単量体は一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第3および第9の F c ドメイン単量体は一緒に

に、第4の F c ドメインを形成し、第6および第10の F c 単量体と一緒に、第5の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインと一緒に、第1の F a b を形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインと一緒に、第2の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1347]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1346の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1348]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1346の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1349]

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1346の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1350]

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1346の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1351]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1346の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1352]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1346～1351のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1353]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、ヒト I g G 1 のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1346～1351のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1354]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1346～1351のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1355]

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H 3 ドメイン内のみにある、本発明1346～1351のいずれかの F c 抗原ドメイン単量体。

[本発明1356]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1346～1351のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1357]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第7の F c ドメイン単量体が、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第7の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第4の F c ドメイン単量体および前記第8の F c ドメイン単量体が、前記第4の F c ドメイン単量体と前記第8の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3の F c ドメイン単量体および前記第9の F c ドメイン単量体が、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第9の F c ドメイン単量体との

間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1346～1351のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1358]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1357のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1359]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1358のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1360]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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CTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

ii) 第5のFcドメイン単量体、

iii) 第6のFcドメイン単量体、

iv) 第2のCTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4のFcドメイン単量体と第5のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第5のFcドメイン単量体と第6のFcドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7のFcドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8のFcドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9のFcドメイン単量体および第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第10のFcドメイン単量体および第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと

を含み、

第1および第7のFcドメイン単量体は一緒に、第1のFcドメインを形成し、第4および第8のFcドメイン単量体は一緒に、第2のFcドメインを形成し、第2および第5のFc単量体は一緒に、第3のFcドメインを形成し、第3および第9のFcドメイン単量体は一緒に、第4のFcドメインを形成し、第6および第10のFc単量体は一緒に、第5のFcドメインを形成し、第1のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第1のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1のFabを形成し、第2のCTLA-4重鎖結合ドメインおよび第2のCTLA-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2のFabを形成する、Fc抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1361]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第3の F c ドメイン単量体、

i v) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1の F c ドメイン単量体と第2の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第2の F c ドメイン単量体と第3の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4の F c ドメイン単量体、

i i) 第5の F c ドメイン単量体、

i i i) 第6の F c ドメイン単量体、

i v) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4の F c ドメイン単量体と第5の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5の F c ドメイン単量体と第6の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9の F c ドメイン単量体を含む第5のポリペプチドと、

f) 第10の F c ドメイン単量体を含む第6のポリペプチドと、

g) 第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含む、

第1および第4の F c ドメイン単量体は一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第2および第7の F c ドメイン単量体は一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第5および第8の F c 単量体は一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第3および第9の F c ドメイン単量体は一緒に、第4の F c ドメインを形成し、第6および第10の F c 単量体は一緒に、第5の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1の F a b を形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒に、第2の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1362]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1361の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1363]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1361の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1364]

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1361の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1365]

前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1361の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1366]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一であり、前記第7のポリペプチドおよび前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1361の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1367]

前記 F c ドメイン単量体の各々の前記 C H 3 ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、ま

たは1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1368]

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1369]

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1370]

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン単量体。

[本発明1371]

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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1372]

前記第2のFcドメイン単量体および前記第7のFcドメイン単量体が、前記第2のFcドメイン単量体と前記第7のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第5のFcドメイン単量体および前記第8のFcドメイン単量体が、前記第5のFcドメイン単量体と前記第8のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3のFcドメイン単量体および前記第9のFcドメイン単量体が、前記第3のFcドメイン単量体と前記第9のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第6のFcドメイン単量体および前記第10のFcドメイン単量体が、前記第6のFcドメイン単量体と前記第10のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1361～1366のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1373]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1371のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1374]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1372のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1375]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

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CTLA-4重鎖結合ドメイン、

v) 第1のFcドメイン単量体と第2のFcドメイン単量体を結合するリンカー、および

vi) 第2のFcドメイン単量体と第3のFcドメイン単量体を結合するリンカー

を含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第4のFcドメイン単量体、

i i) 第5の F c ドメイン単量体、

i i i) 第6の F c ドメイン単量体、

i v) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、

v) 第4の F c ドメイン単量体と第5の F c ドメイン単量体を結合するリンカー、および

v i) 第5の F c ドメイン単量体と第6の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第7の F c ドメイン単量体を含む第3のポリペプチドと、

d) 第8の F c ドメイン単量体を含む第4のポリペプチドと、

e) 第9の F c ドメイン単量体および第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第10の F c ドメイン単量体および第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含む、

第1および第4の F c ドメイン単量体と一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第2および第7の F c ドメイン単量体と一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第5および第8の F c 単量体と一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第3および第9の F c ドメイン単量体と一緒に、第4の F c ドメインを形成し、第6および第10の F c 単量体と一緒に、第5の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1の F a b を形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第2の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1376]

F c 抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1の F c ドメイン単量体、

i i) 第2の F c ドメイン単量体、

i i i) 第1の F c ドメイン単量体と第2の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3の F c ドメイン単量体、

i i) 第4の F c ドメイン単量体、

i i i) 第3の F c ドメイン単量体と第4の F c ドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F c ドメイン単量体および第1の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F c ドメイン単量体第2の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

e) 第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドとを含む、

第1および第5の F c ドメイン単量体と一緒に、第1の F c ドメインを形成し、第3および第6の F c ドメイン単量体と一緒に、第2の F c ドメインを形成し、第2および第4の F c ドメイン単量体と一緒に、第3の F c ドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第1の F a b を形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4軽鎖結合ドメインは一緒になって、第2の F a b を形成する、F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1377]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1202の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1378]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1202のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1379]

前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1202のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1380]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチドおよび前記第6のポリペプチドの配列が同一である、本発明1202のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1381]

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1382]

前記Fcドメイン単量体の各々の前記CH3ドメインが、ヒトIgG1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1383]

前記Fcドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1384]

前記単一アミノ酸置換が、前記CH3ドメイン内のみにある、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン単量体。

[本発明1385]

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、前記第2のFcドメイン単量体と前記第4のFcドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1386]

前記第1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、前記第1のFcドメイン単量体と前記第5のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3のFcドメイン単量体および前記第6のFcドメイン単量体が、前記第3のFcドメイン単量体と前記第6のFcドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1376～1380のいずれかのFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1387]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1385のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1388]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1386のFc抗原ドメイン構築体。

[本発明1389]

Fc抗原結合ドメイン構築体であって、

a) 第1のポリペプチドであって、

i) 第1のFcドメイン単量体、

ii) 第2のFcドメイン単量体、

i i i) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 第1の F cドメイン単量体と第2の F cドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第1のポリペプチドと、

b) 第2のポリペプチドであって、

i) 第3の F cドメイン単量体、

i i) 第4の F cドメイン単量体、

i i i) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメイン、ならびに

i v) 第3の F cドメイン単量体と第4の F cドメイン単量体を結合するリンカーを含む、第2のポリペプチドと、

c) 第5の F cドメイン単量体および第3の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第3のポリペプチドと、

d) 第6の F cドメイン単量体および第4の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第4のポリペプチドと、

e) 第1の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第5のポリペプチドと、

f) 第2の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第6のポリペプチドと、

g) 第3の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第7のポリペプチドと、

h) 第4の C T L A-4重鎖結合ドメインを含む第8のポリペプチドとを含む、

第1および第5の F cドメイン単量体と一緒に、第1の F cドメインを形成し、第3および第6の F cドメイン単量体と一緒に、第2の F cドメインを形成し、第2および第4の F c単量体と一緒に、第3の F cドメインを形成し、第1の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第3の C T L A-4重鎖結合ドメインと一緒に、第1の F a bを形成し、第2の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第4の C T L A-4重鎖結合ドメインと一緒に、第2の F a bを形成し、第3の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第1の C T L A-4重鎖結合ドメインは一緒になって、第3の F a bを形成し、第4の C T L A-4重鎖結合ドメインおよび第2の C T L A-4重鎖結合ドメインと一緒に、第2の F a bを形成する、F c抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1390]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一である、本発明1389の F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1391]

前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一である、本発明1389の F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1392]

前記第5のポリペプチド、前記第6のポリペプチド、前記第7のポリペプチド、および前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1389の F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1393]

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドの配列が同一であり、前記第3のポリペプチドおよび前記第4のポリペプチドの配列が同一であり、前記第5のポリペプチド、前記第6のポリペプチド、前記第7のポリペプチド、および前記第8のポリペプチドの配列が同一である、本発明1389の F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1394]

前記 F cドメイン単量体の各々の前記 C H3ドメインが、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1389~1393のいずれかの F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1395]

前記 F cドメイン単量体の各々の前記 C H3ドメインが、ヒト I g G1のアミノ酸配列と比較して、最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1389~1393のいずれかの F c抗原ドメイン構築体。

[本発明1396]

前記 F c ドメイン単量体が各々独立して、最大10、8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を有する配列番号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、本発明1389～1393のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1397]

前記単一アミノ酸置換が、前記 C H3ドメイン内のみにある、本発明1389～1393のいずれかの F c 抗原ドメイン単量体。

[本発明1398]

前記第2の F c ドメイン単量体および前記第4の F c ドメイン単量体が、前記第2の F c ドメイン単量体と前記第4の F c ドメイン単量体との間のホモ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1389～1393のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1399]

前記第1の F c ドメイン単量体および前記第5の F c ドメイン単量体が、前記第1の F c ドメイン単量体と前記第5の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含み、前記第3の F c ドメイン単量体および前記第6の F c ドメイン単量体が、前記第3の F c ドメイン単量体と前記第6の F c ドメイン単量体との間のヘテロ二量体形成を促進する最大8、7、6、5、4、3、2、または1つの単一アミノ酸置換を含む、本発明1389～1393のいずれかの F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1400]

ホモ二量体形成を促進する前記置換が、表4Aおよび表4B中の置換から選択される、本発明1398の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1401]

ヘテロ二量体形成を促進する前記置換が、表3中の置換から選択される、本発明1399の F c 抗原ドメイン構築体。

[本発明1402]

各リンカーが、
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG, GGGGS, GGSG, SGGG, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS,
GSGSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGSGS, GSGS, GSGS,
GGSGGGSG, GSGGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG, GENLYFQSGG, SACYCELS,
RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG,
AAANSSIDLISVPVDSR, GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS,
GGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG, GSGGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGG,
GGGGGGGGG, GGGGGGGGGGGG および GGGGGGGGGGGGGGGGGGG
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか3、またはそれからなる、本発明1319～1401のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1403]

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E U の I 253位に置換を含む、本発明1319～1401のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1404]

E U の I 253位の各アミノ酸置換が独立して、I 253 A、I 253 C、I 253 D、I 253 E、I 253 F、I 253 G、I 253 H、I 253 I、I 253 K、I 253 L、I 253 M、I 253 N、I 253 P、I 253 Q、I 253 R、I 253 S、I 253 T、I 253 V、I 253 W、および I 253 Y からなる群から選択される、本発明1403の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1405]

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、E U の R 292位に置換を含む、本発明1319～1401のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1406]

E U の R 292位の各アミノ酸置換が独立して、R 292 D、R 292 E、R 292 L、R 292 P、

R 292 Q、R 292 R、R 292 T、および R 292 Y からなる群から選択される、本発明1045の F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1405]

前記 F c ドメイン単量体のうちの少なくとも1つが、T 366 Y、T 366 W、T 394 W、T 394 Y、F 405 W、F 405 A、Y 407 A、S 354 C、Y 349 T、T 394 F、K 409 D、K 409 E、K 392 D、K 392 E、K 370 D、K 370 E、D 399 K、D 399 R、E 357 K、E 357 R、D 356 K、および D 356 R からなる群から選択される置換を含む、本発明1319～1401のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

[本発明1405]

各 F c ドメイン単量体の前記ヒンジが独立して、E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L および D K T H T C P P C P A P E L L 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、本発明1319～1401のいずれかの F c 抗原結合ドメイン構築体。

【手続補正 2 9】

【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】

2021532085000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/395, 47/68; C07K 16/46, 16/28, 16/30; A61P 35/04 (2019.01)

CPC - A61K 39/395, 39/39533, 47/68; C07K 16/46, 16/28, 16/30; A61P 35/04

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 -- A	WO 2017/151971 A2 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.) 08 September 2017; page 1, lines 8-13 and 26-28; page 2, lines 13-35; page 3, lines 1-7; page 4, lines 16-22; page 5, lines 21-37; page 6, lines 29-37; page 7, lines 1-16; page 8, lines 29-40; page 11, lines 21-33; page 11, line 38 - page 12, line 19; page 13, lines 1-6 and 26-32; page 14, lines 26-31; page 15, lines 17-35; page 22, lines 5-31; page 26, lines 34-38; page 27, lines 22-38; page 28, lines 16-17; page 28, lines 25 - page 29, line 40; page 30, line 21 - page 31, line 10; page 31, line 26 - page 32, line 8; page 32, lines 27-35; page 33, line 3 - page 34, line 10; page 36, lines 3-15; page 37, line 9 - page 38, line 26; page 40, lines 30-39; page 45, lines 23-25; page 46, lines 1-8; page 46, line 38 - page 47, line 11; page 48, lines 16 - page 49, line 27; page 50, line 39 - line 51, line 4; tables 1, 2A, 2B, 2C	1-11, 12/2-11, 16-19, 42, 62-71, 72/67-71, 76/72/62-71, 77-79, 102, 122-123, 125-131, 132/122-123, 132/125-131, 133/122-123, 133/125-131, 134-135, 137-143, 144/134-135, 144/137-143 124, 132/124, 133/124, 136, 144/136, 145/136, 202, 203/1, 203/202 178/123-124, 178/135-136, 182/123-124, 182/135-136
Y	WO 2017/025323 A1 (COLLECTIS) 16 February 2017; Table 2; page 24, lines 7-9; page 25, lines 25-26; page 40, lines 20-33; page 65, lines 6-8; page 71, lines 1-10; page 90, lines 11-15; page 101, lines 12-13; page 102, lines 20-24	124, 132/124, 133/124, 136, 144/136, 145/136, 203/1, 203/202

☒ 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

10 December 2019 (10.12.2019)

Date of mailing of the international search report

09 JAN 2020

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/US19/41293

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/205434 A1 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.) 30 November 2017; page 1, lines 15-17; page 2, lines 7-9; page 8, lines 15-29; page 9, lines 6-9; page 28, lines 22-25; page 30, lines 14-23; page 31, lines 19-20; page 32, line 38 to page 33, line 9; page 34, lines 27-31; page 42, line 24 to page 43, line 10; page 60, lines 5-16	202, 203/202
A	US 2010/0260754 A1 (CHEDID, M et al.) 14 October 2010; paragraph [0006]	178/123-124, 178/135-136, 182/123-124, 182/135-136
A	WO 2018/089829 A1 (FORTIS THERAPEUTICS, INC.) 17 May 2018; paragraph [0005]	178/123-124, 178/135-136, 182/123-124, 182/135-136

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41293

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.: *****-Please See Supplemental Page-*****
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:

*****-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.:
Groups I+, Claims 1-12, 16-19, 42, 62-72, 76-79, 102, 122-145, 178-185, 202-203; SEQ ID NO: 91 (HCDR1), SEQ ID NO: 121 (HCDR2), SEQ ID NO: 155 (HCDR3), SEQ ID NO: 185 (LCDR1), GAF (LCDR2), and SEQ ID NO: 218 (LCDR3)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/41293

-Continued from Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable-.

Claims Nos 13-15, 20-41, 43-61, 73-75, 80-101, 103-121, 146-176, 186-201, 213-268, 274, 317, 318, 327, 402-404, 405a, 405b, and 406 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

-Continued from Box III Observations where unity of invention is lacking-.

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, 16-19, 42, 62-72, 76-79, 102, 122-145, 178-185, 202-203; SEQ ID NO: 91 (HCDR1), SEQ ID NO: 121 (HCDR2), SEQ ID NO: 155 (LCDR3), SEQ ID NO: 185 (LCDR1), GAF (LCDR2), and SEQ ID NO: 218 (LCDR3) are directed toward compositions and polypeptides comprising an Fc-antigen binding domain construct, comprising a first IgG1 Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; and a second IgG1 Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain.

The compositions and polypeptides will be searched to the extent they encompass a CTLA4 binding domain encompassing a CDRH1 with SEQ ID NO: 91 (first exemplary CDRH1), a CDRH2 with SEQ ID NO: 121 (first exemplary CDRH2), a CDRH3 with SEQ ID NO: 155 (first exemplary CDRH3), a CDRL1 with SEQ ID NO: 185 (first exemplary CDRL1), a CDRL2 with sequence GAF (first exemplary CDRL2), and a CDRL3 with SEQ ID NO: 218 (first exemplary CDRL3). Applicant is invited to elect additional CTLA4 binding domain(s), with corresponding set(s) of CDRs, with specified SEQ ID NO: (or, for short sequences, such as CDRL2, specified sequences) for each, such that the sequence(s) of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional set(s) of binding domain sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-12, 16-19, 42, 62-72, 76-79, 102, 122-145, 178, 182, 202, and 203 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a CTLA4 binding domain encompassing a CDRH1 with SEQ ID NO: 91 (first exemplary CDRH1), a CDRH2 with SEQ ID NO: 121 (first exemplary CDRH2), a CDRH3 with SEQ ID NO: 155 (first exemplary CDRH3), a CDRL1 with SEQ ID NO: 185 (first exemplary CDRL1), a CDRL2 with sequence GAF (first exemplary CDRL2), and a CDRL3 with SEQ ID NO: 218 (first exemplary CDRL3). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(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 Tremelimumab antibody or scFv encompassing the VH and VL sequences, and CDRs thereof, set forth in Table 2 (CTLA4 binding domains).

Group II, Claims 204-212, 269-273, 275-281, and 288-299 are directed toward compositions, cell culture media, and methods of manufacturing comprising an Fc-antigen binding domain construct, comprising a first polypeptide, a second polypeptide comprising a third Fc domain monomer; c) a third polypeptide comprising a fourth Fc domain monomer; wherein the first Fc domain monomer and the third Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain.

Group III, Claims 282, 283, 300-305, 319-326, and 328-332 are directed toward compositions, cell culture media, and methods of manufacturing comprising a first, second, third and fourth polypeptide, and first-sixth Fc domain monomers, wherein the first Fc domain monomer and the third Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the second Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, the fourth Fc domain monomer and the sixth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain.

Group IV, Claims 284-285, 306-311, 333-345, and 376-401, are directed toward a composition, cell culture, and method of manufacturing comprising an Fc-antigen binding domain construct comprising first, second, third, and fourth polypeptides, and first-sixth Fc domain monomers, wherein the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the first Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, the third Fc domain monomer and the sixth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain.

Group V, Claims 286, 287, 312-316, and 346-375 are directed toward a composition, cell culture, and method of manufacturing comprising Fc-antigen binding domain construct, comprising first-sixth polypeptides, and first-tenth Fc domain monomers, wherein the second Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the first Fc domain monomer and the seventh Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, the fourth Fc domain monomer and the eighth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain, the third Fc domain monomer and the ninth Fc domain monomer combine to form a fourth Fc domain, and the sixth Fc domain monomer and the tenth Fc domain monomer combine to form a fifth Fc domain.

The inventions listed as Groups I+ and II-V 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 an Fc domain monomer comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain, not present in any other Groups; the special technical features of Group II include wherein the first Fc domain monomer and the third Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, not present in any other Groups; the special technical features of Group III include wherein the first Fc domain monomer and the third Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the second Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, the fourth Fc domain monomer and the sixth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain, not present in any other Groups; the special technical features of Group IV include wherein the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form a first Fc domain and the first Fc domain monomer and the fifth Fc domain monomer combine to form a second Fc domain, the third Fc domain monomer and the sixth Fc domain monomer combine to form a third Fc domain, not present in any other Groups.

-Continued on Next Supplemental Page-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41293

-***-Continued from Previous Supplemental Page-***-

Groups I+ and II-V share the technical features including: a composition comprising an Fc-antigen binding domain construct, wherein the Fc-antigen binding domain construct comprises an antigen binding domain and a first Fc domain joined to a second Fc domain by a linker; and CTLA4 binding VH and VL domains.

Groups II-V share the technical features including: a composition comprising a substantially homogenous population of 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 first linker or spacer joining the first Fc domain monomer and the second Fc domain monomer; b) a second polypeptide comprising vi) an Fc domain monomer; c) a third polypeptide comprising an Fc domain monomer; and d) an antigen binding domain joined to the first polypeptide, second polypeptide, or the third polypeptide; and a second antigen binding domain (Fab); wherein the second Fc domain monomer and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain; and the first Fc domain monomer and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain, wherein the Fc-antigen binding domain construct has enhanced effector function in an antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) assay, an antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay relative to a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain, and wherein the Fc-antigen binding domain construct comprises a biological activity that is not exhibited by a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain; a cell culture medium comprising a population of Fc-antigen binding domain constructs, wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs, on a molar basis, comprise the structure; a method of manufacturing an Fc-antigen binding domain construct, the method comprising: a) culturing a host cell expressing the Fc-antigen binding domain construct; and wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs in a cell culture supernatant, on a molar basis, are structurally identical, 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 first Fc domain monomer and the third Fc domain monomer combine to form a first Fc domain. Groups II and IV share the technical features including: a third antigen binding domain (Fab); and wherein the second Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer combine to form an Fc domain.

Groups III-V share the technical features including: an Fc-antigen binding domain construct comprising: b) a second polypeptide comprising iv) a third Fc domain monomer, v) a fourth Fc domain monomer, and vi) a second linker joining the third Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer; and c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; d) a fourth polypeptide comprising a sixth Fc domain monomer; and e) an antigen binding domain joined to the first polypeptide, second polypeptide, third polypeptide, or fourth polypeptide; wherein the Fc domain monomers combine to form three Fc domains; an Fc-antigen binding domain construct comprising: a) a first polypeptide comprising: i) at least two Fc domain monomers, ii) a first heavy chain binding domain, and iii) a linker joining the first and second Fc domain monomers; b) a second polypeptide comprising: i) at least two Fc domain monomers, ii) a second heavy chain binding domain and iii) a linker joining the Fc domain monomers; c) a third polypeptide comprising an Fc domain monomer; d) a fourth polypeptide comprising an Fc domain monomer; e) a fifth polypeptide comprising a first light chain binding domain; and f) a sixth polypeptide comprising a second light chain binding domain; wherein, the first heavy chain binding domain and first light chain binding domain together form a first Fab; and the second heavy chain binding domain and second light chain binding domain together form a second Fab; and any of SEQ ID NOs: 42, 43, 45, and 47, having up to 10 amino acid substitutions.

Groups III and 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 first heavy chain binding domain, and iv) a linker joining the first and second Fc domain monomers; b) a second polypeptide comprising: i) a third Fc domain monomer, ii) a fourth Fc domain monomer iii) a second heavy chain binding domain and iv) a linker joining the third and fourth Fc domain monomers; c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; d) a fourth polypeptide comprising a sixth Fc domain monomer; e) a fifth polypeptide comprising a first light chain binding domain; and f) a sixth polypeptide comprising a second light chain binding domain; wherein, the first heavy chain binding domain and first light chain binding domain together form a first Fab; and the second heavy chain binding domain and second light chain binding domain together form a second Fab.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2017/151871 A1 to Momenta Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter "Momenta") in view of WO 2018/107082 A1 to Gliknik, Inc. (hereinafter "Gliknik"), further in view of US 2017/0066826 A2 to Bosques et al. (hereinafter "Bosques"), and US 2017/0260293 A1 to Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter "Regeneron").

Momenta discloses a composition comprising (a composition comprising: page 11, lines 3-10) an Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain (Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23) 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 13-15), ii) a second Fc domain monomer (a second Fc domain monomer; page 2, lines 13-15), and 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 2, lines 13-15); and a CTLA-4 antigen-binding domain (a CTLA-4 antigen-binding domain; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23); a composition comprising a substantially homogenous population of an Fc-antigen binding domain construct (a composition comprising a substantially homogenous population of an Fc-antigen binding domain construct; page 2, lines 1-3, lines 13-35) comprising: a) a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer (comprising: a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 2, lines 13-15), ii) a second Fc domain monomer (a second Fc domain monomer; page 2, lines 13-15), and 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 2, lines 13-15); b) a second polypeptide comprising vi) an Fc domain monomer (b) a second polypeptide comprising vi) an Fc domain monomer; page 2, lines 16-17); c) a third polypeptide comprising an Fc domain monomer (a third polypeptide comprising an Fc domain monomer; page 2, lines 18-19); an antigen binding domain (an antigen-binding domain; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23); wherein the second Fc domain monomer and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain (wherein B (the second Fc domain monomer) and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain; page 2, lines 21-24); and the first Fc domain monomer and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain (and A (the first Fc domain monomer) and another Fc domain monomer combine to form an Fc domain; page 2, lines 21-24); a cell culture medium comprising a population of Fc-antigen binding domain constructs (a cell culture medium comprising a population of Fc-antigen binding domain constructs; page 14, lines 32-34), wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs, on a molar basis, comprise the structure (wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs, on a molar basis, comprise the structure); page 14, lines 32-35);

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41293

-***-Continued from Previous Supplemental Page-***-

a method of manufacturing an Fc-antigen binding domain construct (a method of producing (manufacturing) an Fc domain construct comprising an antigen-binding region (an Fc-antigen binding domain construct); page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23; page 61, line 38 - page 62, line 11), the method comprising: a) culturing a host cell expressing the construct (the method comprising: a) culturing a host cell expressing the construct; page 61, line 38 - page 62, line 11) and wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs in a cell culture supernatant, on a molar basis, are structurally identical (wherein at least 50% of the Fc-antigen binding domain constructs in a cell culture supernatant, on a molar basis, are structurally identical) page 14, lines 32-35), and b) purifying the Fc-antigen binding domain construct from the cell culture supernatant (purifying the Fc-domain construct comprising an antigen-binding domain (Fc-antigen binding domain construct) from the cell culture supernatant; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23; page 61, line 38 - page 62, line 11);

an Fc-antigen binding domain construct (an Fc-domain construct comprising an antigen-recognition region (an Fc-antigen binding domain construct); page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23) comprising: b) a second polypeptide comprising iv) a third Fc domain monomer (comprising: b) a second polypeptide comprising iv) an A' (third) Fc domain monomer; page 2, lines 16-17), v) a fourth Fc domain monomer (a B' (fourth) Fc domain monomer; page 2, lines 18-17), and vi) a second linker joining the third Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer (and vi) a L' (second) linker joining the third Fc domain monomer and the fourth Fc domain monomer; page 2, lines 16-17); and c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer (a third polypeptide comprising an additional (fifth) Fc domain monomer; page 2, lines 18-19); d) a fourth polypeptide comprising a sixth Fc domain monomer (a fourth polypeptide comprising an additional (sixth) Fc domain monomer; page 2, lines 19-20); and e) an antigen binding domain joined to the first polypeptide, second polypeptide, third polypeptide, or fourth polypeptide (an antigen binding domain joined to the first polypeptide, second polypeptide, third polypeptide, or fourth polypeptide); page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23); and wherein the Fc domain monomers combine to form three Fc domains (wherein the Fc domain monomers combine to form three Fc domains; page 2, lines 21-24). Momena further discloses wherein Fc constructs exhibit an enhanced biological effect, relative to monomeric constructs (wherein Fc constructs exhibit enhanced binding to all Fcγ receptors (biological effect), relative to monomeric constructs; page 64, lines 18-21); an Fc domain encompassing a sequence identical to, but one residue shorter than SEQ ID NO: 42 (SEQ ID NO: 42 (an Fc domain encompassing a sequence identical to, but one residue shorter than SEQ ID NO: 42); page 26, line 37 - page 27, line 28, SEQ ID NO: 42; wherein SEQ ID NO: 42 is 100% identical to, but one (K) residue shorter than Applicants' SEQ ID NO: 42); and wherein the Fc constructs include modifications that increase affinity for an Fc receptor (wherein the Fc constructs include modifications that increase affinity for an Fc receptor; page 18, line 36 - page 19, line 1).

Momena does not disclose: 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; and a second antigen binding domain (Fab); 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; wherein the Fc-antigen binding domain construct has enhanced effector function in an antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) assay, an antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay relative to a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain; and wherein the Fc-antigen binding domain construct comprises a biological activity that is not exhibited by a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain; an Fc-antigen binding domain construct comprising: a) a first polypeptide comprising: i) at least two Fc domain monomers, ii) a first heavy chain binding domain, and iii) a linker joining the first and second Fc domain monomers; b) a second polypeptide comprising: i) at least two Fc domain monomers, ii) a second heavy chain binding domain and iii) a linker joining the Fc domain monomers; c) a third polypeptide comprising an Fc domain monomer; d) a fourth polypeptide comprising an Fc domain monomer; e) a fifth polypeptide comprising a first light chain binding domain; and f) a sixth polypeptide comprising a second light chain binding domain; wherein, the first heavy chain binding domain and first light chain binding domain together form a first Fab; and the second heavy chain binding domain and second light chain binding domain together form a second Fab; and any of SEQ ID NOs: 42, 43, 45, and 47, having up to 10 amino acid substitutions; 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 first heavy chain binding domain, and iv) a linker joining the first and second Fc domain monomers; b) a second polypeptide comprising: i) a third Fc domain monomer, ii) a fourth Fc domain monomer iii) a second heavy chain binding domain and iv) a linker joining the third and fourth Fc domain monomers; c) a third polypeptide comprising a fifth Fc domain monomer; d) a fourth polypeptide comprising a sixth Fc domain monomer; e) a fifth polypeptide comprising a first light chain binding domain; and f) a sixth polypeptide comprising a second light chain binding domain; wherein, the first heavy chain binding domain and first light chain binding domain together form a first Fab; and the second heavy chain binding domain and second light chain binding domain together form a second Fab.

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]).

Bosques discloses an engineered Fc construct (an engineered Fc construct; abstract) polypeptide comprising SEQ ID NO: 42 (a polypeptide comprising SEQ ID NO: 30 (SEQ ID NO: 42); paragraph [0144]; wherein SEQ ID NO: 30 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 42).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41293

-***-Continued from Previous Supplemental Page-***-

Regeneron discloses multivalent antigen-binding proteins comprising three or four heavy chain variable domains with associated light chain variable domains (multivalent antigen-binding proteins comprising three or four heavy chain variable domains with associated light chain variable domains; abstract; Figure 6; paragraph [0006]); wherein the multivalent binding proteins comprise heavy chain constant regions linked to the heavy chain domains (wherein the multivalent binding proteins comprise heavy chain constant regions linked to the heavy chain domains; Figure 6), and to multimerizing domains (and to multimerizing domains; Figure 6, paragraph [0013]).

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 comprises a biological activity that is not exhibited by a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain, based on the disclosure of Momenta, due to the effects demonstrated by the properly linked Fc domain constructs, even in the absence of the antigen binding domain. Additionally, 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 Fc-antigen binding domain construct has enhanced effector function in an antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) assay, an antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay relative to a construct having a single Fc domain and the antigen binding domain, based on the use of one or more modified Fc domains having increased affinity for an Fc receptor, as disclosed by Momenta, wherein only a portion of the Fc domains were so modified, in order to enable the tailoring of effector functions, while producing enhanced effector activity based on the binding of the Fc domain to its receptor. 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 Gliklik, 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. It also 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 used a full-length Fc domain sequence, as disclosed by Bosques, in order to provide a terminal lysine residue for the optional conjugation of additional moieties, such as biocompatible polymers, in order to enhance the half-life in vivo of the construct. Furthermore, 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 a plurality of heavy and light chain variable domains, each attached to a multimerizing domain, as disclosed by Regeneron, in order to generate the antigen-binding domain-comprising constructs disclosed by Momenta, and further including constructs comprising two, three or more antigen binding domains. Using the Fc domains disclosed by Momenta as the multimerization domains would have enabled more controlled and effective generation of species including desired binding domains to ensure the production of constructs capable of binding one, two, or three different antigens, or different epitopes on a single antigen.

Groups I+ share the technical features including: a composition comprising a polypeptide comprising a CTLA-4 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; a polypeptide comprising: a CTLA4 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 one, two or three reverse charge amino acid mutations.

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

Momenta discloses a composition comprising (a composition comprising; page 11, lines 3-10) a polypeptide comprising an Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain (a polypeptide comprising an Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23) comprising: a first polypeptide comprising i) a linker (a linker; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11); a first IgG1 Fc domain monomer (comprising: a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11), comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 7, lines 1-11) a second linker (a second linker; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11) ii) a second IgG1 Fc domain monomer (a second IgG1 Fc domain monomer; page 2, lines 13-15, page 7, lines 1-11), comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 7, lines 1-11) 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 4, lines 16-22); and a polypeptide comprising an Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain (a polypeptide comprising an Fc-antigen binding domain construct comprising a CTLA4 binding domain; page 11, lines 3-10, page 15, lines 22-23) comprising: a first polypeptide comprising i) a linker (a linker; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11); a first IgG1 Fc domain monomer (comprising: a first polypeptide comprising i) a first Fc domain monomer; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11), comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 7, lines 1-11) a second linker (a second linker; page 2, lines 13-15; page 7, lines 1-11) ii) a second IgG1 Fc domain monomer (a second IgG1 Fc domain monomer; page 2, lines 13-15, page 7, lines 1-11), comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising a hinge domain, a CH2 domain and a CH3 domain; page 7, lines 1-11); wherein at least one Fc domain monomer comprises one, two or three reverse charge amino acid mutations (wherein at least one Fc domain monomer comprises one, two or three reverse charge amino acid mutations; page 13, lines 15-20, page 29, lines 34-40).

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(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 マニング アンソニー

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー ストリート 3 0 1

(72)発明者 ランシング ジョナサン シー.

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー ストリート 3 0 1

(72)発明者 オルティス ダニエル

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー ストリート 3 0 1

(72)発明者 ルチツキ ローラ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ビニー ストリート 3 0 1

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA05

4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 BB01 BB18 BB36 BB41 BB42 CC21 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74 GA26