

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6351572号
(P6351572)

(45) 発行日 平成30年7月4日(2018.7.4)

(24) 登録日 平成30年6月15日(2018.6.15)

(51) Int.Cl.	F 1		
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	Z N A	
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10		
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28		
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30		
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	T	

請求項の数 39 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-510588 (P2015-510588)	(73) 特許権者 510214045
(86) (22) 出願日	平成25年5月10日 (2013.5.10)	ザイムワークス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-522525 (P2015-522525A)	カナダ国 ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリ
(43) 公表日	平成27年8月6日 (2015.8.6)	ティッシュ コロンビア州 バンクーバー
(86) 國際出願番号	PCT/CA2013/000471	ウエスト エイス アベニュー 138
(87) 國際公開番号	W02013/166594	5 スイート 540
(87) 國際公開日	平成25年11月14日 (2013.11.14)	(74) 代理人 100102978
審査請求日	平成28年5月2日 (2016.5.2)	弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/645,555	(74) 代理人 100102118
(32) 優先日	平成24年5月10日 (2012.5.10)	弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人 100160923
前置審査		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人 100119507
		弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F c ドメインに突然変異を有する免疫グロブリン重鎖のヘテロ多量体構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物およびヘテロ二量体 F c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、前記ヘテロ二量体 F c 領域が、変種 C H 3 ドメインを含む第 1 の単量体 F c ポリペプチドおよび変種 C H 3 ドメインを含む第 2 の単量体 F c ポリペプチドを含み、

前記ヘテロ二量体 F c 領域が、ヘテロ二量体ヒト IgG F c 領域であり、

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインおよび第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがそれぞれ独立に、ホモ二量体 F c 領域と比較して前記ヘテロ二量体 F c 領域の形成を促進するアミノ酸突然変異を含み、

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが F 405 および Y 407 の位置のアミノ酸突然変異を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが T 366 および T 394 の位置のアミノ酸突然変異を含み、T 366 の位置のアミノ酸突然変異が T 366 I もしくは T 366 L であり、T 394 の位置のアミノ酸突然変異が T 394 W であり、F 405 の位置のアミノ酸突然変異が F 405 A、F 405 S、F 405 T、もしくは F 405 V であり、かつ Y 407 の位置のアミノ酸突然変異が Y 407 I もしくは Y 407 V であるか、または

(b) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが Y 407 の位置のアミノ酸突然変異を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが T 366 および K 409 の位置のアミノ酸突然変異を含み、T 366 の位置のアミノ酸突然変異が

10

20

T 3 6 6 A、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 S、もしくはT 3 6 6 Vであり、Y 4 0 7の位置のアミノ酸突然変異がY 4 0 7 AもしくはY 4 0 7 Vであり、かつK 4 0 9の位置のアミノ酸突然変異がK 4 0 9 F、K 4 0 9 S、もしくはK 4 0 9 Wであり；

ヘテロ二量体 F c 領域が 90 % 以上の純度および 70 °C 以上の融解温度 (T m) を有し；

前記単一ドメイン抗原結合構築物が第 1 および第 2 の単量体 F c ポリペプチドの一方に結合しており；

前記単離ヘテロ多量体が免疫グロブリン軽鎖を欠いており；かつ

アミノ酸残基の番号付けが、K a b a t により記載された E U インデックスに従っている、単離ヘテロ多量体。

10

【請求項 2】

前記単一ドメイン抗原結合構築物が、重鎖抗体構築物であるか、または S H 3 誘導性フィノマーもしくはフィブロネクチン誘導性結合ドメインから誘導される、請求項 1 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 3】

免疫グロブリンの第 1 の定常 (C H 1) 領域も欠いている、請求項 1 または 2 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 4】

Y 4 0 7 の位置のアミノ酸突然変異がY 4 0 7 Vである、請求項 1 に記載の単離ヘテロ多量体。

20

【請求項 5】

第 1 の F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメイン、第 2 の F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメイン、または第 1 および第 2 の F c ポリペプチドの両方がアミノ酸突然変異 T 3 5 0 X をさらに含み、X が、バリンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 6】

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインおよび第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインの両方がアミノ酸突然変異 T 3 5 0 V を含む、請求項 5 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 7】

30

前記アミノ酸突然変異が、L 3 5 1 の位置のアミノ酸突然変異および / または K 3 9 2 の位置のアミノ酸突然変異をさらに含み、L 3 5 1 の位置のアミノ酸突然変異が L 3 5 1 Y である、かつ K 3 9 2 の位置のアミノ酸突然変異が K 3 9 2 L、K 3 9 2 M または K 3 9 2 F である、請求項 1 または 4 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 8】

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、アミノ酸突然変異 T 3 6 6 L または T 3 6 6 I のうちの 1 つとアミノ酸突然変異 T 3 9 4 W とを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 9】

40

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y をさらに含むか、または

(b) 第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 K 3 9 2 M もしくは K 3 9 2 L のうちの 1 つをさらに含むか、または

(c) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y をさらに含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 K 3 9 2 L もしくは K 3 9 2 M のうちの 1 つをさらに含む、

請求項 8 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 10】

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、S 4 0 0 または Q 3 4 7 のう

50

ちの 1 つ の 位置のアミノ酸突然変異をさらに含み、および / または 第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、K 3 6 0 または N 3 9 0 のうちの 1 つ の 位置のアミノ酸突然変異をさらに含み、

S 4 0 0 の位置のアミノ酸突然変異が S 4 0 0 E または S 4 0 0 D であり；

Q 3 4 7 の位置のアミノ酸突然変異が Q 3 4 7 R または Q 3 4 7 E であり；

K 3 6 0 の位置のアミノ酸突然変異が K 3 6 0 D または K 3 6 0 E であり；かつ

N 3 9 0 の位置のアミノ酸突然変異が N 3 9 0 R である、

請求項 8 または 9 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 1 1】

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 S 4 0 0 E または Q 3 4 7 R のうちの少なくとも 1 つを含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 N 3 9 0 R または K 3 6 0 E のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 0 に記載の単離ヘテロ多量体。 10

【請求項 1 2】

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 L、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含むか；または

(b) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、および T 3 9 4 W を含むか；または 20

(c) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 I、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含むか；または

(d) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 I、K 3 9 2 L、および T 3 9 4 W を含む、請求項 9 に記載の単離ヘテロ多量体。 30

【請求項 1 3】

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 S 4 0 0 E をさらに含むか、または

(b) 第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 N 3 9 0 R をさらに含むか、または

(c) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 S 4 0 0 E をさらに含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 N 3 9 0 R をさらに含む、

請求項 1 2 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 1 4】

第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 L 3 5 1 Y、S 4 0 0 E、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含む、請求項 1 3 に記載の単離ヘテロ多量体。 40

【請求項 1 5】

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 T 3 6 6 L および T 3 9 4 W を含むか；または

(b) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然変異 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメイン 50

がアミノ酸突然変異 T 3 6 6 L、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含むか；または

(c) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、K392M、およびT394Wを含むか；または

(d) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、K392M、およびT394Wを含むか；または

(e) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、K392L、およびT394Wを含むか；または

(f) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400R、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、K392M、およびT394Wを含むか；または

(g) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400E、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(h) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400E、F405V、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(i) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400E、F405T、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(j) 第 1 の单量体 F c ポリペプチドの变種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然变異 T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、S 4 0 0 E、F 4 0 5 S、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第 2 の单量体 F c ポリペプチドの变種 C H 3 ドメインがアミノ酸突然变異 T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(k) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T350V、S400E、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T350V、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(1) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400E、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(m) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 Q347R、T350V、L351Y、S400E、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、K360E、T366L、N390R、K392M、およびT394Wを含むか；または

(n) 第1の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、L351Y、S400R、F405A、およびY407Vを含み、かつ第2の単量体 Fc ポリペプチドの変種 CH3ドメインがアミノ酸突然変異 T350V、T366L、N390D、K392M、およびT394Wを含むか：または

(8) 第1の量体 E はポリペプチドの変種 C₁H₃ドメインがアミノ酸突然変異 T 3.5

0 V、L 3 5 1 Y、S 4 0 0 R、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、N 3 9 0 E、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(p) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、S 4 0 0 E、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 L、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(q) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、S 4 0 0 E、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 F、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(r) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異Y 3 4 9 C、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異S 3 5 4 C、T 3 6 6 L、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(s) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異Y 3 4 9 C、D 3 9 9 C、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異S 3 5 4 C、T 3 6 6 L、K 3 9 2 C、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(t) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異Y 3 4 9 C、T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、S 4 0 0 E、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、S 3 5 4 C、T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(u) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異Y 3 4 9 C、T 3 5 0 V、S 4 0 0 E、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、S 3 5 4 C、T 3 6 6 L、N 3 9 0 R、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含むか；または

(v) 第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異Y 3 4 9 C、T 3 5 0 V、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異T 3 5 0 V、S 3 5 4 C、T 3 6 6 L、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含む。

請求項1～4のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項16】

Y 4 0 7 の位置のアミノ酸突然変異がY 4 0 7 Aであり、かつK 4 0 9 の位置のアミノ酸突然変異がK 4 0 9 Fである、請求項1に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項17】

前記アミノ酸突然変異が、L 3 5 1 Y、L 3 5 1 I、およびL 3 5 1 Fから選択されるL 3 5 1 の位置のアミノ酸突然変異をさらに含む、請求項16に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項18】

第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインがアミノ酸突然変異L 3 5 1 YおよびY 4 0 7 Aを含み、かつ第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインが、アミノ酸突然変異K 4 0 9 Fとアミノ酸突然変異T 3 6 6 A、T 3 6 6 LまたはT 3 6 6 Vのうちの1つとを含む、請求項17に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項19】

第1の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインが、D 3 9 9、S 4 0 0 およびF 4 0 5 のうちの1つまたは複数の位置のアミノ酸突然変異をさらに含み、ならびに

第2の単量体Fcポリペプチドの変種CH3ドメインが、T 4 1 1、N 3 9 0 およびK 3 9 2 のうちの1つまたは複数の位置のアミノ酸突然変異をさらに含み、

T 4 1 1 の位置のアミノ酸突然変異がT 4 1 1 R、T 4 1 1 K、T 4 1 1 DまたはT 4

10

20

30

40

50

11 E であり；

D 399 の位置のアミノ酸突然変異が D 399 R、D 399 W、D 399 Y、または D 399 K であり；

S 400 の位置のアミノ酸突然変異が S 400 E、S 400 D または S 400 R であり；

F 405 の位置のアミノ酸突然変異が F 405 V であり；

N 390 の位置のアミノ酸突然変異が N 390 R または N 390 K であり；かつ

K 392 の位置のアミノ酸突然変異が K 392 M、K 392 R、K 392 L、K 392 F、または K 392 E である、

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

10

【請求項 20】

(a) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、アミノ酸突然変異 D 399 R もしくは D 399 W のうちの 1 つを含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、アミノ酸突然変異 K 392 E もしくは K 392 L のうちの 1 つとアミノ酸突然変異 T 411 E もしくは T 411 D のうちの 1 つとを含むか、または

(b) 第 1 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、アミノ酸突然変異 D 399 R もしくは D 399 W のうちの 1 つとアミノ酸突然変異 S 400 R もしくは S 400 K のうちの 1 つとを含み、かつ第 2 の単量体 F c ポリペプチドの変種 C H 3 ドメインが、アミノ酸突然変異 K 392 E もしくは K 392 L のうちの 1 つとアミノ酸突然変異 T 411 E もしくは T 411 D のうちの 1 つとを含む、

20

請求項 19 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 21】

前記ヘテロ多量体が、1 つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 22】

前記ヘテロ多量体が、第 1 および第 2 の単量体 F c ポリペプチドの一方に結合している第 1 の單一ドメイン抗原結合構築物と、他方の単量体 F c ポリペプチドに結合している第 2 の單一ドメイン抗原結合構築物とを含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

30

【請求項 23】

第 1 および第 2 の單一ドメイン抗原結合構築物が異なるエピトープに結合する、請求項 22 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 24】

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、單一ドメイン抗体 (s d A b または V H)、ラクダ科動物抗体 (V_h H)、または軟骨魚類抗体フラグメント (V_{N A R}) から誘導される重鎖抗体構築物である、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 25】

前記單一ドメイン抗原結合構築物がラクダ科動物抗体 (V_h H) から誘導される、請求項 24 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 26】

前記ヘテロ二量体 F c 領域が、ヘテロ二量体ヒト Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、または Ig G 4 F c 領域である、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

40

【請求項 27】

前記ヘテロ二量体 F c 領域が、ヘテロ二量体ヒト Ig G 1 F c 領域である、請求項 26 に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 28】

前記ヘテロ多量体が、二重特異的抗体または多特異的抗体である、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項 29】

50

前記単一ドメイン抗原結合構築物が腫瘍関連抗原に結合する、請求項1～28のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項30】

前記単一ドメイン抗原結合構築物がEGFRまたはEGFR1突然変異変種EGFRvIIIに結合する、請求項29に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項31】

前記単一ドメイン抗原結合構築物が、治療抗体と結合を競合する、請求項1～28のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項32】

前記治療抗体が、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バビネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テブリズマブ、トシリズマブ／アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、Proximium(商標)、Rencarex(商標)、ウステキヌマブ、およびザルツムマブからなる群から選択される、請求項31に記載の単離ヘテロ多量体。

10

20

【請求項33】

前記ヘテロ多量体が治療剤と複合化している、請求項1～32のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体。

【請求項34】

請求項1～33のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項35】

請求項1～32のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

30

【請求項36】

請求項1～32のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、哺乳類宿主細胞。

【請求項37】

その必要がある患者において疾患または障害を治療するための、請求項1～33のいずれか一項に記載の単離ヘテロ多量体を含む治療薬。

【請求項38】

前記疾患または障害が癌である、請求項37に記載の治療薬。

【請求項39】

前記疾患または障害が免疫障害である、請求項37に記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年5月10日に出願された米国特許仮出願第61/645,555号の、米国特許法119条(e)に基づく利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本開示は、一般に、ポリペプチドヘテロ二量体、その組成物、ならびにそのようなポリペプチドヘテロ二量体を作製および使用する方法を提供する。より詳細には、熱安定性抗

50

体構築物が本明細書において提供され、前記構築物はヘテロ二量体 F c ドメインを含み、前記構築物は免疫グロブリン軽鎖を欠いている。ある特定の実施形態において、抗体構築物は、多特異的および / または多価である。ある特定の実施形態において、抗体構築物は、免疫グロブリンの第 1 の構築物 (C H 1) 領域を欠いている。

【背景技術】

【0003】

二重特異的治療薬は、2つの別個の異なる標的または同じ抗体の異なるエピトープに同時に結合することができる、抗体に基づいた分子である。二重特異的抗体は、免疫グロブリンドメインに基づいた実体から構成され、抗体分子の成分を構造的および機能的に模倣しようと試みる。二重特異的抗体の使用の1つは、細胞毒性免疫エフェクター細胞を、抗体依存性細胞障害性 (A D C C) によるような腫瘍細胞の増強された死滅のために向け直すこととなっている。この文脈において、二重特異的抗体の一方の腕は、腫瘍細胞上の抗原に結合し、他方は、エフェクター細胞に発現している決定基に結合する。腫瘍とエフェクターの細胞を架橋することによって、二重特異的抗体は、エフェクター細胞を腫瘍細胞に近寄せるのみならず、同時にこれらの活性化の引き金も引き、効果的な腫瘍細胞死滅をもたらす。二重特異的抗体は、化学または放射線療法剤を腫瘍組織の中で濃縮して、正常組織への有害な作用を最小限にするためにも使用されている。この設定において、二重特異的抗体の一方の腕は、破壊のために標的化された細胞上に発現している抗原に結合し、他方の腕は、化学療法薬、放射性同位体、または毒素を送達する。二重特異的抗体を超えて、複数の様式を同時に標的にして効力を達成するタンパク質治療薬の必要性が存在する。そのような複合した新規な生物学的効果は、多標的結合および多機能の局面をタンパク質の中に設計したタンパク質治療薬によって達成され得る。

10

【0004】

これらの多機能性および多標的結合治療剤を設計するために、他の機能性弾頭または標的タンパク質結合ドメインを融合する骨組みを提供する頑強な足場が必要である。理想的には、足場は骨組みを提供するのみならず、設計された治療薬が、多数の他の治療的に関連する重要な特徴を利用できるようにもするべきである。抗体に基づいた二重特異的および多機能性治療薬の一般的な開発における大きな障害は、前臨床および臨床研究の両方において十分な品質および量の材料を生成するのが困難であるということである。

20

【0005】

30

軽鎖を欠いている（すなわち、単一可変ドメインを含む）抗原結合ポリペプチドは、当該技術において知られており、例えば、ラクダ科動物または軟骨魚類から誘導されるものが含まれる。これらの種類の抗原結合ポリペプチドは、抗原結合フラグメントとして多くの利点を有することが示されており、例えば、これらはより熱安定性があり、腫瘍に浸透し、脳関門を横断することができ、これらは、他の抗原結合ポリペプチドフラグメント（例えば、 F a b s および s c F v s ）が結合できないエピトープに結合することができる。したがって、この種類の抗原結合ポリペプチドフラグメントを有する一価または二重特異的抗体が開発されてきた。しかし、そのような一価または二重特異的抗体を調製する現存の技術は、理想的ではなく、治療および臨床用途に必要な量および品質でこれらを製造するために必要な純度および / または安定性を欠いている生成物がもたらされる。変種 F c 領域に結合するタンパク質結合ドメインとして単一可変ドメインを含み、前記変種 F c が、増加した安定性および純度を有するヘテロ二量体を選択するように修飾された、 F c エフェクター活性を有する C H 3 ドメインを含む、ポリペプチド構築物の当該技術における必要性が依然として存在する。

40

【発明の概要】

【0006】

一態様によると、ヘテロ二量体 F c 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、未変性ホモ二量体 F c に匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、前記単離

50

ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いている、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0007】

少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、前記免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域が、2つの单量体Fcポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物が、一方の单量体Fcポリペプチドに結合し、ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体Fc領域の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンの第1の定常(CH1)領域を欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

10

【0008】

ある特定の実施形態では、1つの单量体Fcポリペプチドに結合している1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

【0009】

幾つかの実施形態では、一方の单量体Fcポリペプチドに結合している1つの單一ドメイン抗原結合構築物と、他方の单量体Fcポリペプチドに結合している第2の單一ドメイン抗原結合構築物とを含む、単離ヘテロ多量体が本明細書において記載される。幾つかの実施形態では、両方の單一ドメイン抗原結合構築物が同じエピトープに結合する、単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、前記1つの單一ドメイン抗原結合構築物が1つのエピトープに結合し、第2の單一ドメイン抗原結合構築物が異なるエピトープに結合する、単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。幾つかの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、單一ドメイン抗体(sdAbまたはVH)、ラクダ科動物のナノボディ(V_hH)、軟骨魚類(V_{N A R})、SH3誘導性フィノマー、およびフィプロネクチン誘導性結合ドメインから選択される。單一ドメイン抗原結合構築物がラクダ科動物のナノボディ(V_hH)である、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が、本明細書の幾つかの実施形態において提供される。ある特定の実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、IL2、IFNa-2a/b、IFN-1a/b、IL-21、IL-17a、TNF、IL23、VEGF、およびANG2から選択される1つ以上のサイトカインまたはケモカインに結合する。幾つかの実施形態において、單一ドomain抗原結合構築物は、Epcam、EGFR、VEGFR、CEA、またはGP100のような1つ以上の腫瘍関連抗原に結合する。選択される実施形態において、單一ドomain抗原結合構築物は、CD16、CD30、CD137、CD22、CD52、CD80、CD23、CD2、CD4、CD40、KIR、CD32b、CD25、LAG3、またはB7-H3のような1つ以上の免疫調節抗原に結合する。実施形態において、單一ドomain抗原結合構築物は、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素Bのような1つ以上の細菌性毒素に結合する。

20

【0010】

單一ドomain抗原結合構築物がEGFR1に結合する本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。一実施形態において、單一ドomain抗原結合構築物は、EGFR1突然変異変種EGFRV1Iに結合する。

30

【0011】

ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの单量体に結合している少なくとも1つの單一ドomain抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3領域を含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

【0012】

ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの单量体に結合している少なくとも1つの單一ドomain抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ

40

50

酸突然変異を含む変種定常領域を含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いている、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0013】

また、ヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 Fc 領域が、未変性ホモ二量体 Fc 領域に匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種定常領域を含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンの第 1 の定常 (CH1) 領域を欠いている、単離ヘテロ多量体が提供される。前記単一ドメイン抗原結合構築物が、ラクダ科動物または軟骨魚類から誘導される、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。一実施形態では、前記ラクダ科動物がラマである、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。また、ヘテロ二量体 Fc 領域が、安定性を増加したヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、前記アミノ酸突然変異が、アミノ酸突然変異を含まない CH3 ドメインと比較して安定性を増加したヘテロ二量体 Fc 領域の形成を促進し、変種 CH3 ドメインが、約 70 以上的融解温度 (Tm) を有する、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が提供される。一実施形態では、ヘテロ二量体 Fc 領域が、野生型 Fc 領域と比べて CH3 ドメインに追加のジスルフィド結合を含まない、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。更なる実施形態では、ヘテロ二量体 Fc 領域が、野生型 Fc 領域と比べて変種 CH3 ドメインに追加のジスルフィド結合を含むが、但し、CH3 ドメインの約 70 以上的融解温度 (Tm) が追加のジスルフィド結合の不在下のものであることが条件である、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。別の実施形態では、ヘテロ二量体 Fc 領域が約 90 % を超える純度を有する、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。更なる実施形態では、ヘテロ二量体 Fc 領域が約 98 % 以上の純度を有する、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。別の実施形態では、Tm が約 74 以上である、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。一実施形態では、第 1 の Fc ポリペプチドが、F405 および Y407 の位置にアミノ酸修飾を含み、第 2 の Fc ポリペプチドが、T394 の位置にアミノ酸修飾を含む、単離ヘテロ多量体である。別の実施形態では、第 1 の Fc ポリペプチドが、L351Y、Y405A、および Y407V から選択される 1 つ以上のアミノ酸修飾を含み、第 2 の Fc ポリペプチドが、T366L、T366I、K392L、K392M、および T394W から選択される 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む、単離ヘテロ多量体である。更なる実施形態では、第 1 の Fc ポリペプチドが、D399 および Y407 の位置にアミノ酸修飾を含み、第 2 の Fc ポリペプチドが、K409 および T411 の位置にアミノ酸修飾を含む、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。

【0014】

本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体であって、前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、野生型 CH3 ドメインポリペプチドと比較して少なくとも 3 つのアミノ酸修飾を含む第 1 の修飾 CH3 ドメインを含む第 1 の単量体 Fc ポリペプチド、および野生型 CH3 ドメインポリペプチドと比較して少なくとも 3 つのアミノ酸修飾を含む第 2 の修飾 CH3 ドメインを含む第 2 の単量体 Fc ポリペプチドを含み、前記第 1 および第 2 の CH3 ドメインの一方が、K392J にアミノ酸修飾を含み、J が、L、I、M、または K の側鎖量より実質的に大きくない側鎖量のアミノ酸から選択され、前記第 1 および第 2 の修飾 CH3 ドメインポリペプチドが、少なくとも約 74 の融解温度 (Tm) および少なくとも 95 % の純度を有するヘテロ二量体 CH3 ドメインを優先的に形成し、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾が、前記第 1 と前記第 2 の CH3 ドメインポリペプチドの間の界面にあるアミノ酸のものではない、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

【0015】

一実施形態では、少なくとも 1 つの T350X 修飾を含み、X が、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびその誘導体または変種から選択される天然または非天

10

20

30

40

50

然のアミノ酸である、単離ヘテロ多量体である。更なる実施形態では、少なくとも1つのT350V修飾を含む、単離ヘテロ多量体である。幾つかの実施形態において、前記第1および第2のFcポリペプチドは、それぞれ、T350V修飾を更に含む。幾つかの実施形態において、Fcヘテロ二量体ドメインは、約77以上の中mを有する。

【0016】

幾つかの実施形態では、少なくとも1つの単量体Fcポリペプチドが、修飾S400Zを含み、Zが、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸から選択される、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。一実施形態では、当該第1のFcポリペプチドが、S400E、S400D、S400K、およびS400Rから選択されるアミノ酸修飾を含む、単離ヘテロ多量体である。別の実施形態において、当該第1および第2のFcポリペプチドの一方は、S400EおよびS400Rから選択されるアミノ酸修飾を含み、他方のFcポリペプチドは、N390の位置にアミノ酸修飾を含む。更なる実施形態では、修飾N390Zを含み、Zが、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸から選択される、単離ヘテロ多量体である。一実施形態では、前記第2のFcポリペプチドがアミノ酸修飾N390RまたはN390Kを含む、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。

10

【0017】

一実施形態において、前記第1のFcポリペプチドが、アミノ酸修飾S400Eを含む修飾CH3ドメインポリペプチドであり、当該第2のFcポリペプチドが、アミノ酸修飾N390Rを含む修飾CH3ドメインポリペプチドである、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が提供される。一実施形態では、一方の前記Fcポリペプチドがアミノ酸修飾Q347Rを含み、他方のFcポリペプチドがアミノ酸修飾K360Eを含む、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。

20

【0018】

Fcポリペプチドアミノが、T366V、T366I、T366A、T366M、T366L、K409F、T411E、およびT411Dから選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、第2のFcポリペプチドが、L351Y、Y407A、Y407I、Y407V、D399R、およびD399Kから選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。一実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域が、Fcガンマ受容体への選択的結合を促進する非対称アミノ酸修飾を含む変種CH2ドメインを更に含む、単離ヘテロ多量体である。

30

【0019】

一実施形態では、変種CH2ドメインが、野生型CH2ドメインと比較して、FcガンマI I I a受容体に選択的に結合する、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。

【0020】

幾つかの実施形態では、G型免疫グロブリン(IgG)に基づいたFc構築物を含む、単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、前記IgGが、IgG1、IgG2 IgG3、およびIgG4のうちの1つである、単離ヘテロ多量体である。幾つかの実施形態では、免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンD(IgD)、または免疫グロブリンE(IgE)に基づいたFc構築物を含む、単離ヘテロ多量体である。

40

【0021】

当該ヘテロ多量体が、二重特異的抗体または多特異的抗体である、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が幾つかの実施形態において提供される。

【0022】

少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物が、EGFRまたはEGFRvIIIに結合する、本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体が幾つかの実施形態において提供される。幾つかの実施形態では、前記EGFRまたはEGFRvIII結合構築物が、抗体またはそのフラグメントから誘導される、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。ある特定の実施形態において、前記EGFRまたはEGFRvIII結合構築物は、重鎖抗体構築物である。幾つかの実施形態において、前記重鎖抗体構築物は、ラクダ科動物

50

の構築物である。一実施形態において、前記ラクダ科動物の構築物は、図44に示される配列を含む。

【0023】

本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体と薬学的に許容される担体とを含む組成物が、提供される。

【0024】

本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体をコードする核酸を含む哺乳類宿主細胞が、提供される。

【0025】

一実施形態では、單一ドメイン抗原結合構築物が、少なくとも1つの治療抗体と結合を競合する、単離ヘテロ多量体が、本明細書に記載される。一実施形態では、当該少なくとも1つの治療抗体が、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テプリズマブ、トシリズマブ／アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、Proxi nium(商標)、Rencarex(商標)、ウステキヌマブ、およびザルツムマブからなる群から選択される、単離ヘテロ多量体である。

10

【0026】

一実施形態では、癌抗原により特徴付けられる癌を有する患者において癌を治療する方法であって、当該患者に治療有効量の本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体を投与することを含む、方法である。一実施形態では、当該癌が、EGFRまたはEGFRvIIIの過剰発現により特徴付けられる、癌を治療する方法である。

20

【0027】

EGFRまたはEGFRvIIIを過剰発現する癌細胞を治療する方法であって、当該細胞を、本明細書に提供されるある量のヘテロ多量体と接触させることを含む方法が提供される。幾つかの実施形態において、当該癌細胞は、乳癌細胞、肺癌細胞、肛門癌細胞、および神経膠芽腫のうちの少なくとも1つである。

30

【0028】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されている癌を治療する方法であって、別の治療分子に加えて、当該ヘテロ多量体を投与することを含む方法である。幾つかの実施形態において、当該治療分子はヘテロ多量体と複合体化している。

【0029】

免疫抗原により特徴付けられる免疫障害を有する患者において免疫障害を治療する方法であって、当該患者に治療有効量の本明細書に記載されている単離ヘテロ多量体を投与することを含む方法が、提供される。

40

【0030】

一態様では、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する当該ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、当該単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリンの第1の定常(CH1)領域および免疫グロブリン軽鎖を欠いている単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。

【0031】

一態様では、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、

50

ヘテロ二量体 Fc 領域が、未変性ホモ二量体 Fc に匹敵する安定性を有する当該ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、当該単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリンの第 1 および第 2 の定常ドメイン (CH1 および CH2) 、ならびに免疫グロブリン軽鎖を欠いている単離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。

【 0032 】

本明細書に提供される単離ヘテロ多量体のある特定の実施形態において、変種 CH3 ドメインは、約 70 以上的融解温度 (Tm) を有する。ある特定の実施形態において、変種 CH3 ドメインは、少なくとも約 75 の融解温度 (Tm) を有する。幾つかの実施形態において、変種 CH3 ドメインは、少なくとも約 80 の融解温度 (Tm) を有する。 10

【 0033 】

本明細書に提供される単離ヘテロ多量体の幾つかの実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 領域は、特定の Fc ガンマ受容体への選択的結合を促進する少なくとも 1 つの非対称アミノ酸修飾を含む変種 CH2 ドメインを更に含む。一実施形態において、変種 CH2 ドメインは、野生型 CH2 ドメインと比較して、Fc ガンマ I I I a 受容体に選択的に結合する。

【 0034 】

本発明のある特定の実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、原核生物もしくは真核生物の宿主細胞における発現、DNA、または免疫グロブリンの第 1 の定常 (CH1) 領域を欠いている免疫グロブリンの配列を有する cDNA の産物である。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域は、軽鎖を欠いている免疫グロブリンからのものであり、当該免疫グロブリンは、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、ラマ、アルパカ、ピクーナ、およびグアナコであるが、これらに限定されないようなラクダ科動物のリンパ球または他の細胞から得られる。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域は、軽鎖を欠いている免疫グロブリンからのものであり、当該免疫グロブリンは、ラマのリンパ球または他の細胞から得られる。 20

【 0035 】

本発明の具体的な実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、原核生物もしくは真核生物の宿主細胞における発現、DNA、または cDNA の産物である。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域および / または Fc ヘテロ二量体は、サメ、アカエイ、ガンギエイ、ギンザメ、ラットフィッシュ、ゾウギンザメ、およびアイゴであるが、これらに限定されないような軟骨魚類から得られる、軽鎖を欠いている免疫グロブリンからのものである。特定の実施形態において、少なくとも 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域および / または Fc ヘテロ二量体は、軽鎖を欠いている免疫グロブリンからのものであり、当該免疫グロブリンは、サメから得られる。 30

【 0036 】

ヘテロ二量体の Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 Fc 領域が、アミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、当該単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリンの第 1 の定常 (CH1) 領域、免疫グロブリン軽鎖を欠いており、場合により免疫グロブリンの第 2 の定常 (CH2) 領域を欠いており、変種 CH3 ドメインが、約 70 以上の融解温度 (Tm) を有し、当該変種 CH3 ドメインが、未変性 IgG1 抗体における CH3 ドメインに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体 Fc 領域の形成をもたらす単離ヘテロ多量体が、別の態様において提供される。 40

【 0037 】

1 つの実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 領域は、野生型 Fc 領域と比べて CH3 ドメインに追加のジスルフィド結合を含まない。代替的な実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 領域は、野生型 Fc 領域と比べて変種 CH3 ドメインに少なくとも 1 つの追加のジスルフィド結合を含むが、但し、約 70 以上の融解温度 (Tm) が追加のジスルフィド結 50

合の不在下のものであることが条件である。別の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 領域は、野生型 Fc 領域と比べて変種 CH3 ドメインに少なくとも 1 つの追加のジスルフィド結合を含み、変種 CH3 ドメインは、約 77.5 以上的融解温度 (Tm) を有する。

【0038】

ヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 Fc 領域が、アミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、当該単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖、および免疫グロブリンの第 1 の定常 (CH1) ドメインを欠いており、場合により免疫グロブリンの第 2 の定常 (CH2) ドメインを欠いており、変種 CH3 ドメインが、約 70 以上的融解温度 (Tm) を有し、ヘテロ二量体 Fc 領域が、約 90 % を超える純度で形成される、またはヘテロ二量体 Fc 領域が、約 95 % 以上の純度で形成される、またはヘテロ二量体 Fc 領域が、約 98 % 以上の純度で形成される単離ヘテロ多量体が、1 つの実施形態において提供される。

【0039】

ある特定の実施形態において、軽鎖を欠いている、本明細書に記載されている免疫グロブリンは、重鎖の可変ドメイン (VH) が、4 本鎖免疫グロブリンの VH と異なる特性を有するようなものである。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている重鎖免疫グロブリンの可変ドメインは、軟骨魚類からの重鎖免疫グロブリンの場合のように、VL に相互作用部位を有さない。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている重鎖免疫グロブリンの可変ドメインは、VL または CH1 ドメインとの正常な相互作用部位を有さず、これらはいずれも、ラクダ科動物および一部の軟骨魚類からの重鎖免疫グロブリンに存在しない。

【0040】

本明細書に記載されているヘテロ多量体のある特定の実施形態において、少なくとも 1 つの免疫グロブリン重鎖は、リンカーによりヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物は、ヒンジ領域によりヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している。可変長さのリンカーおよび / またはヒンジ領域が、本明細書において提供されるヘテロ多量体に利用される。当業者は、リンカーおよび / またはヒンジ領域の長さが、抗原結合部位を隔てる距離の決定に参加することができる。本明細書において提供されるある特定の実施形態において、ヒンジ領域は、0 ~ 50 個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態において、ヒンジ領域の配列は、以下である。

GTNEVCKCKPKCP。

一実施形態において、ヒンジ領域の配列は、

E P K I P Q P Q P K P Q P Q P Q P K P Q P K P E P E C T C P K C P

である。

【0041】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体構築物に利用される少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物および / または修飾 Fc 領域は、G 型免疫グロブリン、例えば、クラス 2 の免疫グロブリン (IgG2) またはクラス 3 の免疫グロブリン (IgG3) と定義される免疫グロブリンを含む。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体構築物に利用される少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物および / または修飾 Fc 領域は、免疫グロブリン M または IgM を含む。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体構築物に利用される少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物および / または修飾 Fc 領域は、免疫グロブリン A または IgA を含む。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体構築物に利用される少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物および / または修飾 Fc 領域は、免疫グロブリン D または IgD を含む。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体構築物に利用される少なくとも 1 つの単一ドメイン抗原結合構築物および / または修飾 Fc 領域は、免疫グロブリン E または IgE

10

20

30

40

50

を含む。

【0042】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4）、またはIgA（またはIgM、IgD）から誘導されるFc部分を含む。1つの特定の態様によると、ある特定の実施形態は、修飾「IgE誘導Fc部分」（すなわち、IgEから誘導されるFc部分）を含む。

【0043】

ある特定の実施形態において、重鎖の可変ドメインと重鎖のFc部分とを連結している10 ピンジは、IgGアイソタイプ（例えばIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4）、またはIgA（またはIgM、IgD、IgE）のピンジ配列から誘導される。

【0044】

本明細書に記載されているある特定の実施形態において、可変重鎖は、ドメイン抗体（もしくは、ドメイン抗体としての使用に適したアミノ酸配列）、單一ドメイン抗体（もしくは、單一ドメイン抗体としての使用に適したアミノ酸配列）、「dAb」（もしくは、dAbとしての使用に適したアミノ酸配列）、またはナノボディ（本明細書において定義されており、V_{HH}配列が含まれるが、これらに限定されない）、他の單一可変ドメイン、あるいはこれらのいずれかの任意の適切なフラグメントであり得る。（單一）ドメイン抗体の一般的な記載には、上記に引用された従来技術、ならびにヨーロッパ特許第0368684号も参照される。用語「dAb」には、Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341(6242): 544-6)、Holt et al. (Trends Biotechnol., 2003, 21(11): 484-490)、ならびに例えば国際公開第04/068820号、同第06/030220号、同第06/003388号、およびDomantis Ltd. による他の公開特許出願が参照される。幾つかの実施形態において、可変重鎖は單一ドメイン抗体を含む、または單一可変ドメインは、特定の種のサメから誘導され得る（例えば、いわゆる「IgNARドメイン」、例えば国際公開第05/18629号を参照すること）。

【0045】

ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの单量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む单離ヘテロ多量体であって、30 ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する当該ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む变種定常ドメインを含み、当該单離ヘテロ多量体が、免疫グロブリンヘテロ軽鎖を欠いている单離ヘテロ多量体が、本明細書において提供されている。

【0046】

一実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの单量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む单離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、未変性ホモ二量体Fc領域に匹敵する安定性を有する当該ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む变种定常領域を含み、当該单離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖、および免疫グロブリンの第1の定常(CH1)領域を欠いている、单離ヘテロ多量体が提供される。

【0047】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、定常ドメインの配列類似性を維持する、任意の動物源（例えば、ヒト、ネズミ、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ）の抗体から誘導されるFc部分または定常ドメインを含む（図40A～40B）。ある特定の実施形態において、定常ドメインは、サメ、アカエイ、ガンギエイ、ギンザメ、ラットフィッシュ、ゾウギンザメ、およびアイゴであるが、これらに限定されないような軟骨魚類から誘導される。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナ、およびグアナコであるが、これらに限定されな50

いようなラクダ科動物の抗体から誘導される定常ドメインを含む。

【0048】

本明細書において提供されるある特定の実施形態による單一ドメイン抗原結合構築物は、当該技術に周知の精製方法を使用して、ラマであるが、これに限定されないようなラクダ科動物の血清から精製することにより得られる。

【0049】

本明細書に提供されるある特定の実施形態において、ヘテロ多量体の免疫グロブリンの可変領域は、骨組み (FW) および相補性決定領域 (CDR)、特に4つの骨組みおよび3つの相補性領域を含む。この可変領域は、不在である軽鎖の可変領域が寄与することなく、1つまたは幾つかの抗原結合部位をそれ自体含有し得るという事実によって、特に、4本鎖免疫グロブリンと区別される。

10

【0050】

また、ヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体Fc領域の形成をもたらす1つ以上のアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、約70以上の中解温度 (Tm) を有する、またはTmが約71以上である、またはTmが約74以上である単離ヘテロ多量体が、ある特定の実施形態において提供される。別の実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域は、約98%以上の純度および約73のTmを有する溶液により形成される、またはヘテロ二量体Fc領域は、約90%以上の純度および約75のTmにより形成される。

20

【0051】

ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、第1および第2のCH3ドメインポリペプチドを含み、当該第1および第2のCH3ドメインポリペプチドの少なくとも一方が、アミノ酸修飾T350Vを含む、単離ヘテロ多量体が、ある特定の実施形態において提供される。ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾T350Vを含む第1のCH3ドメインポリペプチド、および、またアミノ酸修飾T350Vを含む第2のCH3ドメインポリペプチドを含む、単離ヘテロ多量体が、ある特定の実施形態において提供される。ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、F405およびY407の位置にアミノ酸修飾を含む第1のCH3ドメインポリペプチド、およびT394の位置にアミノ酸修飾を含む第2のCH3ドメインポリペプチドを含む、単離ヘテロ多量体が、ある特定の実施形態において提供される。ある特定の実施形態において、第1のCH3ドメインポリペプチドは、D399およびY407の位置にアミノ酸修飾を含み、第2のCH3ドメインポリペプチドは、K409およびT411の位置にアミノ酸修飾を含む。ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾L351YおよびY407Aを含む第1のCH3ドメインポリペプチド、ならびにアミノ酸修飾T366AおよびK409Fを含む第2のCH3ドメインポリペプチドを含む、単離ヘテロ多量体が、ある特定の実施形態において提供される。1つの態様において、第1のCH3ドメインポリペプチドまたは第2のCH3ドメインポリペプチドは、T411、D399、S400、F405、N390、またはK392の位置に更なるアミノ酸修飾を含む。T411の位置のアミノ酸修飾は、T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E、またはT411Wから選択される。D399の位置のアミノ酸修飾は、D399R、D399W、D399Y、またはD399Kから選択される。S400の位置のアミノ酸修飾は、S400E、S400D、S400R、またはS400Kから選択される。F405の位置のアミノ酸修飾は、F405I、F405M、F405T、F405S、F405V、またはF405Wから選

30

40

50

択される。N 3 9 0 の位置のアミノ酸修飾は、N 3 9 0 R、N 3 9 0 K、またはN 3 9 0 Dから選択される。K 3 9 2 の位置のアミノ酸修飾は、K 3 9 2 V、K 3 9 2 M、K 3 9 2 R、K 3 9 2 L、K 3 9 2 F、またはK 3 9 2 Eから選択される。

【0052】

ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体 F c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、アミノ酸修飾 T 3 5 0 V および L 3 5 1 Y を含む第1の C H 3 ドメインポリペプチド、ならびにまたアミノ酸修飾 T 3 5 0 V および L 3 5 1 Y を含む第2の C H 3 ドメインポリペプチドを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0053】

別の実施形態において、ヘテロ二量体 F c 領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單ードメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、アミノ酸修飾 Y 4 0 7 A を含む第1の C H 3 ドメインポリペプチド、ならびにアミノ酸修飾 T 3 6 6 A および K 4 0 9 F を含む第2の C H 3 ドメインポリペプチドを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。1つの態様において、第1の C H 3 ドメインポリペプチドまたは第2の C H 3 ドメインポリペプチドは、更なるアミノ酸修飾 K 3 9 2 E、T 4 1 1 E、D 3 9 9 R、および S 4 0 0 R を含む。別の態様において、第1の C H 3 ドメインポリペプチドは、アミノ酸修飾 D 3 9 9 R、S 4 0 0 R、および Y 4 0 7 A を含み、第2の C H 3 ドメインポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 A、K 4 0 9 F、K 3 9 2 E、および T 4 1 1 E を含む。更なる実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、約74 以上 の融解温度 (T m) を有し、ヘテロ二量体は、約95 % 以上の純度を有する。

【0054】

ヘテロ二量体 F c 領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單ードメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、L 3 5 1 の位置にアミノ酸修飾およびアミノ酸修飾 Y 4 0 7 A を含む第1の C H 3 ドメインポリペプチドを含み、第2の C H 3 ドメインポリペプチドが、T 3 6 6 の位置にアミノ酸修飾およびアミノ酸修飾 K 4 0 9 F を含む、単離ヘテロ多量体が、別の実施形態において提供される。1つの態様において、L 3 5 1 の位置のアミノ酸修飾は、L 3 5 1 Y、L 3 5 1 I、L 3 5 1 D、L 3 5 1 R、またはL 3 5 1 F から選択される。別の態様において、Y 4 0 7 の位置のアミノ酸修飾は、Y 4 0 7 A、Y 4 0 7 V、またはY 4 0 7 S から選択される。なお別の態様において、T 3 6 6 の位置のアミノ酸修飾は、T 3 6 6 A、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 S、T 3 6 6 C、T 3 6 6 V、またはT 3 6 6 W から選択される。1つの実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、約75 以上 の融解温度 (T m) を有し、ヘテロ二量体は、約90 % 以上の純度を有する。

【0055】

ヘテロ二量体 F c 領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單ードメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、F 4 0 5 の位置にアミノ酸修飾、ならびにアミノ酸修飾 L 3 5 1 Y および Y 4 0 7 V を含む第1の C H 3 ドメインポリペプチドを含み、第2の C H 3 ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾 T 3 9 4 W を含む、単離ヘテロ多量体が、別の実施形態において提供される。1つの態様において、第1の C H 3 ドメインポリペプチドまたは第2の C H 3 ドメインポリペプチドは、K 3 9 2、T 4 1 1、T 3 6 6、L 3 6 8、または S 4 0 0 の位置にアミノ酸修飾を含む。F 4 0 5 の位置のアミノ酸修飾は、F 4 0 5 A、F 4 0 5 I、F 4 0 5 M、F 4 0 5 T、F 4 0 5 S、F 4 0 5 V、または F 4 0 5 W である。K 3 9 2 の位置のアミノ酸修飾は、K 3 9 2 V、K 3 9 2 M、K 3 9 2 R、K 3 9 2 L、K 3 9 2 F、または K 3 9 2 E である。T 4 1 1 の位置のアミノ酸修飾は、T 4 1 1 N、T 4 1 1 R、T 4 1 1 Q、T 4 1 1 K、T 4 1 1 D、T 4 1 1 E、または T 4 1 1 W である。S 4 0 0 の位置のアミノ酸修飾は、S 4 0 0 E、S 4 0 0 D、S 4 0 0 R、または S 4 0 0 K である。T 3 6 6 の位置のアミノ酸修飾は、T 3 6 6 A、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 S、T 3 6 6 C、T 3 6 6 V、または T 3 6 6 W である。L 3 6 8 の

10

20

30

40

50

位置のアミノ酸修飾は、L 3 6 8 D、L 3 6 8 R、L 3 6 8 T、L 3 6 8 M、L 3 6 8 V、L 3 6 8 F、L 3 6 8 S、およびL 3 6 8 Aである。

【0056】

別の実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含む第1のCH3ドメインポリペプチドを含み、第2のCH3ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾T 3 9 4 Wを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。1つの態様において、第2のCH3ドメインポリペプチドは、アミノ酸修飾T 3 6 6 LまたはT 3 6 6 Iを含む。

【0057】

なお別の実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾Y 3 4 9 C、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vのうちの少なくとも1つを含む第1のCH3ドメインポリペプチドを含み、第2のCH3ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾T 3 6 6 I、K 3 9 2 M、およびT 3 9 4 Wを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0058】

ある特定の実施形態において、二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含む第1のCH3ドメインポリペプチドを含み、第2のCH3ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾K 3 9 2 MおよびT 3 9 4 W、ならびにT 3 6 6 LおよびT 3 6 6 Iの一方を含む、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0059】

別の実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾F 4 0 5 AおよびY 4 0 7 Vを含む第1のCH3ドメインポリペプチドを含み、第2のCH3ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾T 3 6 6 LおよびT 3 9 4 Wを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0060】

別の実施形態において、ヘテロ二量体Fc領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、アミノ酸修飾F 4 0 5 AおよびY 4 0 7 Vを含む第1のCH3ドメインポリペプチドを含み、第2のCH3ドメインポリペプチドが、アミノ酸修飾T 3 6 6 IおよびT 3 9 4 Wを含む、単離ヘテロ多量体が提供される。ヘテロ多量体のある特定の実施形態において、二重特異的抗体または多特異的抗体が提供される。

【0061】

別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体と薬学的に許容される担体とを含む組成物が提供される。

【0062】

別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体をコードする核酸を含む宿主細胞が提供される。

【0063】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体による標的結合が、少なくとも1つの他の治療抗体と競合的であるヘテロ多量体が提供される。1つの態様において、治療抗体は、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ

10

20

30

40

50

、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テブリズマブ、トリリズマブ／アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、Proxinium、Rencarex、ウステキヌマブ、およびザルツムマブからなる群から選択される。

【0064】

本発明のヘテロ多量体の別の実施形態では、癌抗原により特徴付けられる癌を有する患者において癌を治療する方法であって、当該患者に治療有効量のヘテロ多量体を投与することを含む方法が提供される。

【0065】

本発明のヘテロ多量体の別の実施形態では、免疫抗原により特徴付けられる免疫障害を有する患者において免疫障害を治療する方法であって、当該患者に治療有効量のヘテロ多量体を投与することを含む方法が提供される。 10

【0066】

なお別の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 Fc 領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、変種 CH3 ドメインが、表 1、表 6、または表 7 に列記されている変種から選択される、単離ヘテロ多量体が提供される。

【0067】

ある特定の実施形態において、重鎖免疫グロブリンのクラスに属する修飾抗イディオタイプ抗体を含むヘテロ多量体が提供される。そのような抗イディオタイプは、ヒトまたは動物イディオタイプに対して産生され得る。これらの抗イディオタイプの特性は、これらを、特に糖タンパク質または糖脂質に対するワクチン接種において、炭水化物がエピトープを決定する場合に、イディオタイプワクチンとして使用できることである。 20

【0068】

本明細書に記載されているヘテロ多量体がクローンされた細胞または生物体であって、当該ヘテロ多量体が、二量体 Fc 領域の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む、細胞または生物体が、本明細書において提供される。そのような細胞または生物体は、所望の事前に選択された特異性、または対応する特定のレパートリーを有するヘテロ多量体を産生する目的に使用され得る。これらは、また、それらが発現された細胞の代謝を修飾する目的で産生され得る。一実施形態において、ヘテロ二量体の少なくとも 1 つの単量体に結合している少なくとも 1 つの單一ドメイン抗原結合構築物を含むヘテロ多量体は、植物細胞、特に遺伝子導入植物において産生される。 30

[本発明1001]

少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体 Fc 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、前記免疫グロブリンヘテロ二量体 Fc 領域が、2 つの単量体 Fc ポリペプチドを含み、前記單一ドメイン抗原結合構築物が、一方の単量体 Fc ポリペプチドに結合し、

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、未変性ホモ二量体 Fc 領域に匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体 Fc 領域の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 CH3 ドメインを含み、 40

前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンの第1の定常 (CH1) 領域を欠いている、単離ヘテロ多量体。

[本発明1002]

一方の単量体 Fc ポリペプチドに結合している1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む、本発明1001の単離ヘテロ多量体。

[本発明1003]

一方の単量体 Fc ポリペプチドに結合している1つの單一ドメイン抗原結合構築物と、他方の単量体 Fc ポリペプチドに結合している第2の単一ドメイン抗原結合構築物とを含

50

む、本発明1001の単離ヘテロ多量体。

[本発明1004]

両方の單一ドメイン抗原結合構築物が同じエピトープに結合する、本発明1003の単離ヘテロ多量体。

[本発明1005]

前記1つの單一ドメイン抗原結合構築物が1つのエピトープに結合し、前記第2の單一ドメイン抗原結合構築物が異なるエピトープに結合する、本発明1003の単離ヘテロ多量体。

[本発明1006]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、單一ドメイン抗体 (s d A b または V H)、ラクダ科動物のナノボディ (V_h H)、軟骨魚類 (V_{N A R})、S H3誘導性フィノマー、およびフィブロネクチン誘導性結合ドメインから選択される、本発明1001～1005のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1007]

前記單一ドメイン抗原結合構築物がラクダ科動物のナノボディ (V_h H) である、本発明1001～1006のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1008]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、I L 2、I F N a - 2 a / b、I F N - 1 a / b、I L - 21、I L - 17 a、T N F、I L 23、V E G F、およびA N G 2から選択される1つ以上のサイトカインまたはケモカインに結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

10

[本発明1009]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、E p C a m、E G F R、V E G F R、C E A、またはG P 100のような1つ以上の腫瘍関連抗原に結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1010]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、C D 16、C D 30、C D 137、C D 22、C D 52、C D 80、C D 23、C D 2、C D 4、C D 40、K I R、C D 32 b、C D 25、L A G 3、またはB 7 - H 3のような1つ以上の免疫調節抗原に結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

20

[本発明1011]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素Bのような1つ以上の細菌性毒素に結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

30

[本発明1012]

前記單一ドメイン抗原結合構築物がE G F R 1に結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1013]

前記單一ドメイン抗原結合構築物がE G F R 1突然変異変種E G F R v I I Iに結合する、本発明1001～1007のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1014]

ヘテロ二量体F c領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、前記ヘテロ二量体F c領域が、未変性ホモ二量体F cに匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種C H 3領域を含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いている、単離ヘテロ多量体。

40

[本発明1015]

ヘテロ二量体F c領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、前記ヘテロ二量体F c領域が、未変性ホモ二量体F cに匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種定常ドメインを含み、

50

前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いている、単離ヘテロ多量体。

[本発明1016]

ヘテロ二量体 Fc 領域の少なくとも1つの単量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む単離ヘテロ多量体であって、

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、未変性ホモ二量体 Fc 領域に匹敵する安定性を有する前記ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種定常ドメインを含み、前記単離ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンの第1の定常 (CH1) 領域を欠いている、単離ヘテロ多量体。

[本発明1017]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、ラクダ科動物または軟骨魚類から誘導される、本発明1014～1016のいずれかの単離ヘテロ多量体。

10

[本発明1018]

前記ラクダ科動物がラマである、本発明1017の単離ヘテロ多量体。

[本発明1019]

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、安定性を増加したヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 CH3ドメインを形成する第1および第2の Fc ポリペプチドを含み、前記アミノ酸突然変異が、アミノ酸突然変異を含まない CH3ドメインと比較して安定性を増加したヘテロ二量体 Fc 領域の形成を促進し、前記変種 CH3ドメインが、約70以上の融解温度 (Tm) を有する、本発明1001～1018のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1020]

20

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、野生型 Fc 領域と比べて CH3ドメインに追加のジスルフィド結合を含まない、本発明1001～1019のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1021]

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、野生型 Fc 領域と比べて前記変種 CH3ドメインに追加のジスルフィド結合を含むが、但し、前記 CH3ドメインの約70 を超える前記融解温度 (Tm) が前記追加のジスルフィド結合の不在下のものであることを条件とする、本発明1019または1020の単離ヘテロ多量体。

[本発明1022]

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、約90%を超える純度を有する、本発明1019～1021のいずれかの単離ヘテロ多量体。

30

[本発明1023]

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、約98%以上の純度を有する、本発明1019～1022のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1024]

前記 Tm が約74 以上である、本発明1019～1023のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1025]

第1の CH3ドメインポリペプチドが、F405およびY407の位置にアミノ酸修飾を含み、第2の CH3ドメインポリペプチドが、T394の位置にアミノ酸修飾を含む、本発明1019～1024のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1026]

40

前記第1の Fc ポリペプチドが、L351Y、Y405A、およびY407V から選択される1つ以上のアミノ酸修飾を含み、前記第2の Fc ポリペプチドが、T366L、T366I、K392L、K392M、およびT394W から選択される1つ以上のアミノ酸修飾を含む、本発明1019～1025のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1027]

第1の Fc ポリペプチドが、D399およびY407の位置にアミノ酸修飾を含み、第2の Fc ポリペプチドが、K409およびT411の位置にアミノ酸修飾を含む、本発明1019～1026のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1028]

前記ヘテロ二量体 Fc 領域が、

50

野生型 C H3 ドメインポリペプチドと比較して少なくとも3つのアミノ酸修飾を含む第1の修飾 C H3 ドメインを含む第1の単量体 F c ポリペプチド、および野生型 C H3 ドメインポリペプチドと比較して少なくとも3つのアミノ酸修飾を含む第2の修飾 C H3 ドメインを含む第2の単量体 F c ポリペプチド、を含み、

前記第1および第2の C H3 ドメインの一方が、K 392 J にアミノ酸修飾を含み、J が、L、I、M、または側鎖量がKの側鎖量より大幅に大きくなりないアミノ酸から選択され、前記第1および第2の修飾 C H3 ドメインポリペプチドが、少なくとも約74 の融解温度 (Tm) および少なくとも95% の純度を有するヘテロ二量体 C H3 ドメインを優先的に形成し、少なくとも1つのアミノ酸修飾が、前記第1と前記第2の C H3 ドメインポリペプチドの間の界面にあるアミノ酸のものではない、本発明1001～1027のいずれかの単離ヘテロ多量体。

10

[本発明1029]

少なくとも1つの T 350 X 修飾を含み、X が、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびその誘導体、または変種から選択される天然または非天然のアミノ酸である、本発明1019～1028のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1030]

少なくとも1つの T 350 V 修飾を含む、本発明1019～1029のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1031]

前記第1および第2の F c ポリペプチドが、それぞれ、T 350 V 修飾を更に含む、本発明1019～1030のいずれかの単離ヘテロ多量体。

20

[本発明1032]

前記修飾 C H3 ドメインが約77 以上の Tm を有する、本発明1031の単離ヘテロ多量体。

[本発明1033]

少なくとも1つの単量体 F c ポリペプチドが、修飾 S 400 Z を含み、Z が、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸から選択される、本発明1019～1032のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1034]

前記第1の F c ポリペプチドが、S 400 E、S 400 D、S 400 K、および S 400 R から選択されるアミノ酸修飾を含む、本発明1033の単離ヘテロ多量体。

30

[本発明1035]

前記第1および第2の F c ポリペプチドの一方が、S 400 E および S 400 R から選択される前記アミノ酸修飾を含み、他方の F c ポリペプチドが、N 390 の位置にアミノ酸修飾を含む、本発明1034の単離ヘテロ多量体。

[本発明1036]

修飾 N 390 Z を含み、Z が、正荷電アミノ酸および負荷電アミノ酸から選択される、本発明1035の単離ヘテロ多量体。

[本発明1037]

前記第2の F c ポリペプチドが、アミノ酸修飾 N 390 R または N 390 K を含む、本発明1035の単離ヘテロ多量体。

40

[本発明1038]

前記第1の F c ポリペプチドが、前記アミノ酸修飾 S 400 E を含む修飾 C H3 ドメインポリペプチドであり、前記第2の F c ポリペプチドが、前記アミノ酸修飾 N 390 R を含む修飾 C H3 ドメインポリペプチドである、本発明1019～1037のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1039]

一方の前記 F c ポリペプチドがアミノ酸修飾 Q 347 R を含み、他方の F c ポリペプチドがアミノ酸修飾 K 360 E を含む、本発明1001～1038のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1040]

前記 F c ポリペプチドアミノが、T 366 V、T 366 I、T 366 A、T 366 M、T 366 L、K 409 F、T 411 E、および T 411 D から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、前

50

記第2の Fc ポリペプチドが、L 351Y、Y 407A、Y 407I、Y 407V、D 399R、およびD 399K から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、本発明1001～1039のいずれかの単離ヘテロ多量体、

[本発明1041]

前記ヘテロ二量体Fc領域が、Fcガンマ受容体への選択的結合を促進する非対称アミノ酸修飾を含む変種CH2ドメインを更に含む、本発明1001～1040のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1042]

前記変種CH2ドメインが、野生型CH2ドメインと比較して、FcガンマIIIa受容体に選択的に結合する、本発明1001～1041のいずれかの単離ヘテロ多量体。

10

[本発明1043]

G型免疫グロブリン(IgG)に基づいたFc構築物を含む、本発明1001～1042のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1044]

前記IgGが、IgG1、IgG2IgG3、およびIgG4のうちの1つである、本発明1043の単離ヘテロ多量体。

[本発明1045]

免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンD(IgD)、または免疫グロブリンE(IgE)に基づいたFc構築物を含む、本発明1001～1044のいずれかの単離ヘテロ多量体。

20

[本発明1046]

前記ヘテロ多量体が、二重特異的抗体または多特異的抗体である、本発明1001～1045のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1047]

少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物が、EGFRまたはEGFRvIIIに結合する、本発明1001～1046のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1048]

前記EGFRまたはEGFRvIII結合構築物が、抗体またはそのフラグメントから誘導される、本発明1047の単離ヘテロ多量体。

30

[本発明1049]

前記EGFRまたはEGFRvIII結合構築物が、重鎖抗体構築物である、本発明1047の単離ヘテロ多量体。

[本発明1050]

前記重鎖抗体構築物がラクダ科動物の構築物である、本発明1049の単離ヘテロ多量体。

[本発明1051]

前記ラクダ科動物の構築物が、図44に示される配列を含む、本発明1050の単離ヘテロ多量体。

[本発明1052]

本発明1001～1051のいずれかの単離ヘテロ多量体および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

40

[本発明1053]

本発明1001～1051のいずれかの単離ヘテロ多量体をコードする核酸を含む、哺乳類宿主細胞。

[本発明1054]

前記單一ドメイン抗原結合構築物が、少なくとも1つの治療抗体と結合を競合する、本発明1001～1051のいずれかの単離ヘテロ多量体。

[本発明1055]

前記少なくとも1つの治療抗体が、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、ダクリズ

50

マブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツスマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツスマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツスマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テプリズマブ、トシリズマブ／アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツスマブ、Proxinium(商標)、Ren carex(商標)、ウステキヌマブ、およびザルツムマブからなる群から選択される、本発明1054の単離ヘテロ多量体。

[本発明1056]

癌抗原により特徴付けられる癌を有する患者において癌を治療する方法であって、前記患者に治療有効量の本発明1001～1051のいずれかの単離ヘテロ多量体を投与することを含む、前記方法。

10

[本発明1057]

前記癌が、EGFRまたはEGFRvIIIの過剰発現により特徴付けられる、本発明1056の方法。

[本発明1058]

EGFRまたはEGFRvIIIを過剰発現する癌細胞を治療する方法であって、前記細胞を本発明1047～1051のうちのいずれかにおいて提供される、ある量のヘテロ多量体と接触させることを含む、方法。

20

[本発明1059]

前記癌細胞が、乳癌細胞、肺癌細胞、肛門癌細胞、および神経膠芽腫のうちの少なくとも1つである、本発明1058の方法。

[本発明1060]

別の治療分子に加えて、前記ヘテロ多量体を投与することを含む、本発明1056～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

前記治療分子がヘテロ多量体と複合体化している、本発明1060の方法。

[本発明1062]

免疫抗原により特徴付けられる免疫障害を有する患者において免疫障害を治療する方法であって、前記患者に治療有効量の本発明1001～1051のいずれかの単離ヘテロ多量体を投与することを含む、前記方法。

30

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】CH3(上部)、CH2(中間)、および受容体領域を示す野生型抗体の図解三次元構造である。左側の点線の長方形は、右側に拡大されており、CH3の標的領域の2つの領域である領域1および領域2を示す。

【図2】368の位置に野生型残基を示す図解三次元表示である。

【図3】突然変異位置368を示す領域1の図解三次元表示である。

【図4】領域2における追加の突然変異の図解三次元表示である。

【図5】最初の3つの変種AZ1、AZ2、およびAZ3の衝突スコア、界面面積の差、詰め込みの差、静電エネルギーの差、および全体的な「親和性」スコアのコンピューターによる計算の表である。

40

【図6】変種AZ1上に「構築」された変種AZ2およびAZ3を示している図解三次元像を示す。

【図7】AZ2およびAZ3変種の図解三次元表示である。

【図8】図5の表を示しているが、AZ1、AZ2、およびAZ3ヘテロ二量体、ならびに潜在的なホモ二量体を示す。親和性スコアは、関連性がないのでホモ二量体では示されていない。

【図9】野生型(左)および突然変異AZ4(右)の三次元表示の図解表示である。

【図10】AZ4ヘテロ二量体および潜在的なホモ二量体のコンピューターによる計算を

50

示す図5と同じ表である。

【図11】C H 3変種AZ5(左)およびAZ6(右)の図解表示である。

【図12】AZ4、AZ5、およびAZ6のコンピューターデータを示す、図5に記載されている表である。

【図13】ヘテロ二量体の手法を使用した受容体領域での結合特性の可能性の図を伴う、抗体の左側の図解三次元表示である。

【図14】IgG分子の概略表示である。

【図15】Fc受容体の複数配列の整列を示す。Genebank/Uniprot配列番号: Fc RIIIA(s p P12318)、Fc RIIIB(s p P31994)、Fc RIIIC(g i 126116592)、Fc RIIIA(s p P08637)、Fc RIIIB(s p O75015)。

【図16】Fc-Fc RIIIB複合体[PDB ID: 1T83, Radaev & Sun]の結晶構造の概略図である。FcとFc受容体との1:1複合体が、FcおよびFc Rの2つの鎖の間の非対称接触を伴って観察される。

【図17】本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成される非対称Fc足場に基づいた多機能性分子:非対称Fc足場および非対称Fc単量体IgG腕の概略図を示す。

【図18】本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成される非対称Fc足場に基づいた多機能性分子:非対称Fc単一特異性IgG腕および非対称Fc二重特異性IgG腕(共通軽鎖)の概略図を示す。

【図19】本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成される非対称Fc足場に基づいた多機能性分子の図を示す。非対称Fc二重特異性IgG腕、および毒素のような機能性分子。

【図20】本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成される非対称Fc足場に基づいた多機能性分子:非対称Fc单一scFv腕および非対称Fc二重特異性scFv腕を図示する。

【図21】本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成される非対称Fc足場に基づいた代替的多機能性分子:非対称Fc三重特異性scFv腕および非対称Fc四重特異性scFv腕を図示する。

【図22】Fc R選択性が、Fc R相互作用を増殖面に、野生型様相互作用を非増殖面により良好に導入するために、Fcの一面に突然変異の非対称設計を示す。Fcの非増殖面における突然変異は、増殖面のみと相互作用するように、Fc Rとの相互作用を阻止し、Fcの極性を偏らせるために導入することができる。

【図23】野生型ヒトIgG1のアミノ酸配列を示す。

【図24】下記に詳細に記載されているように、積極的および消極的設計戦略を組み合わせた、Fcヘテロ二量体設計の繰り返し工程処理を示す。

【図25】図25A~25Cは、ヘテロ二量体の純度を決定するために使用されるインビトロアッセイを示す。アッセイは、異なる分子量の2つのFc重鎖を有する完全長单一特異性抗体足場に基づいており、重鎖Aは、C末端Hisタグ(His)を有し、重鎖Bは、C末端切断性mRFPタグ(RFP)を有する。2つの重鎖A(His)およびB(RFP)は、固定量の軽鎖と一緒に、異なる相対比で発現し、異なる分子量の3つの可能な二量体種を生じる。a)ホモ二量体鎖A(His)/鎖A(His)(約150kDa)、b)ヘテロ二量体鎖A(His)/鎖B(RFP)(約175kDa)、c)ホモ二量体鎖B(RFP)/鎖B(RFP)(約200kDa)。発現した後、実施例2に記載されているように、2つのホモ二量体に対するヘテロ二量体の比は、非還元的SDS-PAGEにより決定し、これは、3つの二量体種を分子量によって分けることを可能にする。SDS-PAGEゲルは、クーマシーブリリアントブルーにより染色した。図25A:試験した変種は、WT鎖A(His)のみ、WT鎖B(RFP)のみ、WT鎖A(His)+鎖B(RFP)、報告されたヘテロ二量体の純度が>95%を有する、対照1鎖A(His)+鎖B(RFP)であった。二量体バンドの組成は、抗体を向けた上記に例示され

10

20

30

40

50

た Ig G - Fc (抗Fc)、mRFPタグ (抗mRFP)、およびHisタグ (抗His) を用いるウエスタンプロットにより確認した。SDS-PAGEは、His/Hisホモ二量体では単一バンド、His/RFPヘテロ二量体では二重バンド、RFPホモ二量体では多重バンドを示す。多重バンドは、mRFPタグの人為産物であり、Fcヘテロ二量体の物理的特性に影響を与えないことが確認されている。図25B: SDS-PAGE アッセイは、公表されたFcヘテロ二量体変種対照1~4を対照として確認した。表Aを参照すること。変種を、鎖A (His) 対鎖B (RFP) の異なる相対比で発現させた。具体的には、比1:3は、LC、HC_His、HC_mRFP比の25%、10%、65%と、比1:1は、25%、20%、55%と、および比3:1は25%、40%、35%と、それぞれ等しい (鎖A (His) と鎖B (RFP) の見掛けの1:1の発現は、WT_Fcでは20%/55% (His/RFP) に近いことが決定されている)。図25Cは、足場1変種のヘテロ二量体純度を決定する非還元的SDS-PAGEアッセイを示す。ヘテロ二量体を、鎖A (His) 対鎖B (RFP) の異なる相対比で発現させ、図2に記載されているように、非還元的SDS-PAGEにより分析した。具体的には、比1:3は、LC、HC_His、HC_mRFP比の25%、10%、65%と、比1:1は、25%、20%、55%と、および比3:1は25%、40%、35%と、それぞれ等しい (鎖A (His) と鎖B (RFP) の見掛けの1:1の発現は、WT_Fcでは20%/55% (His/RFP) に近いことが決定されている)。

【図26】図26A~26Bは、鎖A (His) 対鎖B (RFP) の特定の相対比で発現させ、(表2を参照すること)、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製され、図25A~25Cに記載されているように、非還元的SDS-PAGEにより分析された、Fcヘテロ二量体変種を示す。図26Aは、SDS-PAGEの結果の目視検査により観察される純度に基づいたヘテロ二量体の分類を例示する。比較として、等量のプロテインA精製産物をゲルに装填した。非還元的SDS-PAGEに基づいた純度の定義は、選択された変種に対するLC/MSにより確認した(図28を参照すること)。図26Bは、選択されたプロテインA精製ヘテロ二量体変種 (AZ94、AZ86、AZ70、AZ33、およびAZ34) の例示的なSDS-PAGEの結果を提供する。

【図27】図27A~27Bは、本明細書に記載されているヘテロ二量体変種により形成されたヘテロ二量体CH3-CH3ドメインの融解温度を決定するためのDSC分析を例示する。2つの独立した方法を使用して、融解温度を決定した。図27Aは、4つの独立した非2状態遷移に当たる、かつHercaptinの約72 (CH2) および約82 (Fab) の報告された文献の値に近いCH2およびFabの遷移の値を生じるように最適化された温度記録を提供する。図27Bは、ヘテロ二量体変種がWTから差し引かれて、CH3遷移のためだけに正および負のピーク差を生じるように、正規化され、かつベースラインが修正された温度記録を示す。

【図28】実施例2に記載された変種の例のAZ70のLC/MS分析を例示する。グリコシル化ヘテロ二量体およびホモ二量体の予測(平均計算)質量が示されている。ヘテロ二量体質量と一致する領域は、グリシンの欠失 (-57Da)、および1または2つのヘキソースの付加(それぞれ、+162Daおよび+324Da)に対応する主要なピークを含有する。ヘテロ二量体純度は、いずれかのホモ二量体に対応する有意なピークがない場合、>90%と分類される。

【図29】図29A~29Dは、図29AのWT_Fc、図29BのAZ6、図29CのAZ33、図29DのAZ19のCH3界面を示す。発明を実施するための形態に記載されている包括的なコンピューター分析、および変種とWTとの比較は、初期AZ33ヘテロ二量体の安定性がWTより低い理由の1つが、Y407およびT366のコア相互作用/詰め込みの欠失であることを示した。初期AZ33は、図29Bに例示されているように、この疎水性コアにおける非最適詰め込みを示し、この領域、特にT366の位置の最適化が、AZ33の安定性を改善することを示唆している。このことは、図29Cおよび図29DのT366IおよびT366Lにおいて例示されている。実験データは、この構造分析と相関し、T366LがTmに最大の改善を与えたことを示す。実施例5を参照す

ること。

【図30】立体配座動力学分析の有用性および重要性を説明し、初期足場1変種AZ8により例示されている。コンピューターによる突然変異誘発の後の構造(WTに近い主鎖立体配座)が、50ns分子動力学シミュレーション分析の代表的な構造と重ね合わされている。図は、AZ8変種とWTのループ領域D399-S400における大きな立体配座の差を強調し、その結果として、これらは疎水性コアを溶媒に曝露し、AZ8ヘテロ二量体の安定性を減少させる。

【図31】図31A～31Cは、包括的なコンピューター分析およびMDシミュレーションの情報が、記載されている積極的設計戦略にどのように使用されているかを例示する。図30に例示されているように、AZ8の安定性がWTよりも低い理由の1つは、ループ399-400と409との弱められた相互作用であり、これは主にF405詰め込み相互作用の欠失に起因する(図31A(WT)と図31B(AZ8)の比較を参照すること)。積極的設計戦略の1つは、399-400ループ立体配座を安定化するため、領域の疎水性詰め込みを最適化することである。このことは、図31Cに例示されている、K392Mの突然変異により達成された。図31Cは、ヘテロ二量体AZ33を表し、これは、初期消極的設計変種AZ8の68°に対して74°のTmを有する。

【図32】図32A～32Bは、分子動力学軌道の主成分分析を使用して観察された、Fc分子の動力学を例示する。図32Aは、基準としてのFc構造の主鎖追跡を示す。図32BおよびCは、Fc構造における最大2つの主な運動様式に沿って観察された動力学の上書きを表す。鎖AおよびBのCH2ドメインは、互いにに対して有意な開放/閉鎖運動を示し、一方、CH3ドメインは、比較的剛性である。CH3界面における突然変異は、CH2ドメインにおける開放/閉鎖運動の相対的な柔軟性および動力学に影響を与える。

【図33】図33A～33Cは、WTと比べた2つの足場2変種の疎水性コア詰め込みを例示する。図33A WT Fc、図33B AZ63、および図33C AZ70。初期足場2変種の包括的なコンピューター分析は、Y-407-T366のコアWT相互作用の欠失が、初期足場2変種の安定性がWTより低い理由の1つであることを示唆した。Y407-T366の欠失は、突然変異K409Fにより部分的に代償されるが、図33Bに例示されているように、特にT366A突然変異は疎水性コアに空洞を残し、これは、WTと比べて変種を不安定化する。この疎水性コアを追加の突然変異T366V_L351Yにより標的にすることは、図33CにおいてAZ70により示されているように、成功していることが証明されており、AZ70は、75.5のTmが実験的に決定されている。表4および実施例6を参照すること。

【図34】図34A～34Cは、WTと比べた2つの足場2変種のループ399-400の相互作用を例示する。図34A WT Fc、図34B AZ63、および図34C AZ94。初期足場2変種の包括的なコンピューター分析は、突然変異K409Fに起因するWT塩架橋K409-D399の損失(図34A)、したがって不十分なD399(図34B)が、399-400ループのより「開放された」立体配座をもたらすことを示唆した。このことは、疎水性コアのより大きな溶媒曝露を更にもたらし、WTと比べて変種を更に不安定化する。399-400ループを安定化し、かつK409-D399相互作用の損失を補うために用いられる戦略の1つは、変種AZ94について図34Cに例示されているように、追加の塩架橋D399R-T411EおよびS400R-K392Eの設計であった。実験データは、>95%の純度および74のTmを示した。表4および実施例6を参照すること。更に、AZ94は、初期足場2変種より顕著に高い純度および安定性(<90%の純度、71のTm)を有するが、AZ94の疎水性コア突然変異は、変種AZ70において特定された「最良の」疎水性コア突然変異よりも好ましくない(図33)。AZ70の疎水性コアにおける突然変異(T366V_L351Y)は、ループ399-400におけるAZ94の塩架橋突然変異から遠位にあるので、AZ70アミノ酸突然変異と追加のAZ94突然変異との組み合わせは、AZ70またはAZ94よりも高い融解温度を有することが予測される。組み合わせは、実施例1～4に記載されているように試験することができる。

10

20

30

40

50

【図35】6つのFcガンマ受容体に結合しているホモ二量体 IgG1 Fc、ヘテロ二量体変種het1(対照1)：A：Y349C_T366S_L368A_Y407V/B：S354C_T366W、およびhet2(対照4)：A：K409D_K392D/B：D399K_D356Kの会合定数(Ka(M⁻¹))を例示する。ヘテロ二量体は、野生型IgG1 Fcと比較して、Fcガンマ受容体への僅かに変化した結合を示す傾向がある。実施例7を参照すること。

【図36A】野生型結合強度を基準として、IIBF、IIBY、およびIIR受容体への野生型IgG1 Fc、ならびにその変種二量体および非対称突然変異体形態の相対的結合強度を示す。(HomoFc+S267D)は、両方の鎖にS267D突然変異を有するホモ二量体Fcの結合強度を意味する。(Het Fc+非対称S267D)は、Fcの2つの鎖の一方に導入されたS267D突然変異を有するヘテロ二量体Fcの結合強度を意味する。2つのFc鎖のいずれかへの突然変異の導入により得られる結合強度の平均が報告されている。1つの鎖へのこの突然変異の導入は、結合強度を、ホモ二量体の方法における同じ突然変異において観察される強度のほぼ半分に低減した。(Het Fc+非対称S267D+非対称E269K)は、2つのFc鎖の一方に非対称的な方法で導入されたS267DおよびE269Kの両方の突然変異を有するヘテロ二量体Fcの結合強度を意味する。E269K突然変異は、FcgRとFcの面の1つとの相互作用を阻止し、結合強度を、それ自体により、非対称S267D変種(Het Fc+S267D)において観察されたもののほぼ半分にすることができる。ここでHet Fcは、図35の変種het2(対照4)について示されているように、CH3突然変異により構成されている。

【図36B】多様なFcおよび多数のFcgRIIa、FcgRIIb、およびFcgRIIIaアロタイプを有するその変種の会合定数(Ka(M⁻¹))を示す。多様なFcg受容体への野生型IgG1のKaは、水平網掛けの縦棒により表されている。垂直網掛けの棒(ホモ二量体塩基2)は、突然変異S239D/D265S/I332E/S298Aを有するホモ二量体FcのKaを表す。斜線網掛けの縦棒は、CH2ドメインにおける非対称突然変異A：S239D/D265S/I332E/E269KおよびB：S239D/D265S/S298Aを有するヘテロ二量体FcのKaを表す。非対称突然変異の導入は、IIIAとIIa/IIbの受容体の間における選択性の増加を達成することができる。ここでヘテロ二量体Fcは、図35の変種het2(対照4)について示されているように、CH3突然変異から構成されている。

【図36C】野生型IgG1と、Fc領域のCH2ドメインにおけるホモ二量または非対称突然変異を伴う他の3つの構築物との会合定数(Ka(M⁻¹))を示す。野生型FcのKaは、格子の網掛け縦棒により表されている。Fcの両方の鎖にホモ二量体の方法で導入された塩基突然変異S239D/K326E/A330L/I332E/S298Aを有するFc変種(ホモ二量体塩基1)のKaは、斜線パターン縦棒により示されている。ヘテロ二量体Fcの鎖AおよびBへの非対称的方法による関連突然変異の導入(ヘテロ塩基1)は、水平線により示されている。垂直網掛け線の縦棒は、E269K突然変異を含む非対称変種(ヘテロ塩基1+PD)を表す。ここでヘテロ二量体Fcは、図35の変種het2(対照4)について示されているように、CH3突然変異から構成されている。

【図37】-表6は、足場1について実施例5に記載されている第3設計段階に基づいた変種CH3ドメインのリストである。

【図38】-表7は、足場2について実施例6に記載されている第3設計段階に基づいた変種CH3ドメインのリストである。

【図39】図39A～39Bは、LC/MSを使用した、C末端タグを有さない変種の純度決定を例示する。図39Aは、1つの代表的な変種(AZ162:L351Y_F405A_Y407V/T366L_K392L_T394W)のLC/MSスペクトルを示す。変種は、重鎖Aと重鎖Bの3つの異なる比の1：1.5(AZ133-1)、1：1(AZ133-2)、および1.5：1(AZ133-3)を使用して、実施例において

10

20

30

40

50

記載されている一過性同時発現により発現させた。試料を精製し、Endo Sにより37で1時間、脱グリコシル化した。MS分析の前に、試料をPoros R2カラムに注入し、20~90%のACNによる勾配、0.2%のFAで3分間溶出した。LCカラムのピークを、LTQ-Orbitrap XL質量分析器(コーン電圧:50V、管レンズ:215V、FT解像度:7,500)により分析し、ソフトウェアPromassと統合して、分子量プロフィールを生成した。図39Bは、対照2試料のLC/MSスペクトルを示し、これはKnobbs-into-Holesの変種を表す。変種は、重鎖Aと重鎖Bの3つの異なる比の1:1.5(対照2-1)、1:1(対照2-2)、および1.5:1(対照2-3)を使用して、実施例において記載されている一過性同時発現により発現させた。試料を精製し、Endo Sにより37で1時間、脱グリコシル化した。MS分析の前に、試料をPoros R2カラムに注入し、20~90%のACNによる勾配、0.2%のFAで3分間溶出した。LCカラムのピークを、LTQ-Orbitrap XL質量分析器(コーン電圧:50V、管レンズ:215V、FT解像度:7,500)により分析し、ソフトウェアPromassと統合して、分子量プロフィールを生成した。

【図40】CH3ドメイン配列の多重配列整列を提供する。異なる主のCH3配列は、ヒトIgG1基準およびEu番号付けスキームに従って番号付けされる。ヘテロ二量体形成を達成するために突然変異された残基は、鎖_Aには*、鎖_Bには+を付けた。足場1の突然変異には、鎖_A:(350V)_351Y_405A_407V、および鎖_B:(350V)_366L_392L_394Wが含まれる。配列整列において灰色および黒色枠により例示されている、それぞれの種の対応する位置を突然変異させて、IgG1様の方法により高純度でヘテロ二量体を形成することができる。種の説明:IgG1_ヒト(ホモサピエンス)、IgG2a_ラクダ カメルス・ドロメダリウス(Camelus dromedarius)(ヒトコブラクダ)、IgG3_ラクダ カメルス・ドロメダリウス(Camelus dromedarius)(ヒトコブラクダ)、IgG2a_ラマ ラマ・グラマ(Lama glama)(ラマ)、IgG3_ラマ ラマ・グラマ(Lama glama)(ラマ)、IgG2a_マウス ムス・ムスクリス(Mus musculus)(ハツカネズミ)、IgG1_マウス ムス・ムスクリス(Mus musculus)(ハツカネズミ)、IgG3_マウス ムス・ムスクリス(Mus musculus)(ハツカネズミ)、IgG_ウサギ オリクトラグス・クニクルス(Oryctolagus cuniculus)(ウサギ)、IgG1_ヒツジ(Ovis aries)(オビス アリエス)(ヒツジ)、IgG2a_ラット ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)(ドブネズミ)、IgG1_ラット ラッタス・ノルベギクス(Rattus norvegicus)(ドブネズミ)、IgY_ニワトリ ガルス・ガルス(Gallus gallus)(ニワトリ)。

【図41】例示的なヘテロ二量体のSDS-PAGE分析を描いている。

【図42】例示的なヘテロ二量体のUPLC分析を描いている。

【図43】EGFRに結合する例示的なヘテロ二量体の能力を描いている。

【図44】EGFRに結合するsdabの核酸配列を描いている。

【発明を実施するための形態】

【0070】

ヘテロ多量体の形成を促進する特定のアミノ酸修飾を含む修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体FC領域の少なくとも1つの单量体に結合している少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む单離ヘテロ多量体であって、当該单離多量体が、免疫グロブリン軽鎖を欠いており、場合により、免疫グロブリンの第1の定常(CH1)領域および免疫グロブリンの第2の定常(CH2)領域を欠いている、单離ヘテロ多量体が、本明細書において提供される。幾つかの実施形態において、修飾CH3ドメインは、ヘテロ二量体の形成を促進する特定のアミノ酸修飾を含む(例えば、表1.1~1.3を参照すること)。別の実施形態において、修飾CH3ドメインは、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する特定のアミノ酸修飾を含む(例えば、表4、表6、および表7を参照

10

20

30

40

50

すること）。安定性は、C H 3 ドメインの融解温度（T m）として測定され、増加した安定性は、約70以上T mを意味する。C H 3 ドメインは、ヘテロ多量体多特異的抗体のF c領域の一部を形成する。ヘテロ二量体F c領域を含むヘテロ量体であって、ヘテロ二量体F c領域が、ヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む修飾または変種C H 3 ドメインを含み、変種C H 3 ドメインが、表1の列記されている変種から選択される、ヘテロ多量体が、1つの実施形態において本明細書に提供される。第2の実施形態において、ヘテロ二量体F c領域を含むヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体F c領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種C H 3 ドメインを含み、変種C H 3 ドメインが、約70以上の融解温度（T m）を有する、ヘテロ多量体が提供される。

10

【0071】

修飾C H 3 ドメインを生成するために利用されるアミノ酸修飾には、アミノ酸挿入、欠失、置換、および再編成が含まれるが、これらに限定されない。C H 3 ドメインの修飾および修飾C H 3 ドメインは、「C H 3 修飾」、「修飾C H 3 ドメイン」、「変種C H 3 ドメイン」、または「C H 3 変種」と本明細書において集合的に呼ばれる。ある特定の実施形態において、修飾C H 3 ドメインは、選択された分子に組み込まれる。したがって、1つの実施形態において、修飾C H 3 ドメインを組み込むF c領域（本明細書で使用されるとき、「F c領域」および類似の用語は、C H 3 ドメインの少なくとも一部を含む任意の重鎖定常領域ドメインを包含する）を含む、免疫グロブリン（例えば、抗体）および他の結合タンパク質のような分子、例えば、ポリペプチドが提供される。修飾C H 3 ドメイン（例えば、1つ以上のアミノ酸挿入、欠失、置換、または再編成を含むC H 3 ドメイン）を含むF c領域を含む分子は、本明細書において「F c変種」、「ヘテロ二量体」、または「ヘテロ多量体」と呼ばれる。本発明のF c変種は、ヘテロ二量体F c変種または領域を生成するように非対称的に修飾されているC H 3 ドメインを含む。ヘテロ多量体は、2つの重鎖ポリペプチド、鎖Aおよび鎖Bから構成され、これらは交換可能に使用され得るが、但し、それぞれのF c領域が、1つの鎖Aおよび1つの鎖Bポリペプチドを含むこと、ならびに鎖Aおよび鎖Bの少なくとも一方が、重鎖変種領域を含むことが条件である。アミノ酸修飾は、C H 3 に非対称様式で導入され、2つの修飾C H 3 ドメインがF c変種を形成するときにヘテロ二量体をもたらす（例えば、表1を参照すること）。本明細書で使用されるとき、非対称アミノ酸修飾は、1つのポリペプチド（例えば「鎖A」）の特定の位置におけるアミノ酸が、ヘテロ二量体またはF c変種の同じ位置における第2のポリペプチド（例えば、「鎖B」）のアミノ酸と異なる、任意の修飾である。これは、鎖Aおよび鎖Bの2つの異なるアミノ酸に対して、2つのアミノ酸のうちの1つのみの修飾、または両方のアミノ酸の修飾をもたらし得る。変種C H 3 ドメインが1つ以上の非対称アミノ酸修飾を含むことが、理解される。

20

【0072】

定義

本記載において、任意の濃度範囲、百分率範囲、比率範囲、または整数範囲は、特に示されない限り、引用された範囲内の任意の整数の値、適切な場合はその分数（例えば、整数の十分の一および百分の一）を含むことが理解されるべきである。本明細書で使用されるとき、「約」は、特に示されない限り、示されている範囲、値、配列、または構造の±10%を意味する。用語「a」および「a n」は、本明細書で使用されるとき、特に示されない、または文脈によって決まらない限り、列挙された成分の「1つ以上」を意味することが理解されるべきである。代替案（例えば、「または」）の使用は、代替案のいずれかの1つ、両方、または任意の組み合わせを意味することが理解されるべきである。本明細書で使用されるとき、用語「含まれる」および「含む」は、同義的に使用される。加えて、本明細書に記載されている構造および置換基（例えば、変種C H 3 ドメイン）の多様な組み合わせから誘導される個別の単一鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体は、まるでそれぞれの単一鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体が個別に記載されているかのように、同じ程度で本出願に開示されていることが理解されるべきである。したがって、個別の單一

30

40

50

鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体を形成するために特定の成分を選択することは、本開示の範囲内である。

【0073】

「第1のポリペプチド」は、第2のポリペプチドと会合するべき任意のポリペプチドであり、本明細書において「鎖A」とも呼ばれる。第1および第2のポリペプチドは、「界面」において出会う。「第2のポリペプチド」は、第1のポリペプチドと「界面」を介して会合するべき任意のポリペプチドであり、本明細書において「鎖B」とも呼ばれる。当該第1および第2のポリペプチドの少なくとも一方は、少なくとも1つの重鎖可変ドメインを含む。ある特定の実施形態において、少なくとも1つの重鎖可変ドメインは、重鎖抗体から得られる。幾つかの実施形態において、重鎖抗体は、サメのような軟骨魚類、またはラマのようなラクダ科動物から得られる。「界面」は、第2のポリペプチドの界面における1つ以上の「接触」アミノ酸残基と相互作用する、第1のポリペプチドにおける「接触」アミノ酸残基を含む。本明細書で使用されるとき、界面は、Fc領域のCH3ドメインを含む。幾つかの実施形態において、Fc領域は、ヒトIgG₁抗体などであるが、これに限定されないIgG抗体から誘導される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つの重鎖可変ドメインは、リンカーによりCH3ドメインに連結している。

【0074】

本明細書において使用されるとき、「単離」ヘテロ多量体は、天然の細胞培養環境の成分から同定および分離、ならびに/または回収されたヘテロ多量体を意味する。天然環境の汚染成分は、ヘテロ多量体の診断的または治療的使用を妨げる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様溶質が含まれ得る。

【0075】

本明細書で使用されるとき、「未変性Fcホモ二量体に匹敵する安定性」は、Fcヘテロ二量体が未変性ホモ二量体と類似する安定性を有することを意味する。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体の安定性は、対応する未変性ホモ二量体Fcの±5%以内である。幾つかの実施形態において、ヘテロ二量体の安定性は、対応する未変性ホモ二量体Fcの±2%以内である。

【0076】

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、一般に、実質的に均質に精製される。句「実質的に均質」、「実質的に均質な形態」、および「実質的な均質性」は、生成物が望ましくないポリペプチドの組み合わせ（例えば、ホモ二量体）由来の副産物を実質的に欠いていることを示すために使用される。純度に関する表現としては、実質的な均質性は、副産物の量が10%を超えない、好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満であることを意味し、ここで百分率は重量に基づいている。

【0077】

当業者に理解されている用語は、本明細書において明確に異なって定義されていない限り、それぞれ当該技術において取得された意味を持つ。抗体は、可変領域、ヒンジ領域、および定常ドメインを有することが知られている。免疫グロブリンの構造および機能は、例えば、Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988)において概説されている。

【0078】

抗体の「Fabフラグメント」（フラグメント抗原結合とも呼ばれる）は、右鎖の定常ドメイン（CL）および重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を、軽および重鎖のそれぞれに可変ドメインVLおよびVHを伴って含有する。可変ドメインは、抗原結合に関与する相補性決定ループ（CDR、超可変領域とも呼ばれる）を含む。Fabフラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端への幾つかの残基の付加によって、Fabフラグメントと異なる。

【0079】

10

20

30

40

50

「単鎖 F v」又は「s c F v」抗体フラグメントは、抗体の V H および V L ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。1つの実施形態において、F v ポリペプチドは、抗原結合のために s c F v を所望の構造に形成することができる、V H と V L のドメインの間にあるポリペプチドリンカーを更に含む。s c F v についての概説は、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994) を参照すること。HER2抗体 s c F V フラグメントは、国際公開第 93/16185 号、米国特許第 5,571,894 号、および米国特許第 5,587,458 号に記載されている。

10

【0080】

非ヒト(例えば、齧歯類)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大部分の場合において、ヒト化抗体は、受給体の超可変領域における残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類のような非ヒト種(供与体の抗体)の超可変領域の残基に代えられているヒト免疫グロブリン(受給体の抗体)である。幾つかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(F R)の残基は、対応する非ヒト残基に代えられている。更に、ヒト化抗体は、受給体の抗体または供与体の抗体において見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に洗練するために実行される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインを実質的に全て含み、全てまた実質的に全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンに対応し、全てまたは実質的に全ての F R がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、場合により、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(F c)の少なくとも一部分も含む。更なる詳細は、Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988)、および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992) を参照すること。

20

【0081】

ヘテロ多量体

本発明は、少なくとも 1 つの單一ドメイン抗原結合(s d A g)構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域を含むヘテロ多量体であって、当該免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域が、2 つの单量体 F c ポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物が、未変性免疫グロブリンホモ二量体 F c 領域に匹敵する安定性を有するヘテロ二量体 F c 領域の形成を促進するアミノ酸修飾を含む免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域に結合している 1 つの单量体 F c ポリペプチドに結合しており、ならびに Ig G 軽鎖および Ig G C H 1 領域を欠いているヘテロ多量体を提供する。ヘテロ多量体は、一価および單一特異性、二価および單一特異性、または二価および二重特異性であり得る。本明細書に記載されているヘテロ二量体 F c 領域を含む本明細書に記載されているヘテロ多量体は、野生型 Ig G 1 に匹敵する固有の安定性を有し、約 85 % を超える純度で形成される。

30

【0082】

1 つの実施形態において、ヘテロ多量体は、2 つの重鎖を含むヘテロ二量体である。

40

【0083】

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、s c F v または F a b を含む抗体様式と比較して、多機能性の二重特異性抗体の容易な構築および製造を可能にする。本明細書に記載されているヘテロ多量体は、Ig G 軽鎖を欠いているので、2 つの軽鎖を含む二重特異性抗体の作製における固有の「軽鎖ごちゃ混ぜ」問題が回避される。

【0084】

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、

a) 単一ドメイン抗原結合構築物による抗原の高い親和性結合、

b) 構成单一ドメイン抗原結合構築物の良好なヘテロ多量体品質および生物物理学的安

50

定性(凝集の欠如)、

c) チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞発現系における、ならびにscFVおよびFab様式を含む他のヘテロ多量体構築物と比較した製造可能性における高い抗体価を実証する。

【0085】

これらの特性は、本明細書に記載されているヘテロ多量体が、二重特異性および多機能性治療抗体、ならびに臨床または標的化試薬の開発を含む多様な用途において使用されることを可能にする。

【0086】

1つの実施形態において、単離ヘテロ多量体は、少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域を含み、当該免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域は、2つの単量体Fcポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物は、一方の単量体Fcポリペプチドに結合し、ヘテロ二量体Fc領域は、未変性ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有する当該ヘテロ二量体Fc領域の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、当該単離ヘテロ多量体は、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンの第1の定常(CH1)領域を欠いている。

10

【0087】

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、ヘテロ二量体Fc領域に結合している1つの單一ドメイン抗原結合構築物のみを有し得ることが考慮される。したがって、1つの実施形態において、単離ヘテロ多量体は、1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域を含み、当該免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域は、2つの単量体Fcポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物は、一方の単量体Fcポリペプチドに結合している。

20

【0088】

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、ヘテロ二量体Fc領域に結合している2つの單一ドメイン抗原結合構築物を含み得ることが更に考慮される。別の実施形態において単離ヘテロ多量体は、1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域を含み、当該免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域は、2つの単量体Fcポリペプチドを含み、1つの單一ドメイン抗原結合構築物は、一方の単量体Fcポリペプチドに結合しており、第2の單一ドメイン抗原結合構築物は、第2の単量体Fcポリペプチドに結合している。

30

【0089】

單一ドメイン抗原結合構築物

上記に示されているように、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域を含み、当該免疫グロブリンヘテロ二量体Fc領域は、2つの単量体Fcポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物は、一方の単量体Fcポリペプチドに結合している。

【0090】

單一ドメイン抗原結合構築物は、標的ポリペプチドに特異的または選択的に結合し得る結合ポリペプチドを含む。用語「特異的結合」は、本明細書で使用されるとき、平衡解離定数 K_d により観察した、抗原に対する抗原結合構築物の高い親和性結合を意味する。 K_d は、平衡解離定数であり、 k_{off}/k_{on} に等しい。 k_{off} は、抗原に複合した抗原結合構築物の解離速度を記載し、 k_{on} は、抗原に対する抗原結合構築物の会合速度を記載する。用語「選択的結合」は、本明細書で使用されるとき、リガンドが1つの標的に別の標的よりも高い親和性を示すように、リガンドが受容体または標的に結合する異なる親和性を意味し、選択的リガンドは、非常に限定された種類の受容体に結合し、一方、非選択的リガンドは、数種類の受容体に結合する。当該技術において知られているように、標的受容体への特異的および選択的結合は、單一ドメイン抗原結合構築物を含む治療薬に、標的を発現する疾患細胞を認識および治療する能力を与えることができる。

40

【0091】

50

適切な單一ドメイン抗原結合構築物の例には、單一ドメイン抗体 (s d A b または V_H)、ラクダ科動物のナノボディ ($V_h H$)、サメ $V_{N A R}$ 、S H 3 誘導性フィノマー、ならびにアドネクチンおよび D A R P i n (設計されたアンキリン反復タンパク質) のようなフィブロネクチン誘導性結合ドメインのような、抗体軽鎖を欠くものが含まれる。これらの單一ドメイン抗体結合構築物は、そのサイズおよび構的立体配座に起因して伝統的な F a b では利用できない、代替的または潜在的エピトープに結合する能力のような特性を示している。

【 0 0 9 2 】

1つの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、ドメイン抗体 (もしくは、ドメイン抗体としての使用に適したアミノ酸配列)、單一ドメイン抗体 (もしくは、單一ドメイン抗体としての使用に適したアミノ酸配列)、「d A b」 (もしくは、d A b としての使用に適したアミノ酸配列)、またはナノボディ (本明細書において定義されており、 $V_{H H}$ 配列が含まれるが、これらに限定されない)、他の單一可変ドメイン、あるいはこれらのいずれかの任意の適切なフラグメントから選択される免疫グロブリン重鎖可変領域または可変重鎖である。(單一) ドメイン抗体の一般的な記載には、上記に引用された当該技術、ならびにヨーロッパ特許第 0 3 6 8 6 8 4 号も参照される。用語「d A b」には、例えば Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al. (Trends Biotechnol., 2003, 21 (11): 484-490)、ならびに例えば国際公開第 0 4 / 0 6 8 8 2 0 号、同第 0 6 / 0 3 0 2 2 0 号、同第 0 6 / 0 0 3 3 8 8 号、および Domantis Ltd. による他の公開特許出願が参照される。幾つかの実施形態において、可変重鎖は單一ドメイン抗体を含む、または單一可変ドメインは、特定の種のサメから誘導され得る (例えば、いわゆる「I g N A R ドメイン」、例えば国際公開第 0 5 / 1 8 6 2 9 号を参照すること)。

【 0 0 9 3 】

したがって、1つの実施形態において、単離ヘテロ多量体は、單一ドメイン抗体、ラクダ科動物ナノボディ、サメ $V_{N A R}$ 、S H 3 誘導性フィノマー、ならびにアドネクチンおよび D A R P i n のようなフィブロネクチン誘導性結合ドメインから選択される單一ドメイン抗原結合構築物を含む。1つの実施形態において、単離ヘテロ多量体は、單一ドメイン抗体、ラクダ科動物ナノボディ、および軟骨魚類 $V_{N A R}$ から選択される單一ドメイン抗原結合構築物を含む。1つの実施形態において、単離ヘテロ多量体は、S H 3 誘導性フィノマーまたはフィブロネクチン誘導性結合ドメインである單一ドメイン抗原結合構築物を含む。1つの実施形態において、フィブロネクチン誘導性結合ドメインは、D A R P i n またはアドネクチンである。S H 3 誘導性フィノマー、アドネクチン、および D A R P i n は、当該技術において知られている (例えば、Grabulovski et al. J. Biol. Chem. (2007) 282 (5): 3196-204; Lipovsek Protein Engineering, Design and Selection (2011) 24 (1-2): 3-9、および Tamaskovic, Methods in Enzymology (2012), 503, 101-134 を参照すること)。

【 0 0 9 4 】

1つの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、單一ドメイン抗体である。單一ドメイン抗体は、單一单量体可変抗体ドメインからなる抗体フラグメントである。ドメイン抗体の適切な例は、当該技術において知られており、例えば、(例えば、Wesolowski et al. Med Microbiol Immunol. (2009), 198 (3): 157-174 の図 4、および Barthélémy et al. J. Biol. Chem. (2008) 138, 3639-54 の図 1A を参照すること)。

【 0 0 9 5 】

1つの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、ラクダ科動物ナノボディ (

10

20

30

40

50

V_hH) である。ラクダ科動物ナノボディは、軽鎖および重鎖CH1定常ドメインを欠いているラクダ科動物において見出される重鎖抗体から誘導される抗体フラグメントである。1つの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、軟骨魚類VNARである。そのような軟骨魚類VNARには、サメにおいて見出される重鎖抗体から誘導されるVNAR抗体フラグメントが含まれる。これらの抗体フラグメントは、また、軽鎖および重鎖CH1定常ドメインを欠いている。既知のラクダ科動物およびサメの單一ドメイン抗原結合構築物の例は、Wesolowski et al., Med Microbiol Immunol (2009) 198: 157 - 174の表1において確認される。例えば、膜タンパク質を標的にする單一ドメイン抗原結合構築物には、免疫されたラマからのART2.2、免疫されたラマからのCD16、免疫されたラクダ、免役されたラマからのEGFR、免疫されたラマからのCEA癌免疫療法、ラクダおよびラマからのMUC1腫瘍標的免疫、ならびに免疫されたラクダからのCD105(エンドグリン)が含まれる。分泌タンパク質を標的にする單一ドメイン抗原結合構築物には、免役されたラマおよびアルパカからのTNF、免疫されたヒトコブラクダからのPSA、免役されたラマからのフォン・ヴィルブランド因子、免役されたヒトコブラクダおよびアルパカからのアミロイドAペプチド、免役されたヒトコブラクダからのリゾチーム、免役されたラマからのIgG、ならびに免役されたラマからの血清アルブミンが含まれる。細胞内タンパク質を標的にする單一ドメイン抗原結合構築物には、免疫されていないラマからのBax、免疫されていないラマからのHIF-1、免役された、および免疫されていないラマからのPABPN1が含まれる。

10

【0096】

本明細書に記載されているヘテロ多量体への使用に適している單一ドメイン抗原結合構築物は、ラクダ科動物(例えば、ラクダ、ラマ、およびアルパカを含む)、ならびにサメのような天然に生じる供給源から得ることができる。單一ドメイン抗原結合構築物は、目的の標的に結合する單一ドメイン抗原結合構築物を選択するため、ファージディスプレーライブラリーのようなライブラリーをスクリーンすることにより得ることもできる。標的特異的單一ドメイン抗原結合構築物を選択するためにそのようなライブラリーをスクリーンする方法は、当該技術において知られている(例えば、Grooth et al., in Lab Invest (2006) 86: 345 - 56、およびVerheesen et al. in Methods Mol Biol (2012) 911: 81 - 104を参照すること)。

20

【0097】

特定の單一ドメイン抗原結合構築物のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列は、当該技術において知られている、または公表されている配列データバンク、例えば、GenBank、SwissProt、または例えばEMBLにおいて利用可能であり、したがって、本明細書に記載されている單一ドメイン抗原結合構築物を含むヘテロ多量体の調製を促進する。

30

【0098】

標的の選択

上記に示されているように、單一ドメイン抗原結合構築物は、標的抗原に選択的および/または特異的に結合することができる。標的タンパク質は、ヘテロ多量体の意図される使用に基づいて選択される。1つの実施形態において、標的細胞は、癌、感染性疾患、自己免疫性疾患、または炎症性疾患において活性化または増幅される細胞である。1つの実施形態において、ヘテロ多量体がEGFR1に結合する場合、標的細胞は、癌、自己免疫性疾患、または炎症性疾患において活性化または増幅される細胞である。

40

【0099】

別の実施形態において、標的細胞は、対象が細菌または真菌のような病原性生物による感染に罹患しているときに活性化または増幅されるものである。

【0100】

別の実施形態において、ヘテロ多量体は、Fabのような伝統的な抗原結合部分により

50

典型的に利用可能ではない標的抗原を発現する細胞を、標的にするために使用される。ヘテロ多量体の單一ドメイン抗原結合構築物の性質は、立体配座的遮蔽および立体的閉鎖によりホルモン免疫系から保護されている、例えばCD4のような、例えば高度に保存された残基のような標的に結合すること、ならびにより小さなエピトープにより抗原を標的にすることを可能にする。

【0101】

特定の標的

1つの実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、例えばIL2、IFN α -2a/b、IFN-1a/b、IL-21、IL-17a、TNF、IL23、VEGF、またはANG2のような1つ以上のサイトカインまたはケモカインを標的にする。別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、E ρ Cam、EGFR、VEGFR、CEA、またはGP100のような1つ以上の腫瘍関連抗原を標的にする。別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、CD16、CD30、CD137、CD22、CD52、CD80、CD23、CD2、CD4、CD40、KIR、CD32b、CD25、LAG3、またはB7-H3のような免疫調節抗原を標的にする。

【0102】

1つの実施形態では、本発明において提供されるヘテロ多量体は、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素Bのような1つ以上の細菌性毒素を標的にする。

【0103】

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるヘテロ多量体は、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームから選択される1つ以上の標的抗原を標的にするのに有用である。ある特定の実施形態では、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームの1つ以上を標的にする少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む、本明細書に記載されているヘテロ多量体である。ある特定の実施形態では、ラマ重鎖抗体から誘導される少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合構築物を含み、当該可変重鎖が、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームの1つ以上を標的にする、本明細書に記載されているヘテロ多量体である。ある特定の実施形態では、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームの1つ以上を標的にする单一ドメイン抗原結合構築物を含む、多特異的ヘテロ多量体である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている二重特異的ヘテロ多量体であって、当該ヘテロ多量体が、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームの1つ以上を標的にするラクタ科動物重鎖抗体から誘導される单一ドメイン抗原結合構築物を含む、二重特異的ヘテロ多量体である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている二重特異的ヘテロ多量体であって、当該ヘテロ多量体が、EGFR、IGF1R、ICAM-1、クロストリジウム・ディフィシル毒素A、クロストリジウム・ディフィシル毒素B、ICAM-1、Bax-タンパク質、CDC50A、およびイプシロンアイソフォームを含むCD3アイソフォームの1つ以上を標的にするラマ重鎖抗体から誘導される单一ドメイン抗原結合構築物を含む、二重特異的ヘテロ多量体である。

【0104】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、標的抗原に対して中和活性を有するものである。用語「中和活性」は、單一ドメイン抗原結合構築物の文脈において本明細書で使用されるとき、標的抗原への同族リガンドの結合を阻止する單一ドメイン抗原結合構築物の能力を意味する。別の実施形態において、單一ドメイン抗原結合構築物は、標的抗原に対して中和活性を有さないものである。1つの実施形態において、ヘテロ多量体は、非中和性であるE F G R 単一ドメイン抗原結合構築物を含む。別の実施形態において、ヘテロ多量体は、中和性であるE F G R 単一ドメイン抗原結合構築物を含む。中和E F G R 単一ドメイン抗原結合構築物の例は、O m i d f a r e t a l . (2 0 1 2) 3 1 : 1 0 1 5 - 1 0 2 6において見出される。

【0105】

10

1つの実施形態において、本発明のヘテロ多量体が2つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む場合、両方の單一ドメイン抗原結合構築物は、同じ抗原に結合する。別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体が2つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む場合、両方の單一ドメイン抗原結合構築物は、同じエピトープに結合する。別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体が2つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む場合、1つの單一ドメイン抗原結合構築物は1つの標的に結合し、第2の單一ドメイン抗原結合構築物は異なる標的に結合する。更に別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体が2つの單一ドメイン抗原結合構築物を含む場合、1つの單一ドメイン抗原結合構築物は1つのエピトープに結合し、第2の單一ドメイン抗原結合構築物は異なるエピトープに結合する。

【0106】

20

免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域

上に示されているように、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、少なくとも1つの單一ドメイン抗原結合 (s d A g) 構築物および免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域を含み、当該免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域は、2つの单量体 F c ポリペプチドを含み、單一ドメイン抗原結合構築物は、未変性免疫グロブリンホモ二量体 F c 領域に匹敵する安定性を有するヘテロ二量体 F c 領域の形成を促進するアミノ酸修飾を含む免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域に結合している1つの单量体 F c ポリペプチドに結合しており、ならびに I g G 軽鎖および I g G C H 1 領域を欠いている。

【0107】

30

免疫グロブリンヘテロ二量体 F c 領域は、以下に更に記載される。本明細書に他の部分に示されているように、1つの実施形態において、修飾 C H 3 ドメインを組み込む F c 領域（本明細書で使用されるとき、「F c 領域」および類似の用語は、C H 3 ドメインの少なくとも一部を含む任意の重鎖定常領域ドメインを包含する）を含む、免疫グロブリン（例えば、抗体）および他の結合タンパク質のような分子、例えば、ポリペプチドが提供される。修飾 C H 3 ドメイン（例えば、1つ以上のアミノ酸挿入、欠失、置換、または再編成を含む C H 3 ドメイン）を含む F c 領域を含む分子は、本明細書において「F c 変種」、「ヘテロ二量体」、「変種 F c ヘテロ二量体」、または「ヘテロ多量体」と呼ばれる。本発明の F c 変種は、ヘテロ二量体 F c 変種または領域を生成するように非対称的に修飾されている C H 3 ドメインを含む。ヘテロ多量体は、2つの重鎖ポリペプチド、または2つの单量体 F c ポリペプチドの鎖 A および鎖 B から構成され、これらは交換可能に使用され得るが、但し、それぞれの F c 領域が、1つの鎖 A および1つの鎖 B ポリペプチドを含むこと、ならびに鎖 A および鎖 B の少なくとも一方が、重鎖変種領域を含むことが条件である。

【0108】

40

野生型ホモ二量体からの変種 F c ヘテロ二量体の設計は、安定性と特異性の平衡を保つことによるタンパク質操作の文脈における積極的および消極的設計の概念により例示され、突然変異は、ポリペプチドが細胞培養条件下で発現したとき、ホモ二量体形成よりもヘテロ二量体形成を誘導する目的により導入される。消極的設計戦略は、嵩高側鎖を一方の鎖に、小さい側鎖を反対の鎖に導入することにより、例えば G e n e n t e c h により開発された knobs - into - holes 戦略により (R i d g e w a y J B , P r e

50

s t a L G , Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. 1996 Jul; 9(7):617-21; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. J Mol Biol. 270(1):26-35 (1997))）、またはホモ二量体形成の反発をもたらす静電気操作により、例えばAmgenにより開発された静電気操縦戦略により(Gunaskekaran K, et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bi-specific molecules and monovalent IgG. JBC 285(25):19637-19646(2010))、ホモ二量体の形成のための好ましくない相互作用を最大化する。これらの2つの例では、消極的設計の非対称点突然変異を野生型CH3ドメインに導入して、ヘテロ二量体形成を導いた。現在まで、消極的設計戦略のみがFcヘテロ二量体の開発に使用されてきた。公表されている結果は、消極的設計手法のみを使用して設計されたヘテロ二量体は、>95%のヘテロ二量体に高い特性をもたらすが、複合体を著しく不安定化することを示す(上記)。これらの消極的設計のヘテロ二量体は、野生型と比較して追加のジスルフィド結合が不在の修飾CH3ドメインの融解温度の69以下を有する。以下の表Aを参照すること。

【表1】

表A 公表されたFcヘテロ二量体抗体

	鎖	操作手法	供給源	純度	Tm°C
野生型	-				81-83
	-				
対照4	Y349C_T366S_L368A_Y407V	Knobs-into-holes +ジスルフィド	Genentech (Merchant et al.)	95%	>77**
	S354C_T366W				
対照3	K409D_K392D	静電気操縦	Amgen (Gunasekaran et al.)	<80%	公表なし
	D399K				
対照2	T366S_L368A_Y407V	Knobs-into-holes	Genentech (Atwell et al.)	95%	69
	T366W				
対照1	K409D_K392D	静電気操縦	Amgen (Gunasekaran et al.)	100%*	67
	D399K_E356K				
対照5	IgG-IgAキメラ	鎖交換	EMD Serono (Muda et al.)	>90%	68

10

20

30

40

50

* 本発明者たちは、本発明のアッセイ系において対照1には > 90 % の純度を観察したが、文献に以前に報告されたような 100 % は観察しなかった。

** 本発明者たちは、本発明のアッセイ系において対照4では 77 °C を超える T_m を観察し、この変種の T_m は、文献により公表されていなかった。

公表なし - 対照3の T_m は、公表されておらず、本発明のアッセイ系において試験しなかった。

野生型 IgG1 の融解温度は、使用したアッセイ系に応じて文献の値が変動したので、81 ~ 83 の値として示されており、本発明者たちは、本発明のアッセイ系において 81.5 の値を報告している。

【0109】

10

消極的設計と対照的に、タンパク質の操作に使用される一般的な概念は積極的設計である。この場合では、アミノ酸修飾が、タンパク質内または間ににおける好ましい相互作用を最大化するために、ポリペプチドに導入される。この戦略は、ホモ二量体への作用を無視しながら、所望のヘテロ二量体を特異的に安定化する多重突然変異を導入したとき、正味の影響が、ホモ二量体よりも所望のヘテロ二量体相互作用へのより良好な特異性であり、したがってより大きなヘテロ二量体特異性となることを想定する。積極的設計戦略は、所望のタンパク質相互作用を最適化するが、まれにしか > 90 % の特異性を達成しないことが、タンパク質操作の文脈において理解される (Havranek JJ & Harbury PB. Automated design of specificity in molecular recognition. *Nat Struct Biol.* 10 (1): 45 - 52 (2003); Bolon DN, Grant RA, Baker TA, Sauer RT. Specificity versus stability in computational protein design. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6; 102 (36): 12724 - 9 (2005); Huang PS, Love JJ, Mayo SL. A de novo designed protein protein interface Protein Sci. 16 (12): 2770 - 4 (2007))。本開示の前は、積極的設計戦略は、治療抗体製造および開発における安定性と比較して、より多くの注目が特異性に対して向けられていたので、Fc ヘテロ二量体を設計するために使用されてこなかった。加えて、有益な積極的設計の突然変異は、予測するのが困難なことがある。追加のジスルフィド結合のような安定性を改善する他の方法論が、Fc ヘテロ二量体の安定性を改善するために試みられ、分子に対する改善において限定された成功を収めた。(表Aを参照すること)このことは、全ての操作 Fc - CH3 ドメインジスルフィド結合が溶媒に曝露され、それがジスルフィド結合の短い寿命をもたらし、したがって、特に、操作 CH3 ドメインが追加のジスルフィド結合なしで 70 °C 未満の T_m を有するとき(追加のジスルフィド結合なしで 69 °C の T_m を有する対照4のように(対照2を参照すること)、ヘテロ二量体の長期安定性に対して有意な影響を与えるためであり得る。ジスルフィド結合のような、安定性を改善する他の方法論を本発明の Fc 変種と共に使用することもできることが考慮されるが、但し、CH3 ドメインの固有の安定性(融点として測定した)が、ジスルフィド結合なしで 70 °C 以上であること、特に、CH3 ドメインの固有の安定性(融点として測定した)がジスルフィド結合なしで 72 °C 以上であることが条件である。

20

30

40

【0110】

50

したがって、本発明者たちは、安定性もあり高い特異性もあるヘテロ二量体形成をもたらす Fc ヘテロ二量体を設計する新規方法を本明細書において開示する。この設計方法は、消極的および積極的設計戦略の両方を、構造および計算モデル誘導タンパク質操作技術と共に組み合わせる。この強力な方法は、本発明者たちが突然変異の新規組み合わせを IgG1 - CH3 ドメインにおいて設計することを可能にし、標準的な細胞培養条件のみを使用することにより、ヘテロ二量体がホモ二量体と比較して 90 % を超える純度で形成され、得られたヘテロ二量体が 70 °C を超える融解温度を有した。例示的な実施形態において、Fc 変種ヘテロ二量体は、73 °C 以上の融解温度および 98 % を超える純度を有する。

。他の例示的な実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、75 以上の融解温度および90 %を超える純度を有する。本明細書に記載されているヘテロ二量体F c 変種のある特定の実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、77 以上の融解温度および98 %を超える純度を有する。本明細書に記載されているヘテロ二量体F c 変種の幾つかの実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、78 以上の融解温度および98 %を超える純度を有する。本明細書に記載されているヘテロ二量体F c 変種のある特定の実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、79 以上の融解温度および98 %を超える純度を有する。本明細書に記載されているヘテロ二量体F c 変種のある特定の実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、80 以上の融解温度および98 %を超える純度を有する。本明細書に記載されているヘテロ二量体F c 変種のある特定の実施形態において、F c 変種ヘテロ二量体は、81 以上の融解温度および98 %を超える純度を有する。

【0111】

ある特定の実施形態において、少なくとも1つの重鎖可変ドメインおよびヘテロ二量体F c 領域を含む単離ヘテロ多量体が提供され、ここでヘテロ二量体F c 領域は、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインは、約70 以上の融解温度(Tm)を有する。本明細書で使用されるとき、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約70 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約72 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約74 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約75 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約76 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約78 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約79 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約80 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。ある特定の実施形態において、「増加した安定性」または「安定したヘテロ二量体」は、約81 以上の融解温度を有する、ヘテロ二量体形成における変種CH3ドメインを意味する。加えて、用語「ヘテロ二量体形成を促進する」は、ホモ二量体形成と比較して90 %を超えるヘテロ二量体形成をもたらす、CH3ドメインにおけるアミノ酸修飾を本明細書において意味する。

【0112】

更なる実施形態において、この増加した安定性は、追加のジスルフィド結合の不在下のものである。具体的には、増加した安定性は、CH3ドメインにおける追加のジスルフィド結合の不在下のものである。1つの実施形態において、変種CH3ドメインは、野生型CH3ドメインと比較して追加のジスルフィド結合を含まない。代替的な実施形態において、変種CH3は、野生型CH3ドメインと比較して少なくとも1つのジスルフィド結合を含むが、但し、変種CH3がジスルフィド結合の不在下で70 以上の融点を有することが条件である。1つの実施形態において、変種CH3ドメインは、野生型CH3ドメインと比較して少なくとも1つのジスルフィド結合を含み、変種CH3ドメインは、約77.5 以上の融点(Tm)を有する。一実施形態において、変種CH3ドメインは、野生型CH3ドメインと比較して少なくとも1つのジスルフィド結合を含み、変種CH3ドメインは、約78 以上の融点(Tm)を有する。別の実施形態において、変種CH3ドメインは、野生型CH3ドメインと比較して少なくとも1つのジスルフィド結合を含み、変

10

20

30

40

50

種CH3ドメインは、約78を超える、または約78.5を超える、または約79を超える、または約79.5を超える、または約80を超える、または約80.5を超える、または約81を超える、または約81.5を超える、または約82を超える、または約82.5を超える、または約83を超える融点(Tm)を有する。

【0113】

1つの実施形態において、変種CH3ドメインは、約70を超える、または約70.5を超える、または約71を超える、または約71.5を超える、また約72を超える、または約72.5を超える、または約73を超える、または約73.5を超える、または約74を超える、または約74.5を超える、または約75を超える、または約75.5を超える、または約76を超える、または約76.5を超える、または約77を超える、または約77.5を超える、または約78を超える、または約78.5を超える、または約79を超える、または約79.5を超える、または約80を超える、または約80.5を超える、または約81を超える、または約81.5を超える、または約82を超える、または約82.5を超える、または約83を超える融点を有する。別の実施形態において、変種CH3ドメインは、約70、または約70.5、または約71、または約71.5、または約72、または約72.5、または約73、または約73.5、または約74、または約74.5、または約75、または約75.5、または約76、または約76.5、または約77、または約77.5、または約78、または約78.5、または約79、または約79.5、または約80、または約80.5、または約81の融点を有する。なお別の実施形態において、変種CH3ドメインは、約70～約81、または約70.5～約81、または約71～約81、または約71.5～約81、または約72～約81、または約72.5～約81、または約73～約81、または約73.5～約81、または約74～約81、または約74.5～約81、または約75～約81、または約75.5～約81、または約76～約81、または約76.5～約81、または約77～約81、または約77.5～約81、または約78～約81、または約78.5～約81、または約79～約81の融点を有する。なお別の実施形態において、変種CH3ドメインは、約71～約76、または約72～約76、または約73～約76、または約74～約76の融解温度を有する。

【0114】

安定性を改善することに加えて、ヘテロ二量体Fc領域は、ヘテロ二量体形成を促進するアミノ酸修飾を含む変種CH3ドメインを含む。ヘテロ二量体形成を促進するこれらのアミノ酸修飾は、ホモ二量体形成と比較したものであることが理解される。このホモ二量体形成と比較したヘテロ二量体形成は、本明細書において「純度」、または「特異性」、または「ヘテロ二量体純度」、または「ヘテロ二量体特異性」とまとめて呼ばれる。ヘテロ二量体純度は、ヘテロ二量体種の選択的精製の前に、標準的な細胞培養条件下で溶液中において形成されるホモ二量体種と比較した、形成された所望のヘテロ二量体の率を意味することが理解される。例えば、ヘテロ二量体純度の90%は、溶液中における90%の二量体種が所望のヘテロ二量体であることを示す。1つの実施形態において、Fc変種ヘテロ二量体は、約90%を超える、または約91%を超える、または約92%を超える、または約93%を超える、または約94%を超える、または約95%を超える、または約96%を超える、または約97%を超える、または約98%を超える、または約99%を超える純度を有する。別の実施形態において、Fc変種ヘテロ二量体は、約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%、または約100%の純度を有する。

【0115】

ある特定の実施形態において、少なくとも1つの重鎖可変ドメインおよびヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を

有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、変種 C H 3 ドメインが、約 70 以上的融解温度 (T m) を有し、得られたヘテロ二量体が、90%を超える純度を有する、単離ヘテロ多量体が提供される。1つの態様において、得られたヘテロ二量体は、98%を超える純度を有し、変種 C H 3 ドメインは、約 70 を超える、または約 71 を超える、または約 72 を超える、または約 73 を超える、または約 74 、または約 75 を超える、または約 76 を超える、または約 77 を超える、または約 78 を超える、または約 79 を超える、または約 80 を超える、または約 81 を超える融解温度を有する。更なる態様において、変種 C H 3 ドメインは、70 以上の融解温度を有し、得られた F c 変種ヘテロ二量体は、約 90% を超える、または約 91% を超える、または約 92% を超える、または約 93% を超える、または約 94% を超える、または約 95% を超える、または約 96% を超える、または約 97% を超える、または約 98% を超える、または約 99% を超える純度を有する。

【 0 1 1 6 】

これらの改善された安定性および純度を有する F c 変種を含むヘテロ多量体を設計するため、本発明者たちは、計算設計および実験スクリーニングの繰り返し工程を用いて、積極的および消極的設計戦略の大部分の成功した組み合わせを選択した（図 2 4 を参照すること）。

【 0 1 1 7 】

具体的には、初期設計段階において、異なる消極的設計 F c 変種ヘテロ二量体を作製し、実施例 1 ~ 3 に記載されているように、発現および安定性について試験した。初期設計段階には、F c 変種ヘテロ二量体 A Z 1 ~ A Z 1 6 が含まれた（表 1 を参照すること）。この消極的設計 F c 変種ヘテロ二量体の初期セットでは、これらが低い安定性（例えば、71 未満の T m ）を有すると予想され、90% を超える純度および約 68 以上の融解温度の F c 変種ヘテロ二量体が、更なる展開のために選択された。これには、F c 変種ヘテロ二量体 A Z 6 、 A Z 8 、および A Z 1 5 が含まれた。第 2 の設計段階において、これらの選択された F c 変種ヘテロ二量体を、積極的設計戦略の使用により更に修飾して、安定性と純度の両方を導き出し、続いて詳細な計算および構造分析を行った。選択された F c 変種ヘテロ二量体（ A Z 6 、 A Z 8 、および A Z 1 5 ）を、それぞれ、計算法および包括的構造機能分析により分析して、これら F c 変種が、 I g G 1 では 81 である野生型 F c ホモ二量体よりも低い安定性を有する構造的理由を確認した。F c 変種ヘテロ二量体および T m 値のリストは、表 4 を参照すること。

【 0 1 1 8 】

ある特定の実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、 A Z 1 、または A Z 2 、または A Z 3 、または A Z 4 、または A Z 5 、または A Z 6 、または A Z 7 、または A Z 8 、または A Z 9 、または A Z 1 0 、または A Z 1 1 、または A Z 1 2 、または A Z 1 3 、または A Z 1 4 、または A Z 1 5 、または A Z 1 6 から選択される。選択された実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、 A Z 6 、または A Z 8 、または A Z 1 5 である。

【 0 1 1 9 】

計算ツールおよび構造機能分析には、分子動力学分析（ M D ）、側鎖 / 主鎖再詰め込み、知識ベースポテンシャル（ K B P ）、空洞および（疎水性）詰め込み分析（ L J 、 C C S D 、 S A S A 、 d S A S A （炭素 / 全原子））、静電気 - G B 計算、およびカップリング分析が含まれるが、これらに限定されない。（計算戦略の概要は図 2 4 を参照すること）

【 0 1 2 0 】

タンパク質操作手法の一態様は、 X 線結晶学から誘導された F c I g G タンパク質の構造情報を、野生型および変種形態の C H 3 ドメインにおける計算モデル形成およびシミュレーションと組み合わせることに依存した。このことは、本発明者たちが個別のアミノ酸およびこれらの協同作用の潜在的な役割について、新規の構造的および物理化学的洞察を得ることを可能にした。安定性および純度に関する得られた経験的データと共に多数の変種 C H 3 ドメインから得たこれらの構造的および物理化学的洞察は、本発明者たちが、

10

20

30

40

50

ヘテロ二量体の純度と安定性の関係についての理解を発展させることに役立った。シミュレーションを実施するため、本発明者たちは、完全な信頼性のあるモデルを構築すること、および Ig G 1 抗体の野生型 Fc 構造の品質を洗練することから始めた。X 線結晶学から誘導されたタンパク質構造は、生理学的条件下での水性媒体におけるタンパク質の特定の特徴に関して詳細が欠如しており、本発明者たちの洗練手順がこの限界について対処した。これらには、多くの場合にループおよび幾つかの残基側鎖のようなタンパク質の柔軟な部分である、タンパク質構造の欠損領域を構築すること、中性および荷電残基のプロトノン化状態、ならびにタンパク質と会合する機能的に関連する水分子の電位の配置を評価および定義することが含まれる。

【0121】

10

分子動力学 (MD) アルゴリズムは、タンパク質構造をシミュレートして、水性環境下における Fc ホモ二量体および変種 CH3 ドメインの固有の動力学的性質を評価する、本発明者たちが使用した 1 つのツールである。分子動力学シミュレーションは、タンパク質における全ての原子実体とその局所環境との、この場合は Fc と周囲水分子を構成する原子との間の相互作用および作用する力から生じる運動によってもたらされる分子の動力学的軌道を追跡する。分子動力学シミュレーションに統いて、多様な態様の軌道を分析して、Fc ホモ二量体および変種 Fc ヘテロ二量体の構造的および動力学的特徴についての洞察を得て、本発明者たちは、これを使用して、分子の純度および安定性の両方を改善する特定のアミノ酸突然変異を同定した。

【0122】

20

したがって、生成された MD 軌道を、主要成分分析のような方法の使用により研究して、Fc 構造における運動の固有の低頻度様式を明らかにした。これは、タンパク質の潜在的な立体配座の準安定状態についての洞察を提供する (図 32 を参照すること)。Fc 領域の鎖 A と鎖 B の重要なタンパク質間相互作用が CH3 ドメインの界面において生じるが、本発明者たちのシミュレーションは、この界面が、CH2 ドメインの N 末端の互いの「開放」および「閉鎖」に関与する運動においてヒンジとして作用することを示した。CH2 ドメインは、図 16 から分かるように、この末端で Fcgr と相互作用する。したがって、理論に束縛されるものではないが、CH3 界面へのアミノ酸突然変異の導入は、Fc の N 末端での開放 / 閉鎖運動の大きさおよび性質に、したがって、Fc が Fcgr とどのように相互作用するかに影響を与えると思われる。実施例 4 および表 5 を参照すること。

【0123】

30

生成された MD 軌道を研究して、柔軟性のプロファイリングおよび環境の分析に基づいて Fc 構造における特定のアミノ酸残基の位置の突然変異性も決定した。このアルゴリズムは、タンパク質構造および機能に影響を与える残基を本発明者たちが同定することを可能にし、変種 CH3 ドメインの後の設計段階における残基の特徴および突然変異性に対して特有の洞察を提供した。この分析は、本発明者たちが多数のシミュレーションを比較すること、およびプロファイリングの後の外れ値に基づいて突然変異性を評価することも可能にした。

【0124】

40

生成された MD 軌道を研究して、タンパク質における相關残基運動、およびそれらの間のカップリングの結果としての残基のネットワークの形成も決定した。Fc 構造内の残基の動力学的相関およびネットワークを見出すことは、動力学的実体としてタンパク質を理解する、および遠位部位の突然変異の影響についての洞察を発展させる重要なステップである。例えば、実施例 6 を参照すること

【0125】

したがって、本発明者たちは、突然変異の部位における局所環境に対する突然変異の影響を詳細に研究した。鎖 A および B の CH3 界面における十分に詰め込まれたコアの形成は、安定した Fc 構造における 2 つの鎖の自発的対形成にとって重要である。良好な詰め込みは、接觸している基の間の好ましい相互作用により結合した相互作用分子パートナーの間の強力な構造相補性の結果である。好ましい相互作用は、溶媒曝露により十分に除去

50

された埋没型疎水性接触、および／または疎水性極性基の間の相補的静電接触の形成のいずれかによりもたらされる。これらの疎水性および親水性接触は、C H 3 界面における二量体形成の自由エネルギーへのエントロピーおよびエンタルピー的寄与を有する。本発明者たちは、鎖 A と鎖 B の間の C H 3 界面において正確な詰め込みモデルを作製するために多様なアルゴリズムを用い、続いて多数の関連する物理化学的特性をスコア付けして界面の熱力学的特性を評価する。

【 0 1 2 6 】

本発明者たちは、柔軟性主鎖を含む多数のタンパク質詰め込み方法を用いて、計算的にスクリーンした多数の変種のモデル構造を最適化および調製した。詰め込みの後、本発明者たちは、接触密度、衝突スコア、水素結合、疎水性、および静電気を含む多数の用語を評価した。溶媒和モデルの使用は、本発明者たちが、溶媒環境に対してより正確に対処すること、およびタンパク質の特定の位置における突然変異の後と代替的な残基の種類との自由エネルギーの差を対比させることを可能にした。接触密度および衝突スコアは、有効なタンパク質詰め込みの重要な態様である相補性の測度を提供する。これらのスクリーニング手順は、知識ベースポテンシャル、または対毎の残基相互作用エネルギーおよびエントロピー計算に依存するカップリング分析スキームの適用に基づいている。

【 0 1 2 7 】

この包括的コンピューター分析は、界面ホットスポット、非対称性の部位、空洞および不十分に詰め込まれた領域、個別の部位の構造動力学、ならびに局所アンフォールディングの部位に関して、野生型と比較したそれぞれの F c 変種の差についての詳細な理解をもたらした。これらの記載されている計算分析を組み合わせた結果は、最適化されてなく、かつ、組み合わせにより低い安定性（例えば、68 の T m ）および／または < 90 % 純度の低い特異性の原因であった、特定の残基、配列／構造モチーフ、および空洞を同定した。第 2 の設計段階において、本発明者たちは、標的積極的設計を使用し、追加の点突然変異によりこれらの仮定に取り組み、上記に記載された方法論および分析を使用してコンピューター操作によりこれらを試験した（図 24 を参照すること）。第 2 の段階におけるそれぞれの標的設計において安定性および純度を改善するように設計された F c 変種ヘテロ二量体（F c 変種ヘテロ二量体 A Z 1 7 ~ A Z 1 0 1 ）を、実施例 1 ~ 4 に記載されているように発現および安定性について実験的に検証した。

【 0 1 2 8 】

ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体 F c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F c 領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、変種 C H 3 ドメインが、A Z 1 7 、または A Z 1 8 、または A Z 1 9 、または A Z 2 0 、または A Z 2 1 、または A Z 2 2 、または A Z 2 3 、または A Z 2 4 、または A Z 2 5 、または A Z 2 6 、または A Z 2 7 、または A Z 2 8 、または A Z 2 9 、または A Z 3 0 、または A Z 2 1 、または A Z 3 2 、または A Z 3 3 、または A Z 3 4 、または A Z 3 5 、または A Z 3 6 、または A Z 3 7 、または A Z 3 8 、または A Z 3 9 、または A Z 4 0 、または A Z 4 1 、または A Z 4 2 、または A Z 4 3 、または A Z 4 4 、または A Z 4 5 、または A Z 4 6 、または A Z 4 7 、または A Z 4 8 、または A Z 4 9 、または A Z 5 0 、または A Z 5 1 、または A Z 5 2 、または A Z 5 3 、または A Z 5 4 、または A Z 5 5 、または A Z 5 6 、または A Z 5 7 、または A Z 5 8 、または A Z 5 9 、または A Z 6 0 、または A Z 6 1 、または A Z 6 2 、または A Z 6 3 、または A Z 6 4 、または A Z 6 5 、または A Z 6 6 、または A Z 6 7 、または A Z 6 8 、または A Z 6 9 、または A Z 7 0 、または A Z 7 1 、または A Z 7 2 、または A Z 7 3 、または A Z 7 4 、または A Z 7 5 、または A Z 7 6 、または A Z 7 7 、または A Z 7 8 、または A Z 7 9 、または A Z 8 0 、または A Z 8 1 、または A Z 8 2 、または A Z 8 3 、または A Z 8 4 、または A Z 8 5 、または A Z 8 6 、または A Z 8 7 、または A Z 8 8 、または A Z 8 9 、または A Z 9 0 、または A Z 9 1 、または A Z 9 2 、または A Z 9 3 、または A Z 9 4 、または A Z 9 5 、または A Z 9 6 、または A Z 9 7 、または A Z 9 8 、または A Z 9 9 、または A Z 1 0 0 、または A Z 1 0 1 である、単離ヘテロ多量

10

20

30

40

50

体が本明細書において提供される。例示的な実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、 A Z 1 7 、または A Z 1 8 、または A Z 1 9 、または A Z 2 0 、または A Z 2 1 、または A Z 2 2 、または A Z 2 3 、または A Z 2 4 、または A Z 2 5 、または A Z 2 6 、または A Z 2 7 、または A Z 2 8 、または A Z 2 9 、または A Z 3 0 、または A Z 2 1 、または A Z 3 2 、または A Z 3 3 、または A Z 3 4 、または A Z 3 8 、または A Z 4 2 、または A Z 4 3 、または A Z 4 4 、または A Z 4 5 、または A Z 4 6 、または A Z 4 7 、または A Z 4 8 、または A Z 4 9 、または A Z 5 0 、または A Z 5 2 、または A Z 5 3 、または A Z 5 4 、または A Z 5 8 、または A Z 5 9 、または A Z 6 0 、または A Z 6 1 、または A Z 6 2 、または A Z 6 3 、または A Z 6 4 、または A Z 6 5 、または A Z 6 6 、または A Z 6 7 、または A Z 6 8 、または A Z 6 9 、または A Z 7 0 、または A Z 7 1 、または A Z 7 2 、または A Z 7 3 、または A Z 7 4 、または A Z 7 5 、または A Z 7 6 、または A Z 7 7 、または A Z 7 8 、または A Z 7 9 、または A Z 8 1 、または A Z 8 2 、または A Z 8 3 、または A Z 8 4 、または A Z 8 5 、または A Z 8 6 、または A Z 8 7 、または A Z 8 8 、または A Z 8 9 、または A Z 9 1 、または A Z 9 2 、または A Z 9 3 、または A Z 9 4 、または A Z 9 5 、または A Z 9 8 、または A Z 9 9 、または A Z 1 0 0 、または A Z 1 0 1 である。ある特定の実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、 A Z 3 3 または A Z 3 4 である。別の実施形態において、変種 C H 3 ドメインは、 A Z 7 0 または A Z 9 0 である。
10

【 0 1 2 9 】

例示的な実施形態において、ヘテロ多量体は、第 1 および第 2 のポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y 、 F 4 0 5 A 、および Y 4 0 7 V を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 I 、 K 3 9 2 M 、および T 3 9 4 W を含む。別の実施形態において、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y 、 S 4 0 0 E 、 F 4 0 5 A 、および Y 4 0 7 V を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 I 、 N 3 9 0 R 、 K 3 9 2 M 、および T 3 9 4 W を含む。
20

【 0 1 3 0 】

計算構造機能分析、標的操作、および実験検証の繰り返し工程を使用して、後に続く設計段階において表 1 の列記されている残りの F c 変種を設計し、 9 0 % を超える純度と、 7 0 を超える溶融温度の C H 3 ドメインの増加した安定性とを有するヘテロ多量体をもたらした。ある特定の実施形態において、 F c 変種は、 A Z 1 ~ A Z 1 3 6 から選択されるアミノ酸突然変異を含む。更なる実施形態において、 F c 変種は、表 4 に列記されている F c 変種から選択されるアミノ酸突然変異を含む。
30

【 0 1 3 1 】

第 1 および第 2 の設計段階では、 2 つのコア足場が同定され、足場 1 および足場 2 であり、追加のアミノ酸修飾が、これらの足場に導入されて、 F c 変種ヘテロ二量体の純度および安定性を微調整した。 A Z 8 、 A Z 1 7 ~ 6 2 、および表 6 に列記されている変種を含む足場 1 の開発についての詳細な記載は、実施例 5 を参照すること。 A Z 1 5 、 A Z 6 3 ~ 1 0 1 、および表 7 に列記されている変種を含む足場 2 の開発についての詳細な記載は、実施例 6 を参照すること。
40

【 0 1 3 2 】

足場 1 のコア突然変異は、 L 3 5 1 Y _ F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V / T 3 9 4 W を含む。足場 1 a は、アミノ酸突然変異 T 3 6 6 I _ K 3 9 2 M _ T 3 9 4 W / F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V を含み、足場 1 b は、アミノ酸突然変異 T 3 6 6 L _ K 3 9 2 M _ T 3 9 4 W / F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V を含む。実施例 5 を参照すること。

【 0 1 3 3 】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、第 1 および第 2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y 、 F 4 0 5 A 、および Y 4 0 7 V を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 9 4 W を含む。 1 つの態様において、ヘテロ多量体は、 F 4 0 5 および / また

は K 3 9 2 の位置に点突然変異を更に含む。K 3 9 2 の位置のこれらの突然変異には、K 3 9 2 V、K 3 9 2 M、K 3 9 2 R、K 3 9 2 L、K 3 9 2 F、またはK 3 9 2 E が含まれるが、これらに限定されない。F 4 0 5 の位置のこれらの突然変異には、F 4 0 5 I、F 4 0 5 M、F 4 0 5 S、F 4 0 5 S、F 4 0 5 V、またはF 4 0 5 W が含まれるが、これらに限定されない。別の態様において、ヘテロ多量体は、T 4 1 1 および / または S 4 0 0 の位置に点突然変異を更に含む。T 4 1 1 の位置のこれらの突然変異には、T 4 1 1 N、T 4 1 1 R、T 4 1 1 Q、T 4 1 1 K、T 4 1 1 D、T 4 1 1 E、またはT 4 1 1 W が含まれるが、これらに限定されない。S 4 0 0 の位置のこれらの突然変異には、S 4 0 0 E、S 4 0 0 D、S 4 0 0 R、またはS 4 0 0 K が含まれるが、これらに限定されない。なお別の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチドを含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 9 4 W を含み、第1 および / または第2 のポリペプチドは、T 3 6 6 および / または L 3 6 8 の位置にアミノ酸修飾を更に含む。T 3 6 6 の位置のこれらの突然変異には、T 3 6 6 A、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 Y、T 3 6 6 S、T 3 6 6 C、T 3 6 6 V、またはT 3 6 6 W が含まれるが、これらに限定されない。例示的な実施形態において、T 3 6 6 の位置のアミノ酸突然変異は、T 3 6 6 I である。別の例示的な実施形態において、T 3 6 6 の位置のアミノ酸突然変異は、T 3 6 6 L である。L 3 6 8 の位置の突然変異には、L 3 6 8 D、L 3 6 8 R、L 3 6 8 T、L 3 6 8 M、L 3 6 8 V、L 3 6 8 F、L 3 6 8 S、および L 3 6 8 A が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 3 4 】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 L および T 3 9 4 W を含む。別の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチドを含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 I および T 3 9 4 W を含む。

【 0 1 3 5 】

特定の他の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 L、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含む。別の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチドを含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 I、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含む。

【 0 1 3 6 】

なお別の他の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 L、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含む。別の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチドを含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 I、K 3 9 2 M、および T 3 9 4 W を含む。

【 0 1 3 7 】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V を含み、第2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 L および T 3 9 4 W を含む。別の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1 および第2 のポリペプチドを含み、第1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V

10

20

30

40

50

を含み、第2のポリペプチドは、アミノ酸修飾T366IおよびT394Wを含む。

【0138】

例示的な実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含むヘテロ多量体を含み、ヘテロ多量体が、約74以上10の融解温度(Tm)を有する、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ多量体が、少なくとも1つの重鎖可変ドメイン、および増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、約74以上10の融解温度(Tm)を有し、ヘテロ二量体が、約98%以上の純度を有する、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

【0139】

ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、約70を超える融解温度(Tm)を有し、変種CH3ドメインが、表6から選択される、単離ヘテロ多量体。

【0140】

足場2のコア突然変異は、L351Y_Y407A/T366A_K409Fを含む。足場2aは、アミノ酸修飾L351Y_Y407A/T366V_K409Fを含み、足場2bは、アミノ酸修飾Y407A/T366A_K409Fを含む。実施例6を参照すること。

【0141】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、第1および第2のポリペプチド(本明細書において、鎖Aおよび鎖Bとも呼ばれる)を含み、第1のポリペプチドは、アミノ酸修飾L351YおよびY407Aを含み、第2のポリペプチドは、アミノ酸修飾T366AおよびK409Fを含む。1つの態様において、ヘテロ多量体は、T366、L351、およびY407の位置に点突然変異を更に含む。T366の位置のこれらの突然変異には、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V、またはT366Wが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、T366の位置の突然変異は、T366Vである。L351の位置の突然変異には、L351I、L351D、L351R、またはL351Fが含まれるが、これらに限定されない。Y407の位置の突然変異には、Y407VまたはY407Sが含まれるが、これらに限定されない。表1のCH3変種AZ63～AZ70、および表4、および実施例6を参照すること。

【0142】

例示的な実施形態において、ヘテロ多量体は、第1および第2のポリペプチド(本明細書において、鎖Aおよび鎖Bとも呼ばれる)を含み、第1のポリペプチドは、アミノ酸修飾L351YおよびY407Aを含み、第2のポリペプチドは、アミノ酸修飾T366VおよびK409Fを含む。

【0143】

例示的な実施形態では、少なくとも1つの單ードメイン抗原結合構築物およびヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸修飾を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、約75.5以上の融解温度(Tm)を有し、ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリンCH1を欠いており、場合により免疫グロブリンCH2領域を欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。別の実施形態では、少なくとも1つの重鎖可変領域およびヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、約50

75 以上の融解温度 (T_m) を有し、ヘテロ二量体が、約 90 % 以上の純度を有する、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。

他のある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、第 1 および第 2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含み、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 L 3 5 1 Y および Y 4 0 7 A を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 A および K 4 0 9 F を含み、変種 C H 3 ドメインは、T 4 1 1 、 D 3 9 9 、 S 4 0 0 、 F 4 0 5 、 N 3 9 0 、 および / または K 3 9 2 の位置に 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む。D 3 9 9 の位置のこれらの突然変異には、D 3 9 9 R 、 D 3 9 9 W 、 D 3 9 9 Y 、 または D 3 9 9 K が含まれるが、これらに限定されない。T 4 1 1 の位置の突然変異には、T 4 1 1 N 、 T 4 1 1 R 、 T 4 1 1 Q 、 T 4 1 1 K 、 T 4 1 1 D 、 T 4 1 1 E 、 または T 4 1 1 W が含まれるが、これらに限定されない。S 4 0 0 の位置の突然変異には、S 4 0 0 E 、 S 4 0 0 D 、 S 4 0 0 R 、 または S 4 0 0 K が含まれるが、これらに限定されない。F 4 0 5 の位置の突然変異には、F 4 0 5 I 、 F 4 0 5 M 、 F 4 0 5 S 、 F 4 0 5 S 、 F 4 0 5 V 、 または F 4 0 5 W が含まれるが、これらに限定されない。N 3 9 0 の位置の突然変異には、N 3 9 0 R 、 N 3 9 0 K 、 または N 3 9 0 D が含まれるが、これらに限定されない。K 3 9 2 の位置の突然変異には、K 3 9 2 V 、 K 3 9 2 M 、 K 3 9 2 R 、 K 3 9 2 L 、 K 3 9 2 F 、 または K 3 9 2 E が含まれるが、これらに限定されない。表 1 の C H 3 变種 A Z 7 1 ~ 1 0 1 、 および表 4 、 および実施例 6 を参照すること。
10

【 0 1 4 4 】

例示的な実施形態において、ヘテロ多量体は、第 1 および第 2 のポリペプチド（本明細書において、鎖 A および鎖 B とも呼ばれる）を含むヘテロ二量体であり、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 Y 4 0 7 A を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 A および K 4 0 9 F を含む。1 つの態様において、このヘテロ二量体は、アミノ酸修飾 K 3 9 2 E 、 T 4 1 1 E 、 D 3 9 9 R 、 および S 4 0 0 R を更に含む。更なる実施形態において、ヘテロ多量体は、第 1 および第 2 のポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 D 3 9 9 R 、 S 4 0 0 R 、 および Y 4 0 7 A を含み、第 2 のポリペプチドは、アミノ酸修飾 T 3 6 6 A 、 K 4 0 9 F 、 K 3 9 2 E 、 および T 4 1 1 E を含む。
20

例示的な実施形態では、少なくとも 1 つの重鎖可変領域およびヘテロ二量体 F_c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F_c 領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、変種 C H 3 ドメインが、約 74 以上的融解温度 (T_m) を有し、ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および C H₁ ドメインを欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。別の実施形態では、ヘテロ二量体 F_c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F_c 領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、変種 C H 3 ドメインが、約 74 以上的融解温度 (T_m) を有し、ヘテロ二量体が、約 95 % 以上の純度を有し、ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および C H₁ ドメインを欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。
30

【 0 1 4 5 】

ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体 F_c 領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体 F_c 領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種 C H 3 ドメインを含み、変種 C H 3 ドメインが、約 70 を超える融解温度 (T_m) を有し、変種 C H 3 ドメインが、表 7 から選択され、ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および C H₁ ドメインを欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。
40

【 0 1 4 6 】

更に、少なくとも 1 つの单ードメイン抗原結合構築物と、改善された安定性および純度を有する F_c 变種ヘテロ二量体とを含むヘテロ多量体を設計するこの新たな方法は、他のクラスおよびアイソタイプの F_c 領域に適用され得る。ある特定の実施形態において、F_c 領域は、ヒト IgG F_c 領域である。更なる実施形態において、ヒト IgG F_c 領域
50

域は、ヒト Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、または Ig G 4 Fc 領域である。幾つかの実施形態において、Fc 領域は、Ig G、Ig A、Ig D、Ig E、および Ig M からなる群から選択される免疫グロブリンのものである。幾つかの実施形態において、Ig G は、Ig G 1、Ig G 2 a、Ig G 2 b、Ig G 3、および Ig 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。

【表 2 - 1】

表1.1 Fc変種ヘテロ二量体の生成におけるCH3ドメインアミノ酸修飾。

野生型 IgG1	変種	鎖	Fc 突然変異						
		A	-	-	-	-	-	-	-
		B	-	-	-	-	-	-	-
CH3 変種	AZ1	A	L368D	K370Q	-	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ2	A	L351I	L368D	K370Q	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ3	A	L351D	L368D	K370Q	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ4	A	L368D	K370E	-	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ5	A	L368D	K370E	-	-	-	-	-
		B	E357K	L368R	-	-	-	-	-
	AZ6	A	V397S	F405A	Y407V	-	-	-	-
		B	K392V	T394W	-	-	-	-	-
	AZ7	A	L351R	V397S	F405A	Y407V	-	-	-
		B	K392V	T394W	-	-	-	-	-
	AZ8	A	L351Y	V397S	F405A	Y407V	-	-	-
		B	K392V	T394W	-	-	-	-	-
	AZ9	A	V397S	F405A	Y407V	-	-	-	-
		B	L368R	K392V	T394W	-	-	-	-
	AZ10	A	V397T	F405I	-	-	-	-	-
		B	K392V	T394H	-	-	-	-	-
	AZ11	A	E357W	S364F	-	-	-	-	-
		B	Y349A	L351Y	K370I	-	-	-	-
	AZ12	A	E357H	S364F	-	-	-	-	-
		B	L351Y	K370I	-	-	-	-	-
	AZ13	A	E357W	S364F	-	-	-	-	-
		B	Y349A	L351Y	K370F	-	-	-	-
	AZ14	A	E357H	S364F	-	-	-	-	-
		B	L351Y	K370F	-	-	-	-	-
	AZ15	A	E357L	T366A	K409F	T411N	-	-	-
		B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

AZ16	A	E357L	T366A	K409Y	T411N	-	-	-
	B	L351Y	L368T	Y407A	-	-	-	-
AZ17	A	L351Y	F405A	Y407V	-	-	-	-
	B	T366I	T394W	-	-	-	-	-
AZ18	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366I	T394W	-	-	-	-	-
AZ19	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366L	T394W	-	-	-	-	-
AZ20	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366M	T394W	-	-	-	-	-
AZ21	A	L351Y	L368M	V397T	F405I	Y407V	-	-
	B	T366L	T394W	-	-	-	-	-
AZ22	A	L351Y	L368M	V397T	F405I	Y407V	-	-
	B	T366M	T394W	-	-	-	-	-
AZ23	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	L351I	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ24	A	L351Y	V397T	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	S354E	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ25	A	L351Y	V397T	L398D	S400E	F405M	Y407V	-
	B	T366I	N390R	T394W	-	-	-	-
AZ26	A	R344H	L351Y	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ27	A	R344H	L351Y	V397T	D401E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ28	A	Q347R	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354E	K360E	T366I	T394W	-	-	-
AZ29	A	Q347R	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354N	K360E	T366I	T394W	-	-	-
AZ30	A	T350V	L351Y	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	T350V	T366I	T394W	T411R	-	-	-
AZ31	A	R344H	L351Y	V397T	L398D	F405M	Y407V	-
	B	T366I	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ32	A	Q347R	T350V	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-
	B	T350V	K360E	T366I	T394W	T411R	-	-

【表 2 - 3】

AZ33	A	L351Y	F405A	Y407V	-	-	-	-
	B	T366I	K392M	T394W	-	-	-	-
AZ34	A	L351Y	S400E	F405A	Y407V	-	-	-
	B	T366I	N390R	K392M	T394W	-	-	-
AZ35	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ36	A	L351Y	K370Q	G371D	F405S	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ37	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	L398D	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ38	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	N390R	T394W	K409R	T411Q	-
AZ39	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366I	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ40	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366I	T394W	K409M	T411R	-	-	-
AZ41	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	L398D	F405M	Y407V
	B	T366I	T394W	K409M	T411R	-	-	-
AZ42	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	T366I	N390R	T394W	K409M	T411R	-	-
AZ43	A	L351Y	K370T	G371D	F405I	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364R	T394W	-	-	-	-
AZ44	A	L351Y	K370T	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364R	T394W	K409I	-	-	-
AZ45	A	R344H	L351Y	K370T	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	E357Q	S364R	T366I	N390R	T394W	K409I	-
AZ46	A	R344H	L351Y	K370T	G371D	F405M	Y407V	-
	B	E357Q	S364R	T366I	T394W	K409I	T411R	-
AZ47	A	L351Y	K370A	G371S	D399R	F405S	Y407V	-
	B	E357Q	Q362R	T364Y	T366I	T394W	K409S	-
AZ48	A	L351Y	V397S	D399W	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ49	A	L351Y	V397S	D399Y	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409I	-	-	-

10

20

30

40

【表 2 - 4】

AZ50	A	R344H	L351Y	V397T	L398D	D399W	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ51	A	R344H	L351Y	V397T	D399W	S400E	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ52	A	L368V	K370F	F405I	Y407V	-	-	-
	B	E357Q	S364Y	T366I	T394W	-	-	-
AZ53	A	L368V	K370Y	F405I	Y407V	-	-	-
	B	E357Q	S364Y	T394W	-	-	-	-
AZ54	A	R344H	L368V	K370Y	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	Q362R	S364Y	T394W	-	-	-
AZ55	A	L368V	K370Y	S400E	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364Y	N390R	T394W	-	-	-
AZ56	A	L368V	K370Y	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364Y	T394W	T411R	-	-	-
AZ57	A	R344H	L351Y	K370Y	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	Q362R	T364T	T366I	T394W	-	-
AZ58	A	L368V	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366Y	T394W	-	-	-	-	-
AZ59	A	L368V	K370Q	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	T394W	-	-	-	-	-
AZ60	A	R344H	L368V	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366Y	T394W	-	-	-	-
AZ61	A	L368V	V397T	S400E	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	N390R	T394W	-	-	-	-
AZ62	A	L368V	V397T	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ63	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ64	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ65	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351F	Y407A	-	-	-	-	-
AZ66	A	T366S	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-

【表 2 - 5】

AZ67	A	T366C	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ68	A	T366L	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ69	A	T366M	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ70	A	T366V	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ71	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	L351I	T366S	L368F	Y407A	-	-	-	-
AZ72	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	D399W	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ73	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	D399W	S400D	Y407A	-	-	-	-	-
AZ74	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	D399W	S400E	Y407A	-	-	-	-	-
AZ75	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-	-
	B	D399W	S400D	Y407A	-	-	-	-	-
AZ76	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-	-
	B	G371D	D399W	Y407A	-	-	-	-	-
AZ77	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-	-
	B	K370Q	G371D	D399W	Y407A	-	-	-	-
AZ78	A	T366A	N390R	K409F	-	-	-	-	-
	B	D399Y	S400D	Y407A	-	-	-	-	-
AZ79	A	Q362R	T366A	K409F	T411K	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ80	A	Q362R	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ81	A	Q362K	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-	-
AZ82	A	T366A	N390K	K392R	K409F	T411R	-	-	-
	B	S400E	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ83	A	T366A	N390K	K392R	K409F	T411K	-	-	-
	B	S400E	Y407A	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

【表 2 - 6】

AZ84	A	T366A	N390K	K409F	T411R	-	-	-
	B	S400D	Y407A	-	-	-	-	-
AZ85	A	T366A	K392L	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ86	A	T366A	K392L	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ87	A	T366A	K392L	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399K	Y407A	-	-	-	-	-
AZ88	A	T366A	K392L	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399K	Y407A	-	-	-	-	-
AZ89	A	T366A	K392M	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ90	A	T366A	K392M	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ91	A	T366A	K392F	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	F405V	Y407A	-	-	-	-
AZ92	A	T366A	K409F	T411E	-	-	-	-
	B	D399R	S400E	Y407A	-	-	-	-
AZ93	A	T366A	K409F	T411E	-	-	-	-
	B	D399R	S400D	Y407A	-	-	-	-
AZ94	A	T366A	K392E	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399R	S400R	Y407A	-	-	-	-
AZ95	A	T366A	K392E	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	S400R	Y407A	-	-	-	-
AZ96	A	Q362E	T366A	K409F	T411W	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ97	A	Q362D	T366A	K409F	T411W	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ98	A	S364Y	T366A	K409F	T411R	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ99	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L368V	Y407S	-	-	-	-	-
AZ100	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L351Y	L368S	Y407A	-	-	-	-

10

20

30

40

【表 2 - 7】

AZ101	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ102	A	E357Q	S364F	K392E	-	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400R	-	-	-	-
AZ103	A	E357Q	S364F	K392E	V397E	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400R	-	-	-	-
AZ104	A	E357Q	S364F	N390D	K392E	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400K	-	-	-	-
AZ105	A	E357Q	S364F	K370E	G371W	-	-	-
	B	E357Q	K360R	S364N	K370F	-	-	-
AZ106	A	S354R	D356K	E357Q	S364F	-	-	-
	B	S354E	K370F	K439E	-	-	-	-
AZ107	A	Q347R	E357Q	S364F	-	-	-	-
	B	Q347E	K360E	K370F	-	-	-	-
AZ108	A	E357Q	S364F	K370E	-	-	-	-
	B	E357R	K370F	-	-	-	-	-
AZ109	A	E357Q	S364F	L368D	K370E	-	-	-
	B	E357R	K370F	-	-	-	-	-
AZ110	A	E357Q	S364F	K370T	G371D	-	-	-
	B	E357Q	S364R	K370F	-	-	-	-
AZ111	A	E357Q	S364Y	K392E	-	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400K	-	-	-	-
AZ112	A	E357Q	S364Y	K392E	-	-	-	-
	B	L368A	K370F	V397R	S400K	-	-	-
AZ113	A	K409F	T411E	-	-	-	-	-
	B	L368V	D399R	S400D	-	-	-	-
AZ114	A	K409F	T411E	-	-	-	-	-
	B	L368V	D399K	S400D	-	-	-	-
AZ115	A	K409F	-	-	-	-	-	-
	B	L368V	D399Y	-	-	-	-	-
AZ116	A	E357Q	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	L368A	K370F	-	-	-	-	-
AZ117	A	S354R	D356K	K409F	T411R	-	-	-
	B	S354E	L368V	S400E	K439E	-	-	-

【表 2 - 8】

AZ118	A	K360E	K370E	-	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ119	A	K360E	K370E	-	-	-	-	-
	B	Y349K	E357R	-	-	-	-	-
AZ120	A	S354E	K360E	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ121	A	K360E	L368D	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ122	A	K360E	L368D	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	T411R	-	-	-	-
AZ123	A	K360E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	Y349R	E357Q	S364R	-	-	-	-
AZ124	A	K360E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	Y349R	E357Q	S364K	-	-	-	-
AZ125	A	S364E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	E357Q	S364R	G371R	-	-	-	-
AZ126	A	S364E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	E357Q	S364R	G371K	-	-	-	-
AZ127	A	G371D	T411E	-	-	-	-	-
	B	G371R	T411R	-	-	-	-	-
AZ128	A	G371D	T411E	-	-	-	-	-
	B	G371K	T411R	-	-	-	-	-
AZ129	A	Y349C	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354C	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ130	A	L351Y	S354C	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	Y349C	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ132	A	L368A	F405W	Y407V	-	-	-	-
	B	T366W	-	-	-	-	-	-

10

20

30

【表3】

表1.2: Fc変種ヘテロ二量体の生成におけるCH3ドメインアミノ酸修飾。CH3ドメインのDSC

融解温度は、図29A～29Bに示されている、および実施例に記載されているように推定された。

ヘテロ 二量体 純度 (%)	CH3 Tm (°C)	突然変異 (鎖A)	突然変異 (鎖B)
>98	70.5	F405A_Y407V	T366L_T394W
>98	73.5	F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
>98	76.5	T350V_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
>98	78.7	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
>98	79.5	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
>98	81.8	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
>98	81	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
>98	79.5	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	77.5	T350V_L351Y_S400E_F405V_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	77	T350V_L351Y_S400E_F405T_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	78	T350V_L351Y_S400E_F405S_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	76.5	T350V_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	76.5	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_L351Y_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	81.5	Q347R_T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_K360E_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	80.5	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390D_K392M_T394W
>98	79.5	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390E_K392M_T394W
>98	81.5	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392L_T394W
>98	76.5	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392F_T394W
>98	73.5	Y349C_F405A_Y407V	S354C_T366L_T394W
>98	78	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W
>98	82	Y349C_T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	82	Y349C_T350V_S400E_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_N390R_K392M_T394W
>98	76	L351Y_F405A_Y407V	T366I_K392M_T394W
>98	81.5	Y349C_T350V_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_K392M_T394W

10

20

30

【表4】

表1.3 Fc変種ヘテロ二量体の生成におけるCH3ドメインアミノ酸修飾。上記の表におけるKdは、実施例および図35に記載されたとおりに決定された。

CD16a (F158) Kd [M]	CD32b (Y163) Kd [M]	突然変異 (鎖A)	突然変異 (鎖B)
4.4E-07	1.7E-06	Herceptin WT	
4.5E-07	9.0E-07	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
3.7E-07	7.0E-07	T350V_L351Y_S400E_F405V_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
3.9E-07	6.7E-07	T350V_L351Y_S400E_F405T_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
4.2E-07	8.3E-07	T350V_L351Y_S400E_F405S_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
4.5E-07	1.0E-06	T350V_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
3.7E-07	7.1E-07	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_L351Y_T366L_N390R_K392M_T394W
4.2E-07	9.2E-07	Q347R_T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_K360E_T366L_N390R_K392M_T394W
4.3E-07	8.9E-07	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
4.3E-07	9.4E-07	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390D_K392M_T394W
4.2E-07	8.9E-07	T350V_L351Y_S400R_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390E_K392M_T394W
4.4E-07	9.1E-07	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392L_T394W
3.6E-07	7.1E-07	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392F_T394W
4.6E-07	1.1E-06	F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
4.3E-07	1.0E-06	T350V_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
4.8E-07	1.1E-06	F405A_Y407V	T366L_T394W
5.1E-07	1.2E-06	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W
5.8E-07	1.2E-06	Y349C_F405A_Y407V	S354C_T366L_T394W
6.3E-07	1.3E-06	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W
4.2E-07	9.5E-07	Y349C_T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_N390R_K392M_T394W
4.4E-07	1.1E-06	Y349C_T350V_S400E_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_N390R_K392M_T394W
4.2E-07	1.2E-06	L351Y_F405A_Y407V	T366I_K392M_T394W
4.2E-07	1.3E-06	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
4.6E-07	1.2E-06	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
4.6E-07	1.3E-06	Y349C_T350V_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_K392M_T394W
4.2E-07	1.1E-06	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
3.6E-07	9.9E-07	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W

Fc領域の定義

【0147】

本明細書に定義されているFc領域は、CH3ドメインまたはそのフラグメントを含み、ヒンジ、CH1、またはCH2を含む1つ以上の付加定常領域ドメインまたはそのフラグメントを追加的に含み得る。Fcアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al. , 1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VAのように、EUインデックスのものであることが理解される。「Kabatにより記載されたEUインデックス」は、ヒトIgG1 Kabat抗体のEUインデックス番号付けを意味する。便宜上、表Bは、ヒトIgG1のCH2およびCH3ドメインの、Kabatにより記載されたEUインデックスに従ったアミノ酸番号付けを提供する。

10

20

30

40

【表5】

表B

CH2ドメイン						CH3ドメイン					
EU番号	アミノ酸	EU番号	アミノ酸	EU番号	アミノ酸	EU番号	アミノ酸	EU番号	アミノ酸	EU番号	アミノ酸
231	A	271	P	311	Q	341	G	381	W	421	N
232	P	272	E	312	D	342	Q	382	E	422	V
233	E	273	V	313	W	343	P	383	S	423	F
234	L	274	K	314	L	344	R	384	N	424	S
235	L	275	F	315	N	345	E	385	G	425	C
236	G	276	N	316	G	346	P	386	Q	426	S
237	G	277	W	317	K	347	Q	387	P	427	V
238	P	278	Y	318	E	348	V	388	E	428	M
239	S	279	V	319	Y	349	Y	389	N	429	H
240	V	280	D	320	K	350	T	390	N	430	E
241	F	281	G	321	C	351	L	391	Y	431	A
242	L	282	V	322	K	352	P	392	K	432	L
243	F	283	E	323	V	353	P	393	T	433	H
244	P	284	V	324	S	354	S	394	T	434	N
245	P	285	H	325	N	355	R	395	P	435	H
246	K	286	N	326	K	356	D	396	P	436	Y
247	P	287	A	327	A	357	E	397	V	437	T
248	K	288	K	328	L	358	L	398	L	438	Q
249	D	289	T	329	P	359	T	399	D	439	K
250	T	290	K	330	A	360	K	400	S	440	S
251	L	291	P	331	P	361	N	401	D	441	L
252	M	292	R	332	I	362	Q	402	G	442	S
253	I	293	E	333	E	363	V	403	S	443	L
254	S	294	E	334	K	364	S	404	F	444	S
255	R	295	Q	335	T	365	L	405	F	445	P
256	T	296	Y	336	I	366	T	406	L	446	G
257	P	297	N	337	S	367	C	407	Y	447	K
258	E	298	S	338	K	368	L	408	S		
259	V	299	T	339	A	369	V	409	K		
260	T	300	Y	340	K	370	K	410	L		
261	C	301	R			371	G	411	T		
262	V	302	V			372	F	412	V		
263	V	303	V			373	Y	413	D		
264	V	304	S			374	P	414	K		
265	D	305	V			375	S	415	S		
266	V	306	L			376	D	416	R		
267	S	307	T			377	I	417	W		
268	H	308	V			378	A	418	Q		
269	E	309	L			379	V	419	Q		
270	D	310	H			380	E	420	G		

【0148】

ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、CH2ドメインを含むFc領域を含む。幾つかの実施形態において、CH2ドメインは、変種CH2ドメインである。幾つかの実施形態において、変種CH2ドメインは、第1および/または第2のポリペプチド鎖に非対称アミノ酸置換を含む。幾つかの実施形態において、ヘテロ多量体は、当該ヘテロ多量体の1つの鎖がFc受容体に選択的に結合するように、CH2ドメインに非対称アミノ酸置換を含む。

Fc R選択性

【0149】

1つの態様において、本出願は、ヘテロ二量体Fcに構築される非対称足場の設計を介して、精巧なFc R選択性プロファイルを達成する分子設計を記載する。この足場は、非対称突然変異がCH2ドメインにおいて多様な新規選択性プロファイルを達成すること

10

20

30

40

50

を可能にする。更に、足場は、多機能性（二、三、四、または五機能性）治療分子を操作する、固有の特徴を有する。ある特定の実施形態において、非対称足場は、分子のより良好な再循環を可能にし、かつその半減期および関連する薬物動態特性を増強させるため、新生児 Fc 受容体 (FcRn) への pH 依存性結合特性が最適化される。

【0150】

非対称足場は、機能的に関連する Fc RI 受容体アロタイプへの結合のために最適化され得る。Fc RI は、関節リウマチ、アトピー性皮膚炎、乾癬、および多数の肺疾患のような慢性炎症性障害に関与するマクロファージの顕著なマーカーである。

【0151】

非対称足場は、プロテイン A 結合のために最適化され得る。プロテイン A 結合は、多くの場合、抗体分子の分離および精製のために用いられる。突然変異は、治療剤の貯蔵の際の凝集を回避するために非対称足場に導入され得る。

【0152】

したがって、本発明の重鎖可変領域および Fc 变種を含むヘテロ多量体は、血清半減期の増加、結合親和性の増加、免疫原性の低減、產生の増加、ADCC もしくは CDC 活性の増強もしくは低減、グリコシル化の変化、ならびに / またはジスルフィド結合および修飾結合の特異性が含まれるが、これらに限定されない好ましい特徴を有する抗体をもたらす、1つ以上の追加のアミノ酸残基置換、突然変異、および / または修飾をとりわけ含有し得ることが、特に考慮される。

【0153】

インビボ半減期

本明細書に記載されているヘテロ多量体は、匹敵する分子と比べて、哺乳動物、特にヒトにおけるインビボ半減期（例えば、血清半減期）の増加、インビボ（例えば、血清半減期）および / もしくはインビトロ（例えば、保存寿命）における安定性の増加、ならびに / または融点 (Tm) の増加を含む他の変化した特徴を有し得ることが考慮される。1つの実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、15日を超える、20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2か月を超える、3か月を超える、4か月を超える、または5か月を超えるインビボ半減期を有する。別の実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、15日を超える、30日を超える、2か月を超える、3か月を超える、6か月を超える、または12か月を超える、または24か月を超える、または36か月を超える、または60か月を超えるインビトロ半減期（例えば、液体または粉末製剤）を有する。

【0154】

また、本発明のヘテロ多量体は、対象に投与されたとき変化した免疫原性を有し得ることも、当業者に理解される。したがって、Fc 变種の免疫原性を最小化する变種 CH3 ドメインは、一般に、治療用途においてより望ましいことが考慮される。

【0155】

変化したエフェクター機能

本発明のヘテロ多量体は、エフェクター機能を変化させる修飾が含まれるが、これに限定されない他の修飾と組み合わされ得る。本発明は、本発明のヘテロ多量体を他の Fc 修飾と組み合わせて、追加的な、相乗的な、または新規の特性を抗体または Fc 融合タンパク質にもたらすことを包含する。そのような修飾は、ヒンジまたは CH2（もしくは CH3 であるが、但し、本発明の变種 CH3 ドメインの安定性および純度特性を否定的に変えないことが条件である）ドメイン、あるいはこれらの組み合わせにおいてあり得る。本発明のヘテロ多量体は、それらが組み合わされる修飾の特性を増強することが考慮される。

【0156】

Fc R 結合

ヘテロ多量体の特徴決定の一部として、これらを、野生型 IgG1 と比較した比として報告される、Fc RIIIA (CD16a) および Fc RIIB (CD32b) への

10

20

30

40

50

結合親和性について試験した。（実施例4および表5を参照すること）この場合、活性化および阻害的Fc受容体への結合に対するCH3ドメイン突然変異の影響を評価することが可能であった。1つの実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、70を超える融解温度（Tm）を有し、CD16aへのヘテロ二量体の結合が、野生型ホモ二量体と比較してほぼ同じである、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。ある特定の実施形態において、CD16aへのヘテロ二量体の結合は、野生型ホモ二量体と比較して増加している。代替的な実施形態において、CD16aへのヘテロ二量体の結合は、野生型ホモ二量体と比較して低減している。

10

【0157】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの単一ドメイン抗原結合構築物およびヘテロ二量体Fc領域を含む単離ヘテロ多量体であって、ヘテロ二量体Fc領域が、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸修飾を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインが、70を超える融解温度（Tm）を有し、CD32bへのヘテロ二量体の結合が、野生型ホモ二量体と比較してほぼ同じであり、ヘテロ多量体が、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンCH1を欠いており、場合により免疫グロブリンCH2領域を欠いている、単離ヘテロ多量体が本明細書において提供される。ある特定の実施形態において、CD32bへのヘテロ二量体の結合は、野生型ホモ二量体と比較して増加している。代替的な実施形態において、CD32bへのヘテロ二量体の結合は、野生型ホモ二量体と比較して低減している。

20

【0158】

Fc変種と野生型ホモ二量体の比としてCD16aおよびCD32bへの結合のK_Dを報告する代わりに、K_Dを、CD16aへのFc変種の結合と、CD32bへのFc変種の結合との比として報告できることは、当業者に理解される（データは示されず）。この比は、野生型と比較して変化なし、増加から減少のいずれかであるADCに対する変種CH3ドメインの突然変異の指標を提供し、下記により詳細に記載される。

【0159】

Fc-Rへの本発明のヘテロ多量体の親和性および結合特性は、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイ（下記の表題「特徴決定および機能アッセイ」のセクションを参照すること）、ならびに間接的結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、ゲル電気泳動、およびクロマトグラフィー（例えばゲル滌過）のような他の方法が含まれるが、これらに限定されない、Fc-Fc-R相互作用、すなわちFc-RへのFc領域の特異的結合を決定する、当該技術に既知のインビトロアッセイ（生化学または免疫学に基づいたアッセイ）の使用により最初に決定される。これらおよび他の方法は、検査される1つ以上の成分上の標識を利用することができる、および/または色原体、蛍光、発光、または同位体標識が含まれるが、これらに限定されない多様な検出方法を用いることができる。結合親和性および動態学の詳細な記載は、抗体-免疫原相互作用に焦点を合わせる、Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)において見出され得る。

30

【0160】

本発明の分子の結合特性は、1つ以上のFc-Rメディエーターエフェクター細胞機能を決定するインビトロ機能アッセイ（下記の表題「特徴決定および機能アッセイ」のセクションを参照すること）によっても特徴決定されることが考慮される。ある特定の実施形態において、本発明の分子は、インビボモデル（例えば、本明細書に記載および開示されているもの）において、インビトロに基づいたアッセイと類似した結合特性を有する。しかし、本発明は、所望の表現型をインビトロに基づいたアッセイにおいて示さないが、所望の表現型をインビボで示す本発明の分子を除外しない。

40

【0161】

50

本発明は、匹敵する分子と比べて増加した親和性で $F_c - R_{III}A$ ($CD16a$) に結合する F_c 変種を含むヘテロ多量体を包含する。ある特定の実施形態において、本発明の F_c 変種は、匹敵する分子と比べて、増加した親和性で $F_c - R_{III}A$ に結合し、変化しない、または低減した結合親和性で $F_c - R_{IIB}$ ($CD32b$) に結合する。なお別の実施形態において、本発明の F_c 変種は、匹敵する分子と比べて減少した $F_c - R_{IIB}$ 平衡解離定数 (K_D) の比を有する。

【0162】

匹敵する分子と比べて減少した親和性で $F_c - R_{III}A$ ($CD16a$) に結合する F_c 変種を含むヘテロ多量体も、本発明に包含される。ある特定の実施形態において、本発明の F_c 変種は、匹敵する分子と比べて減少した親和性で $F_c - R_{III}A$ に結合し、匹敵する分子と比べて変化しない、または増加した結合親和性で $F_c - R_{IIB}$ に結合する。
10

【0163】

1つの実施形態において、ヘテロ多量体は、増加した親和性で $F_c - R_{III}A$ に結合する F_c 変種を含む。ある特定の実施形態において、当該 F_c 変種は、匹敵する分子よりも少なくとも 2 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 30 倍、または少なくとも 40 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 60 倍、または少なくとも 70 倍、または少なくとも 80 倍、または少なくとも 90 倍、または少なくとも 100 倍、または少なくとも 200 倍大きい、 $F_c - R_{III}A$ への親和性を有する。他の実施形態において、 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10%、または少なくとも 20%、または少なくとも 30%、または少なくとも 40%、または少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 100%、または少なくとも 150%、または少なくとも 200% 増加した、 $F_c - R_{III}A$ への親和性を有する。
20

【0164】

別の実施形態において、 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて約 2 倍 ~ 10 倍、または約 5 倍 ~ 50 倍、または約 25 倍 ~ 250 倍、または約 100 倍 ~ 500 倍、または約 250 倍 ~ 1000 倍減少した、 F_c リガンド (例えば、 $F_c - R_{C1q}$) の平衡解離定数 (K_D) を有する。
30

【0165】

別の実施形態において、当該 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 2 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 30 倍、または少なくとも 40 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 60 倍、または少なくとも 70 倍、または少なくとも 80 倍、または少なくとも 90 倍、または少なくとも 100 倍、または少なくとも 200 倍、または少なくとも 400 倍、または少なくとも 600 倍低減した、 $F_c - R_{IIB}$ の平衡解離定数 (K_D) を有する。別の実施形態において、 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10%、または少なくとも 20%、または少なくとも 30%、または少なくとも 40%、または少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 100%、または少なくとも 150%、または少なくとも 200% 低減した、 $F_c - R_{IIB}$ の平衡解離定数 (K_D) を有する。
40

【0166】

1つの実施形態において、 F_c 変種は、変化しない、または低減した親和性で $F_c - R_{IIB}$ に結合する。ある特定の実施形態において、当該 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 1 倍、もしくは少なくとも 3 倍、もしくは少なくとも 5 倍、もしくは少なくとも 10 倍、もしくは少なくとも 20 倍、もしくは少なくとも 50 倍、もしくは少なくとも 100 倍低減した、 $F_c - R_{IIB}$ への親和性を有する。他の実施形態において、 F_c 変種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 10%
50

、もしくは少なくとも 20%、もしくは少なくとも 30%、もしくは少なくとも 40%、もしくは少なくとも 50%、もしくは少なくとも 60%、もしくは少なくとも 70%、もしくは少なくとも 80%、もしくは少なくとも 90%、もしくは少なくとも 100%、もしくは少なくとも 150%、もしくは少なくとも 200% 低減した、Fc R I I B への親和性を有する。

【0167】

別の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 2 倍、もしくは少なくとも 3 倍、もしくは少なくとも 5 倍、もしくは少なくとも 7 倍、もしくは少なくとも 10 倍、もしくは少なくとも 20 倍、もしくは少なくとも 30 倍、もしくは少なくとも 40 倍、もしくは少なくとも 50 倍、もしくは少なくとも 60 倍、もしくは少なくとも 70 倍、もしくは少なくとも 50 倍、もしくは少なくとも 90 倍、もしくは少なくとも 100 倍、もしくは少なくとも 200 倍増加した、Fc R I I B の平衡解離定数 (K_D) を有する。別のある特定の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 10%、もしくは少なくとも 20%、もしくは少なくとも 30%、もしくは少なくとも 40%、もしくは少なくとも 50%、もしくは少なくとも 60%、もしくは少なくとも 70%、もしくは少なくとも 80%、もしくは少なくとも 90%、もしくは少なくとも 100%、もしくは少なくとも 200% 増加した、Fc R I I B の平衡解離定数 (K_D) を有する。

【0168】

更に別の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて増加した親和性で Fc R I I I A に結合し、匹敵する分子と比べて変化しない、または減少した親和性で Fc R I I B に結合する。ある特定の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 1 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍増加した、Fc R I I I A への親和性を有する。別の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 2 倍、もしくは少なくとも 3 倍、もしくは少なくとも 5 倍、もしくは少なくとも 7 倍、もしくは少なくとも 10 倍、もしくは少なくとも 20 倍、もしくは少なくとも 50 倍、もしくは少なくとも 100 倍低減した、Fc R I I B への親和性を有する。他の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10%、または少なくとも 20%、または少なくとも 30%、または少なくとも 40%、または少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 100%、または少なくとも 150%、または少なくとも 200% 増加した、Fc R I I I A への親和性を有し、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて変化しない、または少なくとも 10%、もしくは少なくとも 20%、もしくは少なくとも 30%、もしくは少なくとも 40%、もしくは少なくとも 50%、もしくは少なくとも 60%、もしくは少なくとも 70%、もしくは少なくとも 80%、もしくは少なくとも 90%、もしくは少なくとも 100%、もしくは少なくとも 150%、もしくは少なくとも 200% 增加した、Fc R I I B への親和性を有する。

【0169】

なお別の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて減少した Fc R I I I A / Fc R I I B 平衡解離定数 (K_D) の比を有する。ある特定の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 1 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍減少した、Fc R I I I A / Fc R I I B 平衡解離定数 (K_D) の比を有する。別のある特定の実施形態において、Fc 变種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10%、または少なくとも 20%、または少なくとも 30%、または少なくとも 40%、または少なくとも 50%、または少なくとも 60%、または少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 100%、または少なくとも 150%、または少なくとも 200% 減少した、Fc R I I I

10

20

30

40

50

A / F c R I I B 平衡解離定数 (K_D) の比を有する。

【0170】

別の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比べて減少した親和性で F c R I I I A に結合する。ある特定の実施形態において、当該 F c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 1 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍低減した、F c R I I I A への親和性を有する。他の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10 %、または少なくとも 20 %、または少なくとも 30 %、または少なくとも 40 %、または少なくとも 50 %、または少なくとも 60 %、または少なくとも 70 %、または少なくとも 80 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 100 %、または少なくとも 150 %、または少なくとも 200 % 減少した、F c R I I I A への親和性を有する。

【0171】

さらに別の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比べて、減少した親和性で F c R I I I A に結合し、変化しない、または増加した親和性で F c R I I B に結合する。ある特定の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 1 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍低減した、F c R I I I A への親和性を有する。別のある特定の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子よりも少なくとも 2 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍大きい、F c R I I B への親和性を有する。他の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 10 %、または少なくとも 20 %、または少なくとも 30 %、または少なくとも 40 %、または少なくとも 50 %、または少なくとも 60 %、または少なくとも 70 %、または少なくとも 80 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 100 %、または少なくとも 150 %、または少なくとも 200 % 減少した、F c R I I I A への親和性を有し、F c 変種は、匹敵する分子と比べ少なくとも 10 %、または少なくとも 20 %、または少なくとも 30 %、または少なくとも 40 %、または少なくとも 50 %、または少なくとも 60 %、または少なくとも 70 %、または少なくとも 80 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 100 %、または少なくとも 150 %、または少なくとも 200 % 増加した、F c R I I B への親和性を有する。

【0172】

更に別の実施形態において、F c 変種は、匹敵する分子と比較して少なくとも 1 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍増加した、F c R I I I A の平衡解離定数 (K_D) を有する。ある特定の実施形態において、当該 F c 変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも 2 倍、または少なくとも 3 倍、または少なくとも 5 倍、または少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、または少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍減少した、F c R I I B の平衡解離定数 (K_D) を有する。

【0173】

f c R 選択性のための C H 2 変異

この複合体における F c - F c R タンパク質間相互作用は、ヘテロ多量体の 2 つの鎖が F c R 分子の 2 つの別個の部位と相互作用することを示す。天然の F c 分子における 2 つの重鎖には対称性があるが、1 つの鎖の残基の周りの局所 F c R 環境は、反対側の F c 鎖の同じ残基位置の周囲にある F c R 残基と異なる。2 つの対称関連位置は、F c R 残基の異なる選択肢と相互作用する。

【0174】

F c と F c R との会合における非対称性を考慮すると、F c 分子の鎖 A および B への同時突然変異は、対称的な方法で F c R との相互作用に影響を与えない。ホモ二量体 F

10

20

30

40

50

c 構造の Fc の 1 つの鎖におけるその局所 Fc - R 環境との相互作用を最適化する突然変異を導入すると、第 2 の鎖における対応する突然変異は、必要な Fc - R 結合および選択性プロファイルにとって好ましい、好ましくない、または寄与しないものであり得る。

【 0 1 7 5 】

構造および計算誘導手法の使用により、非対称突然変異が Fc の 2 つの鎖において操作されて、Fc の両方の鎖に同じ突然変異を導入する伝統的な Fc 操作戦略の限界を克服する。Fc の 2 つの鎖が、受容体分子の対応する面への増強された結合のために独立して最適化される場合、受容体間のより良好な結合選択性が達成され得る。

【 0 1 7 6 】

例えば、Fc の 1 つの鎖における特定の位置の突然変異は、積極的設計努力において、特定の残基への選択性を増強するために設計され得、一方、消極的設計努力において、同じ残基位置は、代替的な Fc 受容体の種類の局所環境と好ましくない相互作用するために突然変異され得、このようにして、2 つの受容体間のより良好な選択性を達成する。ある特定の実施形態において、異なる Fc ガンマ受容体と比較して 1 つの Fc ガンマ受容体に選択的に結合する（例えば、Fc g R I I b の代わりに Fc g R I I I a に選択的に結合する）非対称アミノ酸修飾を、CH2 ドメインに設計する方法が提供される。他のある特定の実施形態において、ヘテロ二量体の形成を促進するため、CH3 ドメインにアミノ酸修飾を含む変種 Fc ヘテロ二量体の CH2 ドメインに非対称アミノ酸修飾を設計する方法が提供される。別の実施形態において、CH2 ドメインに非対称アミノ酸修飾を含む変種 Fc ヘテロ二量体に基づいた、異なる Fc ガンマ受容体への選択性を設計する方法が提供される。なお別の実施形態において、Fc 分子の一面への Fc ガンマ受容体の結合を偏らせる非対称アミノ酸修飾を設計する方法が提供される。他のある特定の実施形態において、Fc ガンマ受容体を、CH2 ドメインに非対称アミノ酸修飾を含む変種 Fc ヘテロ二量体の一面のみと相互作用するように偏らせる、極性ドライバーを設計する方法が提供される。

【 0 1 7 7 】

CH2 ドメインにおける突然変異の非対称設計は、Fc 分子の一面において Fc - R を認識する目的に合わせて作られ得る。これは、非対称 Fc 足場の產生面を構成するが、反対面は、設計された選択性プロファイルのない野生型様相互作用の傾向を表し、非產生面と考慮され得る。消極的設計戦略を用いて、突然変異を非產生面に導入し、非対称 Fc 足場のこちら側で Fc - R 相互作用を阻止して、それにより Fc 受容体に所望の相互作用の傾向を強いることができる。

【表 6】

表E 異なるFc γ 受容体へのFcの潜在的に興味深い選択性プロファイル

受容体結合			
変種選択性	Fc γ RIIa F/V	Fc γ RIIa H/R	Fc γ RIIb F/Y
↑/-	x	x	
x	↑/-	x	
x	x	↑/-	
↑/-	↑/-	x	
↑/-	x	↑/-	
x	↑/-	↑/-	

(/ -) は、特定の受容体の種類またはそのアロタイプの 1 つへの増加した、または野

10

20

30

40

50

生型様結合を示す変種を示す。(×)は、受容体またはサブセットのアロタイプへの注目すべき結合がないことを示す。

【0178】

本明細書において提供されるある特定の実施形態は、Fc領域に融合した結合ドメインを含む融合ポリペプチドに關し、Fc領域は、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含む変種CH3ドメインを含み、変種CH3ドメインは、70を超える融解温度(Tm)を有する。変種CH3ドメインを含むヘテロ二量体を含む分子は、当業者に周知の方法により生成され得ることが、特に考慮される。簡潔には、そのような方法には、可変領域を組み合わせること、あるいは所望の特異性を有するドメイン(例えば、ファージディスプレーもしくは発現ライブラリーから単離される、またはヒトもしくは非ヒト抗体から誘導される可変領域、または受容体の結合ドメイン)を変種Fcヘテロ二量体と結合させることが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、当業者は、Fc領域(例えば、抗体)を含む分子のFc領域におけるCH3ドメインを修飾することにより、変種Fcヘテロ二量体を生成することができる。

10

【0179】

「抗体依存性細胞仲介細胞傷害性」または「ADCC」は、特定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)に結合した分泌抗体が、細胞傷害性エフェクター細胞を抗原治癒標的細胞に特異的に結合させ、続いて標的細胞を細胞毒素により死滅させる、細胞傷害性の形態を意味する。標的細胞の表面に向けられた特定の高親和性IgG抗体は、細胞傷害性細胞を「武装し」、そのような死滅にとって絶対に必要である。標的細胞の溶解は細胞外であり、直接的な細胞間接触を必要とし、補体を伴わない。

20

【0180】

ADCCにより標的細胞の溶解を仲介する任意の特定の抗体の能力を、アッセイすることができる。ADCC活性を評価するため、目的の抗体は、抗原抗体複合体により活性されて標的細胞に細胞溶解をもたらし得る免疫エフェクター細胞との組み合わせにより標的細胞に添加される。細胞溶解は、溶解した細胞からの標識(例えば、放射性基質、蛍光色素、または天然の細胞内タンパク質)の放出により、一般に検出される。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。インビトロADCCアッセイの特定の例は、Wise et al., 1985, 79:277; Bruggemann et al., 1987, J. Exp. Med. 166:1351; Wilkinson et al., 2001, J. Immunol. Methods 258:183; Patel et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:29、および本明細書(下記の表題「特徴決定および機能アッセイ」のセクションを参照すること)に記載されている。あるいは、または追加的には、目的の抗体のADCC活性をインビボにおいて、例えば、Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652に開示されているような動物モデルにおいて評価することができる。

30

【0181】

本発明は、増強されたCDC機能を有するFc変種を含むヘテロ多量体を更に提供する。1つの実施形態において、Fc変種は増加したCDC活性を有する。1つの実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍大きいCDC活性を有する。別の実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍大きい親和性でC1qに結合する。なお別の実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも9

40

50

0 %、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%増加したCDC活性を有する。ある特定の実施形態において、本発明のFc変種は、増加した親和性でC1qに結合し、増強されたCDC活性を有し、少なくとも1つの抗原に特異的に結合する。

【0182】

本発明は、低減したCDC機能を有するFc変種を含むヘテロ多量体も提供する。1つの実施形態において、Fc変種は低減したCDC活性を有する。1つの実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子よりも少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも100倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍小さいCDC活性を有する。別の実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも1倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍低減した親和性でC1qに結合する。別の実施形態において、Fc変種は、匹敵する分子と比べて少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%減少したCDC活性を有する。ある特定の実施形態において、Fc変種は、減少した親和性でC1qに結合し、低減したCDC活性を有し、少なくとも1つの抗原に特異的に結合する。

【0183】

幾つかの実施形態において、Fc変種は、1つ以上の操作されたグリコフォーム、すなわちFc領域を含む分子に共有結合している炭水化物組成物を含む。操作されたグリコフォームは、エフェクター機能を増強または低減することが含まれるが、これらに限定されない多様な目的に有用であり得る。操作されたグリコフォームは、当業者に既知の任意の方法により、例えば、操作もしくは変種発現株の使用により、1つの以上の酵素、例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTⅢ)を用いる同時発現により、Fc領域を含む分子を多様な生物体もしくは多様な生物体の細胞系に発現させることにより、またはFc領域を含む分子を発現させた後に炭水化物を修飾することにより生成され得る。操作されたグリコフォームを生成する方法は、当該技術において知られており、Umana et al., 1999, Nat. Biotech. no117: 176-180; Davies et al., 20017 Biotech Bioeng 74: 288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278: 3466-3473)米国特許第6,602,684号、米国特許出願第10/277,370号、米国特許出願第10/113,929号、PCT国際公開第00/61739A1号、PCT国際公開第01/292246A1号、PCT国際公開第02/311140A1号、PCT国際公開第02/30954A1号、Potelligent(商標)技術(Biowa, Inc. Princeton, N.J.)、GlycomAb(商標)グリコシル化操作技術(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。例えば、国際公開第00061739号、ユーラシア特許第01229125号、米国特許出願第20030115614号、Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49を参照すること。

【0184】

Fc変種は、可変領域およびヘテロ二量体Fc領域を含む抗体を含み、ヘテロ二量体Fc領域は、増加した安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進するアミノ酸突然変異を含むCH3ドメインを含み、変種CH3ドメインは、70 °Cを超える融解温度(Tm)を有することが考慮される。抗体であるFc変種は、少なくとも1つの抗原に特異的に結合する可変ドメイン、そのフラグメントと、変種CH3ドメインを含むヘテロ多量体Fc領域

10

20

30

40

50

とを組み合わせることにより、「デノボ」で產生され得る。あるいは、ヘテロ二量体 Fc 変種は、抗原に結合する抗体を含有する Fc 領域の CH3 ドメインを修飾することにより產生され得る。

【0185】

本発明のヘテロ多量体は、単一特異的、二重特異的、三重特異的であり得る、またはより大きな多特異性を有し得る。多特異的抗体は、所望の標的分子の異なるエピトープに特異的に結合し得る、または標的分子はもとより、異種ポリペプチドもしくは固体支持体材料のような異種エピトープにも特異的に結合し得る。例えば、国際公開公報第 94/04690 号、同第 93/17715 号、同第 92/08802 号、同第 91/00360 号、および同第 92/05793 号、Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147: 60-69、米国特許第 4,474,893 号、同第 4,714,681 号、同第 4,925,648 号、同第 5,573,920 号、および同第 5,601,819 号、ならびに Kostelny, et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547 を参照すること)。 10

【0186】

分子を多機能的に標的にする多様な実施形態は、図 20 に示されているこの非対称足場に基づいて設計され得る。

【0187】

二重特異的または多特異的抗体

多特異的ヘテロ多量体は、少なくとも 2 つの異なる抗原への結合特異性を有する抗体に基づいている。そのような分子は、通常、2 つの抗原のみに結合するが(すなわち、二重特異的抗体、BsAb)、三重特異的抗体のような追加の特異性を有する抗体は、本発明に包含される。BsAb の例には、一方の腕が腫瘍細胞抗原に向けられ、他方の腕が細胞傷害性分子に向けられている、または両方の腕が 2 つの異なる腫瘍細胞抗原に向けられている、または両方の腕が 2 つの異なる可溶性リガンドに向けられている、または一方の腕が可溶性リガンドに向けられ、他方の腕が細胞表面受容体に向けられている、または両方の腕が、2 つの異なる細胞表面受容体に向けられているものが含まれるが、これらに限定されない。二重特異的抗体を作製する方法は、当該技術において知られている。 20

【0188】

異なる手法に応じて、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体 - 抗原組み合わせ部位)は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は、少なくとも一部のヒンジ、CH2、および CH3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインによるものであり得る。免疫グロブリン重鎖融合体をコードする DNA が、別々の発現ベクターに挿入され、適切な宿主生物体に同時形質移入される。このことは、構築に使用される 3 つのポリペプチド鎖の等しくない比が最適な収量をもたらす場合、実施形態における 3 つのポリペプチドフラグメントの相互割合の調整に大きな柔軟性をもたらす。実施例 1 および表 2 を参照すること。しかし、等しい比の少なくとも 2 つのポリペプチド鎖の発現が高い収量をもたらす場合、または比が特に有意ではない場合、2 つまたは 3 つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を 1 つの発現ベクターに挿入することが可能である。 30

【0189】

二重特異的抗体には、架橋または「ヘテロ複合体」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ複合体における一方の抗体は、アビジンに結合することができ、他方はビオチンに結合することができる。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に向けて標的化するために(米国特許第 4,676,980 号)、ならびに HIV 感染を治療するために(国際公開第 91/00360 号、同第 92/200373 号、およびヨーロッパ特許第 03089 号)、提案されている。ヘテロ複合体抗体は、任意の従来の架橋方法を使用して作製され得る。適切な架橋剤は、当該技術において良く知られており、多数の架橋技術と共に米国特許出第 4,676,980 号に開示されている。

【0190】

変種 CH3 ドメインを組み込んでいる 2 価を超える抗体、および得られる本発明の Fc

10

20

30

40

50

ヘテロ二量体が考慮される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。例えば、Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) を参照すること。

【0191】

血清半減期

本発明の抗体は、15日を超える、20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2か月を超える、3か月を超える、4か月を超える、または5か月を超える、哺乳動物（例えば、ヒト）における半減期（例えば、血清半減期）を有するものも包含する。哺乳動物（例えば、ヒト）における本発明の抗体の増加した半減期は、哺乳動物における当該抗体または抗体フラグメントの高い血清力価をもたらし、したがって、当該抗体もしくは抗体フラグメントの投与頻度を低減する、および/または投与される当該抗体もしくは抗体フラグメントの濃度を低減する。増加したインビトロ半減期を有する抗体は、当業者に既知の技術により生成され得る。例えば、増加したインビボ半減期を有する抗体は、FcドメインとFcRn受容体との相互作用に関与することが同定されているアミノ酸残基の修飾（例えば、置換、欠失、または付加）により生成され得る（例えば、国際公開公報第97/34631号、同第04/029207号、米国特許第6,737,056号、および米国特許公開第2003/0190311号を参照すること）。

10

【0192】

治療抗体

ある特定の実施形態において、少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖可変領域および変種CH3ドメインを含む変種Fcヘテロ二量体は、多特異的抗体であり、ヘテロ多量体は、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリンCH1領域を欠いており、場合により免疫グロブリンCH2領域を欠いており（本明細書において、本発明の抗体と呼ばれる）、本発明の抗体は、目的の抗原に特異的に結合する。特に、本発明の抗体は、二重特異的抗体である。1つの実施形態において、本発明の抗体は、ポリペプチド抗原に特異的に結合する。別の実施形態において、本発明の抗体は、非ポリペプチド抗原に特異的に結合する。なお別の実施形態において、疾患または障害に罹患している哺乳動物への本発明の抗体の投与は、その哺乳動物に治療利益をもたらし得る。

20

【0193】

ALK受容体（プレイオトロフィン受容体）、プレイオトロフィン、KS1/4汎癌腫抗原；卵巣癌抗原（CA125）；前立腺酸性ホスフェート；前立腺特異的抗原（PSA）；黒色腫関連抗原p97；黒色腫抗原gp75；高分子量黒色腫抗原（HMW-MAA）；前立腺特異的膜抗原；癌胎児性抗原（CEA）；多形上皮ムチン抗原；ヒト乳脂肪球抗原；CEA、TAG-72、CO17-1A、GICA19-9、CTA-1、およびLEAのような直腸結腸腫瘍関連抗原；バーキットリンパ腫抗原38.13；CD19；ヒトBリンパ腫抗原CD20；CD33；ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2、およびガングリオシドGM3のような黒色腫特異的抗原；腫瘍特異的移植型細胞表面抗原（TSTA）；T抗原、DNA腫瘍ウイルス、およびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原を含むウイルス誘発性腫瘍抗原；結腸のCEA、5T4癌胎児性栄養芽細胞糖タンパク質、および膀胱腫瘍癌胎児性抗原のような癌胎児性抗原-アルファ-フェトプロテイン；ヒト肺癌抗原L6およびL20のような分化抗原；線維肉腫の抗原；ヒト白血病T細胞抗原Gp37；ネオ糖タンパク質；スフィンゴ脂質；EGFR（上皮増殖因子受容体）のような乳癌抗原；NY-BR-16；NY-BR-16およびHER2抗原（p185HER2）；多形上皮ムチン（PEM）；悪性ヒトリンパ球抗原APO-1；胎児の赤血球において見出されるI抗原のような分化抗原；成人の赤血球において見出される一次内胚葉I抗原；着床前胚；胃腺癌において見出されるI（Ma）；乳房上皮において見出されるM18、M39；骨髄細胞において見出されるSSEA-1；VEP8；VEP9；My1；Va4-D5；結腸直腸癌において見出されるD₁56-22；TRA-1-85（血液型H）；精巣および卵巣癌において見出されるSCP-1；結腸腺癌において見出されるC14；肺腺癌において見出されるF3；胃癌におい

30

40

50

て見出される A H 6 ; Y ハプテン ; 胚性癌腫細胞において見出される L e y ; T L 5 (血液型 A) ; A 4 3 1 細胞において見出される E G F 受容体 ; 膵癌において見出される E ₁ シリーズ (血液型 B) ; 胚性癌腫細胞において見出される F C 1 0 . 2 ; 胃腺癌抗原 ; 腺癌において見出される C O - 5 1 4 (血液型 L e a) ; 腺癌において見出される N S - 1 0 ; C O - 4 3 (血液型 L e b) ; A 4 3 1 細胞の E G F 受容体において見出される G 4 9 ; 結腸腺癌において見出される M H 2 (血液型 A L e b / L e y) ; 結腸癌において見出される 1 9 . 9 ; 胃癌ムチン ; 骨髄細胞において見出される T ₅ A ₇ ; 黒色腫において見出される R ₂ 4 ; 胚性癌腫において見出される 4 . 2 、 G _D ₃ 、 D 1 . 1 、 O F A - 1 、 G _M ₂ 、 O F A - 2 、 G _D ₂ 、 および M 1 : 2 2 : 2 5 : 8 、ならびに 4 ~ 8 細胞期の胚において見出される S S E A - 3 および S S E A - 4 ; 皮膚 T 細胞リンパ腫抗原 ; M A R T - 1 抗原 ; S i a l y T n (S T n) 抗原 ; 結腸癌抗原 N Y - C O - 4 5 ; 肺癌抗原 N Y - L U - 1 2 勇者 A ; 腺癌抗原 A R T 1 ; 腫瘍隨伴関連脳 - 精巣癌抗原 (癌神経抗原 M A 2 、腫瘍隨伴性神経抗原) ; 神経癌腹側抗原 2 (N O V A 2) ; 肝細胞癌抗原遺伝子 5 2 0 ; T U M O R - A S S O C I A T E D A N T I G E N C O - 0 2 9 ; 腫瘍関連抗原 M A G E - C 1 (癌 / 精巣抗原 C T 7) 、 M A G E - B 1 (M A G E - X P 抗原) 、 M A G E - B 2 (D A M 6) 、 M A G E - 2 、 M A G E - 4 - a 、 M A G E - 4 - b 、 および M A G E - X 2 ; 癌 - 精巣抗原 (N Y - E O S - 1) 、ならびに上記に列記されたポリペプチドの任意のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない癌抗原に特異的結合する本発明の抗体も提供される。

【 0 1 9 4 】

10

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ多量体は、少なくとも 1 つの治療抗体の少なくとも 1 つのドメインと競合する。幾つかの実施形態において、治療抗体は癌標的抗原と結合する。一実施形態において、治療抗体は、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バビネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テプリズマブ、トシリズマブ / アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、P r o x i n i u m (商標) 、 R e n c a r e x (商標) 、ウステキヌマブ、ザルツムマブ、および任意の他の抗体からなる群から選択され得る。

20

【 0 1 9 5 】

30

抗体誘導体

本発明の抗体には、修飾されている (すなわち、共有結合のような抗体への任意の種類の分子の共有結合により) 誘導体が含まれる。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護 / ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾された抗体が含まれる。多数の化学修飾のいずれも、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などが含まれるが、これらに限定されない既知の技術により実施され得る。加えて、誘導体は、1 つ以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。

40

【 0 1 9 6 】

増加したインビボ半減期を有する抗体またはそのフラグメントは、高分子量ポリエチレンギリコール (P E G) のようなポリマー分子を抗体または抗体フラグメントに結合することによって、生成され得る。 P E G は、抗体もしくは抗体フラグメントの N もしくは C 末端への P E G の部位特異的複合体化、またはリシン残基に存在するイブシロン - アミノ基のいずれかを介して、多機能性リンカーを用いて、または用いることなく、当該抗体または抗体フラグメントに結合され得る。生物学的活性の最小限の損失をもたらす直鎖また

50

は分岐鎖ポリマー誘導体化が、使用される。複合体化の程度は、抗体へのPEG分子の適切な複合体化を確実にするため、SDS-PAGEおよび質量分析により密接にモニターされる。未反応PEGは、例えばサイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーにより、抗体-PEG複合体から分離され得る。

【0197】

更に、抗体は、インビボにおいてより安定した抗体もしくは抗体フラグメントを作製するため、またはインビボにおいてより長い半減期を有するため、アルブミンと複合体化され得る。技術は、当該技術において良く知られており、例えば、国際公開公報第93/15199号、同第93/15200号、および同第01/77137号、ならびにヨーロッパ特許第413,622号を参照すること。本発明は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣剤、合成薬剤、無機分子、および有機分子が含まれるが、これらに限定されない1つ以上の部分に複合体化または融合した抗体またはそのフラグメントの使用を包含する。

【0198】

本発明は、融合タンパク質を生成するための、異種タンパク質またはポリペプチドに（またはそのフラグメントに、例えば、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個または少なくとも100個のアミノ酸のポリペプチドに）組み換えるに融合または化学的に複合体化した（共有および非共有複合体化の両方を含む）、抗体またはそのフラグメントの使用を包含する。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じ得る。例えば、抗体は、抗体を特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合または複合体化させることにより、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、特定の細胞型に対して異種ポリペプチドを標的化するために使用され得る。異種ポリペプチドに融合または複合体化した抗体は、当該技術に既知の方法を使用するインビトロ免疫アッセイおよび精製方法にも使用され得る。例えば、国際公開公報第93/21232号、ヨーロッパ特許第439,095号、Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39: 91-99、米国特許第5,474,981号、Gillies et al., 1992, PNAS 89: 1428-1432、およびFell et al., 1991, J. Immunol. 146: 2446-2452を参照すること。

【0199】

本発明は、抗体フラグメントに融合または複合体化した異種タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを含む組成物を更に含む。例えば、異種ポリペプチドは、Fabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、F(ab)₂フラグメント、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、VL CDR、またはこれらのフラグメントに融合または複合体化し得る。ポリペプチドを抗体部分に融合または複合体化する方法は、当該技術において良く知られている。例えば、米国特許第5,336,603号、同第5,622,929号、同第5,359,046号、同第5,349,053号、同第5,447,851号、および同第5,112,946号、ヨーロッパ特許第307,434号および同第367,166号、国際公開公報第96/04388号および同第91/06570号、Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539、Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154: 5590-5600、およびVil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341を参照すること。

【0200】

例えば、抗原（例えば、上記）に特異的に結合する抗体の追加の融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリング、および/またはコドンシャフリング（集合手に「DNAシャフリング」と呼ばれる）の技術によって生成され得る。DNAシャフリングは、本発明の抗体またはそのフラグメントの活性を変えるため

10

20

30

40

50

に用いることができる（例えば、高い親和性および低い解離速度を有する抗体またはそのフラグメント）。一般に、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、ならびにPatten et al., 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33, Hayayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82, Hansson, et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265-76、およびLorenzo and Blasco, 1998, *Biotechniques* 24(2):308-313を参照すること。抗体もしくはそのフラグメントは、組み換えの前に、エラー-プローンPCR、ランダムスクレオチド挿入、または他の方法によるランダム突然変異誘発に付されることより変えられ得る。抗体または抗体フラグメントをコードするポリスクレオチドの、抗原に特異的に結合する1つ以上の部分は、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、セクション、一部、ドメイン、フラグメントなどと組み合わされ得る。

【0201】

薬剤複合体化

本発明は、治療剤または細胞毒素に複合体化した変種Fcヘテロ二量体またはそのフラグメントを含むヘテロ多量体の使用を更に包含する。

【0202】

抗体またはそのフラグメントは、細胞毒素、例えば細胞増殖抑制もしくは細胞破壊剤、治療剤、または放射性金属イオン、例えばアルファ-放射体のような治療部分と複合体化し得る。細胞毒素または細胞傷害剤には、細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。例には、リボヌクレアーゼ、モノメチルアウリスタチンEおよびF、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルビシン、およびシクロホスファミド、ならびにこれらの類縁体または相同体が含まれる。治療剤には、代謝拮抗物質（例えば、メトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BCNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチニン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン）が含まれるが、これらに限定されない。治療部分のより広範囲なリストは、PCT公開公報第03/075957号において見出され得る。

【0203】

抗体をポリペプチド部分に融合または複合体化する方法は、当該技術において知られている。例えば、米国特許第5,336,603号、同第5,622,929号、同第5,359,046号、同第5,349,053号、同第5,447,851号、および同第5,112,946号、ヨーロッパ特許第307,434号、ヨーロッパ特許第367,166号、PCT国際公開公報第96/04388号および同第91/06570号、Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535, Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590、およびVil et al., 1992, *PNAS USA* 89:11337を参照すること。部分への抗体の融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じ得る。

10

20

30

40

50

そのようなリンカー分子は、当該技術において一般に知られており、Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res 4: 2483, Petersen et al., 1999, Bioconjug Chem 10: 553, Zimmerman et al., 1999, Nucl Med Biol 26: 943, Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53: 171に記載されている。

【0204】

組み換え発現

ヘテロ多量体、その誘導体、類縁体、またはフラグメント（例えば、本発明の抗体または融合タンパク質）は、ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）をコードするポリヌクレオチドが得られると、ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）を産生するベクターは、当該技術において周知の技術を使用して組み換えDNA技術により産生され得る。したがって、ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）コードヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現するタンパク質を調製する方法が、本明細書に記載される。当該技術において周知の方法を使用して、ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）コード配列、ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組み換えDNA技術、合成技術、およびインビオ遺伝子組み換えが含まれる。したがって本発明は、プロモーターに機能的に結合している、本発明のヘテロ多量体をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能ベクターを提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、国際公開公報第86/05807号、国際公開公報第89/01036号、および米国特許第5,122,464号を参照すること、ならびに抗体の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み得る、あるいはFc変種を生成するポリペプチドは、完全長抗体鎖（例えば、重もしくは軽鎖）を発現するため、そのようなベクターに、または非抗体誘導ポリペプチドと、少なくとも1つの変種CH3ドメインを組み込むFc領域との融合体を含む完全Fc変種に、クローンされ得る。

【0205】

発現ベクターは、従来の技術により宿主細胞に移動され、次に形質移入細胞は、従来の技術により培養されて、本発明のFc変種を産生する。したがって、本発明は、異種プロモーターに機能的に結合している、本発明のヘテロ多量体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主を含む。二本鎖抗体を含むヘテロ多量体の発現におけるある特定の実施形態において、重と軽の両方の鎖をコードするベクターは、全免疫グロブリン分子の発現のために、宿主細胞において同時発現され得、下記に詳述される。

【0206】

多様な宿主発現ベクター系を利用して、本発明のヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質分子）を発現することができる（例えば、米国特許第5,807,715号を参照すること）。そのような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、続いて精製され得るビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換または形質移入されたとき、その場で本発明のヘテロ多量体を発現し得る細胞も表す。これらには、ヘテロ多量体をコードする配列を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌（例えば、大腸菌および枯草菌）のような微生物；Fc変種コード配列を含有する組み換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母（例えば、Saccharomyces Pichia（サッカロミセス・ピキア））；ヘテロ多量体コード配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）により感染された昆虫細胞系；Fc可変コード配列を含有する、組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）により感染された、もしくは組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）により形質転換された、植物細胞系；

10

20

30

40

50

または哺乳類細胞のゲノムから誘導されたプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、もしくは哺乳類ウイルスから誘導されたプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組み換え発現構築物を持つ哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NS0、および3T3細胞）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、大腸菌のような細菌細胞または真核生物細胞は、組み換え抗体または融合タンパク質分子であるヘテロ多量体の発現に使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳類細胞は、ヒトサイトメガロウイルスからの主要中間体初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと一緒にになって、抗体の有効な発現系である（Foecking et al., 1986, Gene 45: 101 および Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8: 2）。ある特定の実施形態において、本発明のFc変種（例えば、抗体または融合タンパク質）をコードするスクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターにより調節される。

【0207】

細菌系では、多数の発現ベクターが、発現されるヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）に意図される使用に応じて有利に選択され得る。例えば、大量のそのようなタンパク質がFc変種の薬学的組成物の生成のために產生される場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指示するベクターが、望ましいことがある。そのようなベクターには、lac-Z融合タンパク質が產生されるように、ヘテロ多量体コード配列がlac-Zコード領域のフレーム内のベクターと個別に連結され得る大腸菌発現ベクターpUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12: 1791)、pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509) などが含まれるが、これらに限定されない。pGEXベクターも、グルタチオン5-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために使用され得る。一般に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、吸着およびグルタチオンアガロースビーズのマトリックスへの結合により、続いて遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、トロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、これにより、クローンされた標的遺伝子産物がGST部分から放出され得る。

【0208】

挿入系では、オートグラファカリフォルニアニューカレア (Autographa californica nuclear) 多角体病ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現するために使用される。このウイルスは、スプドpteラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞において増殖する。ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）コード配列は、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個別にクローンされ、AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置かれる。

【0209】

哺乳類宿主細胞では、多数のウイルスに基づいた発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、目的のヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーター、および三者間リーダー配列に連結され得る。次にこのキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビオ組み換えによりアデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1またはE3）への挿入は、感染された宿主において、生存可能であり、かつヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）を発現することができる組み換えウイルスをもたらす（例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359を参照すること）

10

20

30

40

50

。特定の開始シグナルは、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のためにも必要であり得る。これらのシグナルには、A T G開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするため、所望のコード配列のリーディングフレームと位相があつていなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の、多様な由来のものであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー元素、転写ターミネーターなどを含めることにより増強され得る。(例えば、Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544を参照すること)。

【0210】

ヘテロ多量体(例えば、抗体または融合タンパク質)の発現は、当該技術において癌値の任意のプロモーターまたはエンハンサー元素により制御され得る。ヘテロ多量体(例えば、抗体または融合タンパク質)をコードする遺伝子の発現を制御するために使用され得る、プロモーターには、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3長末端反復に含有されるプロモーター(Yamamoto, et al., 1980, Cell 122: 787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brminster et al., 1982, Nature 296: 39-42)、テトラサイクリン(Tet)プロモーター(Gossen et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551)；-ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731)またはtacプロモーター(DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25; "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242: 74-94を参照すること)のような原核生物発現ベクター；ノパリンシンセターゼプロモーター領域(Herrera-Estrella et al., Nature 303: 209-213)またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardner et al., 1981, Nucleic Acids Res. 9: 2871)および光合成酵素リブロースニリン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310: 115-120)を含む植物発現ベクター；Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターのような酵母または他の真菌からのプロモーター元素、ならびに、組織特異性を示し、かつ遺伝子導入動物に利用されている以下の動物転写制御領域：臍腺房細胞において活性なエラスターーゼI遺伝子制御領域(Swift et al., 1984, Cell 38: 639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515)、臍ベータ細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域(Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122)、リンパ球細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444)、精巣細胞、乳腺細胞、リンパ球細胞、およびマスト細胞において活性なマウス乳癌ウイルス制御領域(Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495)、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域(Pinkert et al., 1987, Genes and Development 1: 268-276)、肝臓において活性なアルファ-フェ

10
20
30
40
50

トプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58; 肝臓において活性なアルファ1-アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Development 1: 161-171)、骨髄細胞において活性なベータ-グロビン遺伝子制御領域 (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollia et al., 1986, Cell 46: 89-94; 脳の希突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質制御領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712)、骨格筋において活性なミエリン軽鎖2遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283-286) 10)、神経細胞において活性な神経特異的エノラーゼ (NSE) (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80: 571-83)、神経細胞において活性な脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子制御領域 (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 253: 818-823)、星状膠細胞において活性なグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター (Gomes et al., 1999, Braz. J. Med. Biol. Res. 32(5): 619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80: 571-83)、および視床下部において活性な性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378) 20)からのプロモーターエレメントが含まれるが、これらに限定されない。

【0211】

本発明のヘテロ多量体 (例えば、抗体または融合タンパク質) をコードする遺伝子の挿入物を含有する発現ベクターは、3つの一般的な手法の (a) 核酸ハイブリッド形成、(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在または不在、および (c) 挿入配列の発現により同定され得る。第1の手法では、発現ベクター中のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または融合タンパク質をコードする遺伝子の存在は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または融合タンパク質をそれぞれコードする挿入遺伝子と相同的である配列を含むプローブの使用による核酸ハイブリッド形成により検出され得る。第2の手法では、組み換えベクター/宿主系は、ベクター中の抗体または融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の挿入により引き起こされる特定の「マーカー」遺伝子機能 (例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する抵抗、形質転換表現型、バキュロウイルスにおける包埋体の形成など) の存在または不在に基づいて同定および選択され得る。例えば、ヘテロ多量体 (例えば、抗体または融合タンパク質) をコードするヌクレオチド配列が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、抗体または融合タンパク質挿入物をコードする遺伝子を含有する組み換え体は、マーカー遺伝子機能の不在により同定され得る。第3の手法では、組み換え発現ベクターは、組み換え体により発現されている遺伝子産物 (例えば、抗体または融合タンパク質) をアッセイすることにより同定され得る。そのようなアッセイは、例えば、インピトロアッセイ系における融合タンパク質の物理的または機能的特性、例えば抗生理活性分子抗体との結合に基づくことができる。

【0212】

加えて、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節する、または望ましい特定の様式で遺伝子産物を修飾およびプロセスするように選択され得る。特定のプロモーターによる発現は、特定のインデューサーの存在により高められ得、このように遺伝子操作融合タンパク質の発現が制御され得る。更に、異なる宿主細胞は、翻訳および後翻訳、ならびに修飾 (例えば、タンパク質のグリコシル化、リン酸化) についての特徴および特定の機構を有する。適切な細胞系統または宿主系は、発現された外来性タンパク質の所望の修飾およびプロセシングを確実にするために選択され得る。例えば、細菌系における発現は、非グリコシル化産物を產生し、酵母における発現は、グリコシル化産物を產生する。遺伝子産物の一次転写物の正確なプロセシング (例えば、グリコシル化およびリン酸化) の細胞機構を有する真核宿主細胞が、使用され得る。そのような哺乳類宿主細胞には、CHO、VERY 50

、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、NS0、特に、例えばSK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZヒト神経芽細胞腫のような神経細胞(Sugimoto et al., 1984, *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 51-57)、SK-N-SHヒト神経芽細胞腫(Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460)、Daoyヒト小脳髄芽細胞腫(He et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 1144-1148)DBTRG-05MG神経膠芽腫細胞(Kruse et al., 1992, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 609-614)、IMR-32ヒト神経芽細胞腫(*Cancer Res.*, 1970, 30: 2110-2118)、1321N1ヒト星状膠芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 4816)、MOG-G-CCMヒト星状細胞腫(*Br. J. Cancer*, 1984, 49: 269)、U87MGヒト神経膠芽腫-星状細胞腫(*Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1968, 74: 465-486)、A172ヒト神経膠芽腫(Olopade et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 2523-2529)、C6ラットグリオーマ細胞(Benda et al., 1968, *Science* 161: 370-371)、Neuro-2aマウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 65: 129-136)、NB41A3マウス神経芽細胞腫(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, 48: 1184-1190)、SCPヒツジ脈絡叢(Bolin et al., 1994, *J. Virol. Methods* 48: 211-221)、G355-5、PG-4ネコ正常星状膠細胞(Haapala et al., 1985, *J. Virol.* 53: 827-833)、Mpfフェレット脳(Trowbridge et al., 1982, *In Vitro* 18: 952-960)、ならびに、例えばCRL7030およびHs578Bstのような、例えばCTX-TNA2ラット正常脳皮質(Radany et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6467-6471)のような正常な細胞系統が含まれるが、これらに限定されない。更に、異なるベクター/発現系は、異なる程度でプロセシング反応を実施し得る。

【0213】

組み換えタンパク質の長期で高収量の產生のためには、安定した発現が多くの場合に好ましい。例えば、本発明のヘテロ多量体(例えば、抗体または融合タンパク質)を安定して発現する細胞系統は、操作され得る。ウイルス由来の複製を含有する発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択可能なマーカーにより制御されたDNAにより形質転換することができる。外来性DNAの導入の後、操作細胞は、濃縮培地において1~2日間増殖することが可能であり得、次に選択培地に交換される。組み換えプラスミドにおける選択可能なマーカーは、選択に対して抵抗性を付与し、細胞がプラスミドを染色体に安定して組み込み、増殖して、次には細胞系統にクローンおよび展開され得る増殖巣を形成することを可能にする。この方法は、抗原に特異的に結合するヘテロ多量体を発現する細胞系統を操作するために有利に使用され得る。そのような操作細胞系統は、抗原に特異的に結合するヘテロ多量体(例えば、ポリペプチドまたは融合タンパク質)の活性に影響を与える化合物をスクリーンおよび評価することに特に有用であり得る。

【0214】

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, *Cell* 11: 223)、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026)が含まれるが、これらに限定されない多数の選択系を使用することができ、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., 1980, *Cell* 22: 817)遺伝子をtk-、hprt-、また

10

20

30

40

50

は a p r t - 細胞にそれぞれ用いることができる。また、代謝拮抗物質抵抗性は、メトトレキセートに対して抵抗性を付与する d h f r (Wigler et al . , 1980 , Natl . Acad . Sci . USA 77 : 3567 ; O Hare et al . , 1981 , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 78 : 1527) 、 ミコフェノール酸に対して抵抗性を付与する g p t (Mulligan & Berg , 1981 , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 78 : 2072) 、 アミノグリコシド G - 418 に対して抵抗性を付与する n e o (Colberre - Garapin et al . , 1981 , J . Mol . Biol . 150 : 1) 、 およびハイグロマイシンに対して抵抗性を付与する h y g r o (Santerre et al . , 1984 , Gene 30 : 147) 遺伝子を選択の基礎として使用することができる。 10

【 0215 】

精製

本発明のヘテロ多量体 (例えば、抗体または融合タンパク質) が組み換え発現により產生されると、タンパク質の精製について任意の既知の方法により、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、特にプロテイン A の後の特定の抗原への親和性によるアフィニティー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー) 、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質の精製における任意の他の標準的な技術により精製され得る。

【 0216 】

ヘテロ多量体は、分泌ポリペプチドとして培養培地から一般に回収されるが、分泌シグナルなしで直接產生されたときは、宿主細胞溶解産物から回収され得る。ヘテロ多量体が膜結合している場合、これを適切な洗剤溶液 (例えば、トリトン X 100) の使用により膜から遊離させることができる。 20

【 0217 】

ヘテロ多量体が、ヒト由来以外の組み換え細胞から產生される場合、ヒト由来のタンパク質またはポリペプチドを完全に含有していない。しかし、組み換え細胞タンパク質またはポリペプチドからヘテロ多量体を精製して、ヘテロ多量体として実質的に均質である調製物を得ることが必要である。第 1 のステップとして、培養培地または溶解産物は、粒状細胞片を除去するため、通常、遠心分離される。

【 0218 】

抗体定常ドメインを有するヘテロ多量体は、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーにより都合良く精製され得、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相 H P L C 、シリカのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂 (例えば、ポリアスパラギン酸カラム) 、クロマトフォーカシング、 S D S - P A G E 、および硫酸アンモニウム沈殿のようなタンパク質精製の他の技術も、回収されるポリペプチドに応じて利用可能である。アフィニティーリガンドとしてのプロテイン A の安定性は、使用される免疫グロブリン F c ドメインの種およびアイソタイプによって左右される。プロテイン A は、ヒト 1 、 2 、または 4 重鎖に基づいている免疫グロブリン F c 領域を精製するために使用され得る (Lindmark et al . , J . Immunol . Meth . 62 : 1 - 13 (1983)) 。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプおよびヒト 3 に推奨されている (Guss et al . , EMBO J . 5 : 15671575 (1986)) 。アフィニティーリガンドが結合しているマトリックスは、ほとんどの場合にアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。制御孔ガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンのような機械的に安定したマトリックスは、アガロースにより達成され得るより速い流速および短いプロセシング時間を可能にする。イムノアドヘシソングをプロテイン A または G アフィニティーカラムに結合する条件は、 F c ドメインの特徴、すなわち、その種およびアイソタイプによって全面的に決まる。一般に、正確なリガンドが選択される場合、効率的な結合が無条件培養液から直接生じる。結合した変種 F c ヘテロ二量体は、酸性 p H (3 . 0 以上) または弱力オトロピック塩を含有する中性 p H の 40

緩衝液のいずれかにより効率的に溶出され得る。アフィニティーコロマトグラフィーステップは、純度が > 95 % の変種 Fc へテロ二量体調製物をもたらし得る。

【0219】

ヘテロ多量体（例えば、抗体または融合タンパク質）の発現レベルは、ベクター増幅により増加され得る（概説には、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987) を参照すること）。例えば、抗体または融合タンパク質を発現するベクター系におけるマーカーが増幅されるとき、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加する。増幅領域が抗体遺伝子と会合するので、抗体または融合タンパク質の酸性も増加する（Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257）。

【0220】

特徴決定および機能アッセイ

本発明の Fc 変種（例えば、抗体または融合タンパク質）は、多様な方法で特徴決定され得る。1つの実施形態において、変種 Fc へテロ二量体の純度は、SDS-PAGE ゲル、ウエスタンプロット、密度測定、または質量分析が含まれるが、これらに限定されない当該技術に周知の技術を使用して評価される。タンパク質安定性は、サイズ排除クロマトグラフィー、紫外可視およびCDスペクトル測定、質量分析、示差光散乱、ベンチトップ安定性アッセイ、他の特徴決定技術と結合した凍結融解、示差走査熱量測定、示差走査蛍光定量、疎水性相互作用クロマトグラフィー、等電点電気泳動、受容体結合アッセイ、またはタンパク質相対発現レベルであるが、これらの限定されない一連の技術を使用して特徴決定され得る。例示的な実施形態において、変種 Fc へテロ二量体の安定性は、示差走査熱量測定または示差走査蛍光定量のような当該技術に周知の技術を使用して野生型 CH3 ドメインと比較した、変種 CH3 ドメインの融解温度により評価される。

【0221】

本発明の Fc 変種は、リガンド（例えば、Fc RIIIA、Fc RIIIB、C1q）に特異的に結合する能力についてもアッセイされ得る。そのようなアッセイは、溶液（例えば、Houghten, Bio/Techniques, 13: 412-421, 1992）、ビーズ（Lam, Nature, 354: 82-84, 1991、チップ（Fodor, Nature, 364: 555-556, 1993）、細菌（米国特許第 5,223,409 号）、プラスミド（Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865-1869, 1992）、またはファージ（Scott and Smith, Science, 249: 386-390, 1990; Devlin, Science, 249: 404-406, 1990; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378-6382, 1990、および Felici, J. Mol. Biol., 222: 301-310, 1991）において実施され得る。リガンド（例えば、Fc RIIIA、Fc RIIIB、C1q、または抗原）に特異的に結合することが同定されている分子は、次にリガンドへの親和性についてアッセイされ得る。

【0222】

本発明の Fc 変種は、当該技術に既知の任意の方法により、抗原（例えば、癌抗原および他の抗原との交差反応性）、またはリガンド（例えば Fc R）のような分子への特異的結合についてアッセイされ得る。特異的結合および公差反応性を分析するために使用され得るイムノアッセイには、幾つか挙げると、ウエスタンプロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル核酸沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテイン A イ

10

20

30

40

50

ムノアッセイのような技術を使用する競合および非競合アッセイ系が含まれるが、これらに限定されない。そのようなアッセイは、日常的であり、当該技術において良く知られている（例えば、Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc. New Yorkを参照すること）。

【0223】

抗原またはリガンド（例えば、Fc R）のような分子への本発明のFc変種の結合親和性、および相互作用のオフレートは、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一例は、Fc Rのような標識リガンド（例えば、3Hまたは125Iを、Fc Rのような非標識リガンドの増加量の存在下で目的の分子（例えば、本発明のFc変種）と共にインキュベートすること、および標識リガンドに結合した分子を検出することを含む。リガンドへの本発明の分子の親和性、および結合オフレートは、スキャッチャード分析により飽和データから決定され得る。

【0224】

親和性成熟

当該技術において知られているように、單一ドメイン抗原結合構築物が同定され、標的抗原への親和性が測定されると、必要であれば、その標的抗原への單一ドメイン抗原結合構築物の親和性は、当該技術に既知の方法による親和性成熟により改善され得る。抗体の標的抗原の結晶構造が利用可能な抗原結合ドメインの親和性成熟における1つの例示的な方法が、以下に記載される。抗原抗体複合体の構造がモデル形成のために使用される。分子動力学（MD）を用いて、水性環境におけるWT複合体の無傷の動力学的性質を評価することができる。平均場およびデッドエンド排除方法を柔軟性主鎖と共に使用して、スクリーンされる突然変異体のモデル構造を最適化および調製することができる。詰め込みの後、接触密度、衝突スコア、疎水性、および静電気を含む多数の特徴がスコア付けされる。一般化されたBorn法は、溶媒条件の作用を正確にモデル形成すること、およびタンパク質における特定の位置の突然変異後の、代替残基型との自由エネルギーの差を計算することを可能にする。接触密度および衝突スコアは、有効なタンパク質詰め込みの重要な態様である相補性の測度を提供する。スクリーニング手順は、知識ベースポテンシャル、ならびに対毎の残基相互作用エネルギーおよびエントロピー計算に依存するカップリング分析スキームを用いる。

【0225】

Fc変種の動態パラメーターも、当該技術に既知の任意の表面プラズモン共鳴（SPR）に基づいたアッセイ（例えば、BIAcore動態分析）の使用により決定され得る。SPRに基づいた技術の概説には、Mullet et al., 2000, Methods 22:77-91; Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82:303-23; Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11:54-61を参照すること。加えて、米国特許第6,373,577号、同第6,289,286号、同第5,322,798号、同第5,341,215号、同第6,268,125号に記載されているタンパク質間相互作用を測定する任意のSPR器機およびSPRに基づいた方法が、本発明の方法に考慮される。

【0226】

当業者に既知の任意の技術を使用する蛍光標識細胞選別（FACS）は、細胞表面に発現した分子へのFc変種（例えば、Fc RIIIA、Fc RIIIB）の結合の特徴決定に使用され得る。流動選別機は、ライブラリー挿入物を含有する大量の個別の細胞を素早く検査することができる（例えば、1時間あたり10~1億個の細胞）（Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995）。生体細胞を選別および検査するフローサイトメーターは、当該技術において良く知られている。既知のフローサイトメーターは、例えば、米国特許4,347,935号、同第5

10

20

30

40

50

, 464, 581号、同第5, 483, 469号、同第5, 602, 039号、同第5, 643, 796号、および同第6, 211, 477号に記載されている。他の既知のフローサイトメーターは、Becton Dickinson and Companyにより製造されたFACS Vantage(商標)システム、およびUnion Biometricaにより製造されたCOPAS(商標)システムである。

【0227】

本発明のFc変種は、FcR仲介エフェクター細胞機能を仲介する能力によって特徴決定され得る。アッセイされ得るエフェクター細胞機能の例には、抗体依存性細胞仲介細胞傷害性(ADCC)、食菌作用、オプソニン化、オプソニン化貪食作用、C1q結合、および補体依存性細胞障害性(CDC)が含まれるが、これらに限定されない。エフェクター細胞機能を決定する当業者に既知の任意の細胞に基づいた、または細胞無含有アッセイを使用することができる(エフェクター細胞アッセイには、Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini et al., 1998 Experientia, 44(10): 841-8; Lehmann et al., 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown E J. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn et al., 1990 J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid et al., 2002 Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding et al., 1998, Immunity 8: 403-411を参照すること)。

【0228】

特に、本発明のFc変種は、当業者に既知の任意の標準的な方法の使用により、エフェクター細胞(例えば、ナチュラルキラー細胞)におけるFcR仲介ADCC活性についてアッセイされ得る(例えば、Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92を参照すること)。本発明の分子のADCC活性を決定する例示的なアッセイは、標的細胞を[51Cr]Na₂CrO₄(この細胞膜浸透性分子は、細胞質タンパク質に結合するので標識に一般的に使用されており、遅い動態で細胞から自然放出されるが、標的細胞の壊死の後では大量に放出される)により標識すること、標的細胞を本発明のFc変種でオプソニン化すること、オプソニン化された放射標識標的細胞をマイクロタイターブレートにおいて標的細胞とエフェクター細胞の適切な比によりエフェクターと組み合わせること、細胞の混合物を37度16~18時間インキュベートすること、上澄みを収集すること、および放射能を分析することから構成される、51Cr放出アッセイに基づいている。次に、本発明の分子細胞傷害性は、例えば以下の式: 溶解% = (実験cpm - 標的漏出cpm) / (洗剤溶解cpm - 標的漏出cpm) × 100%を使用して決定され得る。あるいは、溶解% = (ADCC - AIC) / (最大放出 - 自然放出)である。特異的溶解は、式: 特異的溶解 = 本発明の分子による溶解% - 本発明の分子の不在下での溶解%を使用して計算され得る。グラフは、標的エフェクター細胞比または抗体濃度を変えることにより生成され得る。

【0229】

C1qに結合し、補体依存性細胞障害性(CDC)を仲介するFc変種の能力を特徴決定する方法は、当該技術において良く知られている。例えば、C1q結合を決定するためには、C1q結合ELISAを実施することができる。例示的なアッセイには、以下が含まれ得る。アッセイプレートを、ポリペプチド変種または被覆緩衝液中の出発ポリペプチド(対照)により4Cで一晩被覆することができる。次にプレートを洗浄し、ブロックすることができる。洗浄した後、ヒトC1qのアリコートを各ウエルに加え、室温で2時間インキュベートすることができる。更に洗浄した後、100uLのヒツジ抗補体C1qペルオキシダーゼ結合抗体を各ウエルに加え、室温で1時間インキュベートすることができる。再びプレートを緩衝液で洗浄することができ、100uLのOPD(O-フェニレンジアミンジヒドロクロリド(Sigma))含有基質緩衝液を各ウエルに加えることができる。黄色の出現により観察される酸化反応を、30分間進行させ、100uLの4.5N

10

20

30

40

50

H₂SO₄の添加により停止させることができる。次に吸光度を(492~405)nmで読み取ることができる。

【0230】

補体活性化を評価するために、補体依存性細胞障害性(CDC)アッセイを実施することができる(例えば、Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods 202: 163に記載されている)。簡潔には、多様な濃度のFc変種およびヒト補体を緩衝剤により希釈することができる。Fc変種が結合する抗体を発現する細胞を、約1×10⁶細胞/m¹の濃度に希釈することができる。Fc変種、希釈ヒト補体、および抗体を発現している細胞の混合物を、平底組織培養96ウエルプレートに加え、37°Cおよび5%CO₂で2時間インキュベートして、補体仲介細胞溶解を促進することができる。次に50uLのアラマーブルー(Accumulated International)を各ウエルに加え、37°Cで一晩インキュベートすることができる。吸光度は、530nmの励起および590nmの発光により96ウエル蛍光光度計を使用して測定される。結果を相対蛍光単位(RFU)により表すことができる。試料濃度を標準曲線から計算することができ、匹敵する分子(すなわち、非修飾または野生型CH3ドメインを有するFc領域を含む分子)と比べた活性率が、目的のFc変種について報告される。

【0231】

補体アッセイは、モルモット、ウサギ、またはヒト血清により実施され得る。標的細胞の補体溶解は、Korzeniewski et al., 1983, Immunol. Methods 64(3): 313-20、およびDecker et al., 1988, J. Immunol. Methods 115(1): 61-9に記載されているように、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)のような細胞内酵素の放出、または標的細胞が標識されるユーロピウム、クロム51、もしくはインジウム111のような細胞内標識の放出をモニターすることによって検出され得る。

【0232】

薬物動態安定性

ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるヘテロ多量体は、市販の治療抗体に匹敵する薬物動態(PK)またはインビボ安定性を示す。1つの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、血清濃度、t_{1/2}、ベータ半減期、および/またはCLに関して既知の治療抗体と類似したPK特性を示す。

【0233】

幾つかの実施形態において、新生児Fc受容体(FcRn)による取り込みのような能動輸送過程も、結合タンパク質の間の抗体の体内分布に対して影響を与える。1つの実施形態において、ヘテロ多量体は、市販の治療抗体と比較して類似した親和性でFcRnに結合する。

【0234】

ヒト化単一ドメイン抗原結合構築物

幾つかの実施形態において、例えば、単一ドメイン抗体結合構築物がラクダ科動物またはサメから得られる場合、本明細書に記載されているヘテロ多量体に使用される前に、単一ドメイン抗原結合構築物をヒト化する必要があり得る。非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大部分の場合において、ヒト化抗体は、受給体の超可変領域における残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類のような非ヒト種(供与体の抗体)の超可変領域の残基に代えられているヒト免疫グロブリン(受給体の抗体)である。幾つかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)の残基は、対応する非ヒト残基に代えられている。更に、ヒト化抗体は、受給体の抗体または供与体の抗体において見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に洗練するために実行される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全て含み、全てまた実質的に全ての超可変ループが非ヒト

免疫グロブリンに対応し、全てまたは実質的に全ての F R がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、場合により、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域 (F c) の少なくとも一部分も含む。更なる詳細は、 Jones et al . , Nature 321 : 522 - 525 (1986) ; Riechmann et al . , Nature 332 : 323 - 329 (1988) 、および Presta , Curr . Op . Struct . Biol . 2 : 593 - 596 (1992) を参照すること。

【 0235 】

治療方法

本発明は、本発明の 1 つ以上のヘテロ多量体（例えば、抗体）を、疾患、障害、または感染に関連する 1 つ以上の症状を予防、治療、または改善するため、動物、特に哺乳動物、とりわけヒトに投与することを包含する。 10

【 0236 】

1 つの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、 F c エフェクター機能活性を介して治療効果を発揮する。 1 つの実施形態において、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、細胞傷害性薬剤分子に複合体化し、標的細胞へのヘテロ多量体および細胞傷害性薬剤分子の内部移行を介して治療効果を発揮する。

【 0237 】

1 つの実施形態において、ヘテロ多量体は、細菌または真菌のような病原性生物の感染を治療するために使用される。 20

【 0238 】

本発明のヘテロ多量体は、エフェクター細胞機能（例えば、 ADC C 、 CDC ）の効力の変更が望ましい場合、疾患または障害の治療または予防に特に有用である。ヘテロ多量体およびその組成物は、原発性または転移性の新生物性疾患（すなわち、癌）および感染性疾患の治療または予防に特に有用である。本発明の分子は、当該技術に既知である、または本明細書に記載されている薬学的に許容される組成物により提供される。下記に詳述されるように、本発明の分子は、癌（特に、受動的免疫療法において）、自己免疫性疾患、炎症性障害、または感染性疾患の治療または予防の方法に使用され得る。

【 0239 】

本発明のヘテロ多量体は、また、癌、自己免疫性疾患、炎症性障害、または感染性疾患の治療または予防のため、当該技術に既知の他の治療剤との組み合わせにより有利に利用され得る。ある特定の実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、例えば、分子と相互作用するエフェクター細胞の数を増加するため、および免疫反応を増大するために役立つモノクローナルもしくはキメラ抗体、リンホカイン、または造血成長因子（例えば、 IL - 2 、 IL - 3 、および IL - 7 ）と組み合わせて使用され得る。本発明のヘテロ多量体は、また、例えば抗癌剤、抗炎症剤、または抗ウイルス剤のような疾患、障害、または感染の治療に使用される 1 つ以上の薬剤と組み合わせて有利に利用され得る。 30

【 0240 】

したがって、本発明は、本発明の 1 つ以上のヘテロ多量体を投与することによって、癌および関連状態に関する 1 つ以上の症状を予防、治療、または改善する方法を提供する。任意の作用機構に束縛されることを意図しないが、匹敵する分子より大きな親和性で F c 40

R III IA および / もしくは F c R III A に結合し、匹敵する分子より小さな親和性で F c R III B に更に結合する、本発明のヘテロ多量体、ならびに / または当該ヘテロ多量体は、増強されたエフェクター機能、例えば、 ADC C 、 CDC 、食菌作用、オプソニン化などを有し、癌細胞の選択的標的化および効率的な破壊をもたらす。

【 0241 】

本発明は、本発明の 1 つ以上のヘテロ多量体を、現行の標準的および実験的な化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法、または外科的手術が含まれるが、これらに限定されない癌の治療または予防のため、当業者に既知の他の療法と組み合わせて投与することを更に含む。幾つかの実施形態において、本発明の分子は、癌の治療お 50

および／または予防のため、治療または予防有効量の当業者に既知の1つ以上の抗癌剤、治療抗体、または他の薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明のヘテロ多量体と組み合わせて使用され得る投与レジメンおよび療法の例は、当該技術において良く知られており、他において詳細に記載されている（例えば、PCT公開公報第02/070007号および同第03/075957号を参照すること）。

【0242】

本発明の方法および組成物により治療または予防され得る癌および関連障害には、以下が含まれるが、これらに限定されない。白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、骨および結合組織肉腫、脳腫瘍、乳癌、副腎癌、甲状腺癌、肺癌、下垂体癌、眼癌、膣癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、食道癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、肺癌、精巣癌、前立腺癌、陰茎癌、口腔癌、唾液腺癌咽頭癌、皮膚癌、腎癌、膀胱癌（そのような疾患の概説には、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照すること）。

【0243】

1つの実施形態において、ヘテロ多量体が、EGFR1、EGFR1、または突然変異体EGFR変種III（EGFRvIII）発現細胞に結合する単一ドメイン抗原結合構築物を含む場合、ヘテロ多量体は、EGFR1を過剰発現する癌、またはEGFRvIIIへの結合による治療の抵抗性がある癌細胞の治療に使用され得る。

【0244】

本発明は、抗体が本発明の変種CH3ドメインを組み込むFc領域を含むように、癌および関連障害の治療および／または予防のため、当該技術に既知の任意の抗体を操作することを更に考慮する。

【0245】

ある特定の実施形態において、変種Fcヘテロ二量体を含む本発明の分子（例えば、抗体は、本発明の当該分子の存在下で原発性腫瘍の増殖または転移と比べて、原発性腫瘍の増殖または癌性細胞の転移を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%阻害または低減する。

【0246】

本発明は、対象において炎症性障害に関連する1つ以上の症状を予防、治療、または管理するための、本発明の1つ以上のヘテロ多量体の使用を包含する。任意の作用機構に束縛されることを意図しないが、Fc RIIIBへの増強された親和性を有するヘテロ多量体は、活性化受容体の減衰、したがって免疫応答の減衰をもたらし、自己免疫性障害を治療および／または予防するのに治療効力を有する。更に、炎症性障害に関連する、変種Fcヘテロ二量体を含む二重特異性抗体のような1つを超える標的に結合する抗体は、一価の治療よりも相乗的な効果をもたらし得る。

【0247】

本発明は、本発明のヘテロ多量体を、治療または予防有効量の1つ以上の抗炎症剤と組み合わせて投与することを更に包含する。本発明は、自己免疫性疾患に関連する1つ以上の症状を予防、治療、または関する方法であって、当該対象に、本発明のヘテロ多量体を治療または予防有効量の1つ以上の免疫調節剤と組み合わせて投与することを更に含む方法も、提供する。本発明のヘテロ多量体を投与することにより治療され得る自己免疫性障害の例には、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病

10

20

30

40

50

、副腎の自己免疫性疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（C F I D S）、慢性炎症性脱髓性多発ニューロパチー、チャーグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、C R E S T 症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症・線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A ニューロパチー、若年性関節、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織疾患、多発性硬化症、1型または免疫介在性真性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎血管炎のような血管炎、白斑、およびウェゲナー肉芽腫症が含まれるが、これらに限定されない。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、ならびに慢性ウイルスおよび細菌感染によりもたらされる慢性炎症が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの自己免疫性障害は炎症状態と関連し、したがって、自己免疫性障害と炎症性障害と考慮されるものには重複がある。したがって、幾つかの自己免疫性障害は、炎症性障害としても特徴決定され得る。本発明の方法により予防、治療、または管理されうる炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、ならびに慢性ウイルスおよび細菌感染によりもたらされる慢性炎症が含まれるが、これらに限定されない。
10
20

【0248】

本発明のヘテロ多量体は、炎症性障害を有する動物、特にヒトにより経験される炎症を低減するためにも使用され得る。ある特定の実施形態において、本発明のF c は、当該分子が投与されない動物における炎症と比べて、動物における炎症を少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、少なくとも10%低減する。
30

【0249】

本発明は、抗体が本発明のF c 領域を含むように、自己免疫性疾患または炎症性疾患の治療および／または予防のため、当該技術に既知の任意の抗体を操作することを更に考慮する。

【0250】

本発明は、対象において感染性疾患を治療または予防する方法であって、本発明の治療または予防有効量の1つ以上のヘテロ多量体を投与することを含む方法も包含する。本発明の多量体により治療または予防され得る感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、およびウイルスが含まれるが、これらに限定されない感染性病原体により引き起こされる。
40

【0251】

本発明のヘテロ多量体を本発明の方法と一緒に使用して治療または予防され得るウイルス疾患には、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純ヘルペスI型（H S V - I）、単純ヘルペスII型（H S V - I I）、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス、パポーバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ボ
50

リオウイルス、天然痘、エプスタイン・バーウイルス、ヒト免疫不全ウイルスⅠ型（HIV-Ⅰ）、ヒト免疫不全ウイルスⅡ型（HIV-Ⅱ）、およびウイルス性髄膜、脳炎、デング熱、または天然痘のようなウイルス疾患の病原体より引き起こされるものが含まれるが、これらに限定されない。

【0252】

本発明のヘテロ多量体を本発明の方法と一緒に使用して治療または予防され得る、細菌により引き起こされる細菌性疾患には、マイコバクテリア・リケッチャ、マイコプラズマ、ナイセリア、S.ニューモニア、ボレリア・ブルグドルフェリ（ライム病）、バチルス・アントラシス（炭疽菌）、破傷風、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、マイコバクテリア、破傷風、百日咳、コレラ、ペスト、ジフテリア、クラミジア、S.アウレウス、およびレジオネラが含まれるが、これらに限定されない。本発明のヘテロ多量体を本発明の方法と一緒に使用して治療または予防され得る、原虫により引き起こされる原虫病には、リーシュマニア、コクジジオア（kokzidioa）、トリパノソーマ、またはマラリアが含まれるが、これらに限定されない。本発明のヘテロ多量体を本発明の方法と一緒に使用して治療または予防され得る、寄生虫により引き起こされる寄生虫病には、クラミジアおよびリケッチャが含まれるが、これらに限定されない。

【0253】

幾つかの実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、感染性疾患治療および／または予防のため、治療または予防有効量の当業者に既知の1つ以上の追加の治療剤と組み合わせて投与され得る。本発明は、感染性疾患の治療およびまたは予防のため、抗生物質、抗真菌剤、および抗ウイルス剤が含まれるが、これらに限定されない当該技術に既知の他の分子と組み合わせた本発明の分子の使用を考慮する。

【0254】

本発明は、本発明のヘテロ多量体（例えば、抗体、ポリペプチド）を含む方法および薬学的組成物を提供する。本発明は、本発明の有効量の1つ以上のヘテロ多量体、または本発明の1つ以上のヘテロ多量体を含む薬学的組成物を対象に投与することによる、疾患、状態、または感染に関連する1つ以上の症状を治療、予防、および改善する方法も提供する。1つの態様において、ヘテロ多量体は実質的に精製されている（すなわち、その効果を制限する、または望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まず、これにはホモ二量体および他の細胞材料が含まれる）。ある特定の実施形態において、対象は、非靈長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）、ならびに靈長類（例えば、カニクイザルおよびヒト）を含む哺乳動物のような動物である。ある特定の実施形態において、対象はヒトである。なお別のある特定の実施形態において、本発明の抗体は、対象として同じ種からのものである。

【0255】

組成物の投与経路は、治療される状態に応じて決まる。例えば、静脈内注射は、リンパ性癌または転移した腫瘍のような全身性障害の治療に好ましいことがある。投与される組成物の投与量は、過剰な実験を用いることなく、標準的な用量応答研究と併せて当業者により決定され得る。これらの決定を行うために考慮される関連する環境には、治療される状態、投与される組成物の選択肢、個別の患者の年齢、体重、および応答、ならびに患者の症状の重篤度が含まれる。状態に応じて、組成物は、患者に経口、非経口、鼻腔内、膣内、直腸内、舌側、舌下、頬側、頬内、および／または経皮投与され得る。

【0256】

したがって、経口、舌側、舌下、頬側、および頬内投与のために設計された組成物は、過剰な実験を行うことなく、当該技術に周知の方法により、例えば不活性希釈剤または食用担体と共に作製され得る。組成物は、ゼラチンカプセルに封入され得る、または錠剤に圧縮され得る。経口治療投与の目的において、本発明の薬学的組成物には賦形剤が組み込まれ得、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハ剤、チューンガム剤などの剤形で使用され得る。

【0257】

10

20

30

40

50

錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、結合剤、受給体、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、および／または風味剤も含有し得る。結合剤の幾つかの例には、微晶質セルロース、トラガカントガム、およびゼラチンが含まれる。賦形剤の例には、デンプンおよびラクトースが含まれる。崩壊剤の幾つかの例には、アルギン酸、トウモロコシデンプンなどが含まれる。潤滑剤の例には、ステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸カリウムが含まれる。滑剤の例は、コロイド二酸化ケイ素である。甘味剤の幾つかの例には、スクロース、サッカリンなどが含まれる。風味剤の例には、ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ風味などが含まれる。これらの多様な組成物の調製に使用される材料は、薬学的に純粋であり、使用される量で非毒性であるべきである。

【0258】

10

本発明の薬学的組成物は、例えば静脈内、筋肉内、鞘内、および／または皮下注射のように非経口投与され得る。非経口投与は、本発明の組成物を液剤または懸濁剤に組み込むことにより達成され得る。そのような液剤または懸濁剤は、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、および／または他の合成溶剤のような滅菌希釈剤も含み得る。非経口製剤は、例えばベンジルアルコールおよび／またはメチルパラベンのような抗菌剤、例えばアスコルビン酸および／または重亜硫酸ナトリウムのような酸化防止剤、ならびにEDTAのようなキレート剤も含み得る。酢酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩のような緩衝液、ならびに塩化ナトリウムおよびデキストロースのような等張性調整用の薬剤も、加えることができる。非経口調合剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、および／または多回用量バイアルに封入され得る。直腸内投与は、組成物を直腸および／または大腸に投与することを含む。このことは、坐剤および／または浣腸の使用により達成され得る。坐剤製剤は、当該技術に既知の方法により作製され得る。経皮投与には、皮膚を介した組成物の経皮吸収が含まれる。経皮製剤には、パッチ剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、膏薬が含まれる。本発明の組成物は、患者に経鼻投与され得る。本明細書で使用されるとき、経鼻的投与または経鼻投与は、組成物を患者の鼻道および／または鼻腔の粘膜に投与することを含む。

【0259】

20

本発明の薬学的組成物は、疾患、障害、または感染に関連する1つ以上の症状を予防、治療、または改善するため、本発明の方法に従って使用され得る。本発明の組成物は、滅菌であり、対象への投与に適した剤形であることが考慮される。

【0260】

30

1つの実施形態において、本発明の組成物は、内毒素および／または関連する発熱性物質を実質的に含まない発熱物質無含有製剤である。内毒素には、微生物内に留まり、微生物が分解または死亡したときに放出される毒素が含まれる。発熱性物質には、細菌および他の微生物の外膜からの発熱誘発性で熱安定性の物質（糖タンパク質）も含まれる。これらの物質は、両方とも、ヒトに投与されると発熱、低血圧、およびショックを引き起こし得る。潜在的な有害作用に起因して、低量であっても、内毒素を静脈内投与用薬学的薬剤溶液から除去することが有益である。食品医薬局（「FDA」）は、静脈用薬剤用途では1時間に体重1キログラムあたり1用量毎に5内毒素単位（EU）の上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000)）。治療タンパク質が、モノクローナル抗体の場合のように、体重1キログラムあたり数百または数千ミリグラムの量で投与されるとき、微量の内毒素であっても除去することが有益である。ある特定の実施形態において、組成物における内毒素および発熱物質のレベルは、10EU/mg未満、または5EU/mg未満、または1EU/mg未満、または0.1EU/mg未満、または0.01EU/mg未満、または0.001EU/mg未満である。

【0261】

本発明は、疾患、障害、または感染に関連する1つ以上の症状を予防、治療、または改善する方法であって、（a）1つ以上のヘテロ多量体を含む予防または治療有効量の組成

40

50

物の用量を、それを必要とする対象に投与すること、および（b）当該ヘテロ多量体の1つ以上の続く用量を投与して、ヘテロ多量体の血漿レベルを、抗原に連続的に結合する所望のレベル（例えば、約0.1～約100μg/ml）に維持することを含む当該方法を提供する。ある特定の実施形態において、ヘテロ多量体の血漿濃度は、10μg/ml、15μg/ml、20μg/ml、25μg/ml、30μg/ml、35μg/ml、40μg/ml、45μg/ml、または50μg/mlに維持される。ある特定の実施形態において、投与されるヘテロ多量体の当該有効量は、1用量あたり少なくとも1mg/kg～8mg/kgである。別のある特定の実施形態において、投与されるヘテロ多量体の当該有効量は、1用量あたり少なくとも4mg/kg～5mg/kgである。なお別のある特定の実施形態において、投与されるヘテロ多量体の当該有効量は、1用量あたり50mg～250mgである。更に別のある特定の実施形態において、投与されるFc変種の当該有効量は、1用量あたり100mg～200mgである。

【0262】

本発明は、ヘテロ多量体が、ヘテロ多量体および/または変種融合タンパク質以外の治療（例えば、予防または治療剤）と組み合わせて使用される、疾患、障害、または感染に関連する1つ以上の症状を予防、治療、または改善するプロトコールも包含する。本発明は、本発明のヘテロ多量体が、現行の標準的および実験的化学療法を含む他の癌療法を強化し、他の癌療法と相乗作用し、他の癌療法の効果を増強し、他の癌療法の許容性を改善し、および/または他の癌療法により引き起こされる副作用を低減するという認識に部分的に基づいている。本発明の併用治療は、追加の効力、追加の治療効果、または相乗効果を有する。本発明の併用治療は、疾患、障害、または感染に関連する1つ以上の症状を予防、治療、もしくは改善するヘテロ多量体と一緒に利用した療法（例えば、予防または治療剤）の低い投与量を可能にして、ならびに/あるいは疾患、障害、または感染を有する対象へのそのような予防または治療剤の低い投与頻度を可能にして、当該対象の生活の質を改善する、および/または予防もしくは治療効果を達成する。更に、本発明の併用治療は、現行の単一薬剤療法および/または現存する併用療法に関連する不要または有害な副作用を低減または開始し、次には治療プロトコールへの患者の服薬順守を改善する。本発明のヘテロ多量体と組み合わせて利用され得る多数の分子は、当該技術において良く知られている。例えば、PCT国際公開公報第02/070007号、同第03/075957号、および米国特許公開第2005/064514号を参照すること。

【0263】

産業上の使用

ヘテロ多量体の単一ドメイン抗原結合構築物およびヘテロ二量体Fc領域の両方の生物学的安定性の観点から、本明細書に記載されているヘテロ多量体は、単一ドメイン抗原結合構築物フラグメント（例えば、単離V_hH）それ自体が有用性を有する産業上の用途にも使用され得ることが考慮される（de Marco (2011) Microbial Cell factories 10:44を参照すること）。したがって、1つの実施形態において、本発明のヘテロ多量体は、毒素を同定および解毒するため、免疫検出、精製、およびバイオ分離の試薬として、またはタンパク質凝集および活性調節を研究するツールとして使用されうる。

【0264】

キット

本発明は、疾患、障害、または感染に関連する1つ以上の症状をモニター、診断、予防、治療、または改善する使用のため、検出剤、治療剤、または薬剤と複合体化した抗原に特異的に結合する、FcRsおよび/またはC1qへの変更された結合親和性、ならびに変更されたADCcおよび/またはCDC活性を有する1つ以上のヘテロ多量体を1つ以上の容器中に含むキットを提供する。

【実施例】

【0265】

下記の実施例は、本発明の実施を例示するために提示される。これらは、本発明の全範

10

20

30

40

50

囲を限定または定義することを意図しない。

【0266】

実施例1：ヘテロ二量体Fcドメインを有する二価単一特異性抗体の生成。

抗体重鎖をコードする遺伝子は、ヒト/哺乳類発現に最適化されたコドンを使用する遺伝子合成を介して構築した。配列は、既知のHer2/neu結合Abから生成し(Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti-P185 Her2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci 89, 4285)、FcはIgG1アイソタイプ(配列番号1)であった。最終遺伝子産物を、哺乳類発現ベクターpTT5(NRC-BRI, Canada)にサブクローニングした(Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human HEK293-EBNA1 cells. Nucleic acids research 30, E9 (2002))。CH3ドメインにおける突然変異は、pTT5テンプレートベクターの部位特異的突然変異誘発を介して導入した。表1および表6、ならびに実施された変種CH3ドメイン突然変異のリストは表7を参照すること。

【0267】

ヘテロ二量体の形成を推定するため、およびホモ二量体とヘテロ二量体の比を決定するために、2つのヘテロ二量体重鎖を、異なるサイズのC末端延長(具体的には、C末端Hisタグを有する鎖A、およびC末端mRFP+StrepタグIIを有する鎖B)により設計した。この分子量の差は、図25Aに例示されているように、非還元的SDS-PAGEにおいてホモ二量体とヘテロ二量体の差異化を可能にする。

【0268】

HEK293細胞を水性1mg/mLの25kDaポリエチレンイミン(PEI, Poly sciences)により、2.5:1のPEI:DNA比で対数増殖期(1.5~2百万細胞/mL)に形質移入した。(Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55 (1): 44-51 (2011))。ヘテロ二量体を形成する最適濃度範囲を決定するため、DNAを、2つの重鎖の3つの別々の比で形質移入した。例えば、これは、5%のGFP、45%のサケ精子DNA、25%の軽鎖、および25%の全重鎖から構成される、2mLの培養物量および形質移入DNAにおいて実施され、ここで、重鎖Aプラスミド(C末端Hisタグを有する)および重鎖Bプラスミド(C末端StrepタグII+RFPを有する)65%/55%/35%または10%/20%/40%により)を3つの異なる相対比(鎖_A(His)/鎖_B(mRFP))の10%/65%、20%/55%、40%/35%で試料採取した(WT_His/WT_mRFPのヘテロ二量体の見掛け発現比の1:1は、DNA比の20%/55%に近いと決定された)。F17血清無含有培地(Gibco)に形質移入した4~48時間後、TN1ペプトンを最終濃度0.5%で加える。発現した抗体をSDS-PAGEにより分析して、最適なヘテロ二量体形成に最適な重と軽の鎖の比を決定した(図25BおよびCを参照すること)。

【0269】

選択されたDNA比、例えば、50%の軽鎖プラスミド、25%の重鎖Aプラスミド、25%の重鎖BのAZ33およびAZ34、5%のGFP、ならびに45%のサケ精子DNAを使用して、上記に記載されたように、150mLの細胞培養物に形質移入した。形質移入された細胞を、5~6日後に培養培地から採取し、4000rpmで遠心分離して収集し、0.45μmフィルターの使用により清澄化した。純度および融解温度の決定を含む更なるアッセイのために生成された、CH3突然変異を有するそれぞれの抗体のため

10

20

30

40

40

50

の規模拡大形質移入アッセイに使用される軽および重鎖 A および B プラスミドの率のリストは、下記の表 2 を参照すること。

【表 7】

表2

変種	LC/HCA/HCB	変種	LC/HCA/HCB	変種	LC/HCA/HCB	変種	LC/HCA/HCB
野生型	50%,50%	AZ47	50%,25%,25%	AZ77	40%,20%,40%	AZ98	50%,20%,30%
AZ12	50%,25%,25%	AZ48	40%,25%,35%	AZ78	50%,20%,30%	AZ100	50%,20%,30%
AZ14	50%,25%,25%	AZ49	50%,25%,25%	AZ79	25%,35%,40%	AZ101	50%,20%,30%
AZ15	50%,25%,25%	AZ63	50%,20%,30%	AZ81	25%,35%,40%	AZ106	25%,35%,40%
AZ17	50%,25%,25%	AZ64	50%,20%,30%	AZ82	50%,20%,30%	AZ114	25%,20%,55%
AZ19	50%,25%,25%	AZ65	50%,20%,30%	AZ83	50%,20%,30%	AZ115	25%,20%,55%
AZ20	50%,25%,25%	AZ66	50%,20%,30%	AZ84	50%,20%,30%	AZ122	25%,20%,55%
AZ21	50%,25%,25%	AZ67	50%,20%,30%	AZ85	50%,25%,25%	AZ123	40%,20%,40%
AZ25	50%,25%,25%	AZ68	50%,20%,30%	AZ86	40%,15%,45%	AZ124	40%,20%,40%
AZ29	50%,25%,25%	AZ69	50%,20%,30%	AZ87	50%,25%,25%	AZ129	40%,30%,30%
AZ30	50%,25%,25%	AZ70	50%,20%,30%	AZ88	50%,25%,25%	AZ130	40%,30%,30%
AZ32	50%,25%,25%	AZ71	40%,20%,40%	AZ89	40%,15%,45%		
AZ33	50%,25%,25%	AZ72	40%,20%,40%	AZ91	50%,25%,25%		
AZ34	50%,25%,25%	AZ73	40%,20%,40%	AZ92	40%,20%,40%		
AZ42	50%,25%,25%	AZ74	40%,20%,40%	AZ93	40%,20%,40%		
AZ44	50%,25%,25%	AZ75	40%,20%,40%	AZ94	50%,25%,25%		
AZ46	50%,25%,25%	AZ76	40%,20%,40%	AZ95	50%,20%,30%		

【0270】

実施例 2： ヘテロ二量体 Fc ドメインを有する二価单一特異性抗体の精製。

清澄化された培養培地を M a b S e l e c t S u R e (G E H e a l t h c a r e) プロテイン A カラムに装填し、10 カラム容量の PBS 緩衝液により pH 7.2 で洗浄した。抗体を 10 カラム容量のクエン酸緩衝液により pH 3.6 で溶出し、プールした画分は、T R I S により pH 11 で中和された抗体を含有した。タンパク質を E c o n o - P a c 10 DG カラム (B i o - R a d) の使用により最終的に脱塩した。重鎖 B の C 末端 m R F P タグは、抗体を PBS においてエンテロキナーゼ (N E B) と 1 : 1 0 , 0 0 0 の比により 25 °C でインキュベートすることにより除去した。抗体をゲル濾過により混合物から精製した。ゲル濾過では、3.5 mg の抗体混合物を 1.5 mL に濃縮し、流速 1 mL / 分により A K T A E x p r e s s F P L C を介して S e p h a d e x 2 0 0 H i L o a d 1 6 / 6 0 0 2 0 0 p g カラム (G E H e a l t h c a r e) に装填した。pH 7.4 の PBS 緩衝液を流速 1 mL / 分で使用した。精製抗体に対応する

10

20

30

40

50

画分を収集し、約 1 m g / m L に濃縮し、- 8 0 で保存した。

【 0 2 7 1 】

ホモ二量体と比較したヘテロ二量体の形成を、非還元的 SDS - PAGE および質量分析の使用によりアッセイした。プロテイン A 精製抗体に 4 ~ 1 2 % 勾配の SDS - PAGE 、非還元的ゲルを実施して、エンテロキナーゼ (E K) 処理前に形成されたヘテロ二量体の率を決定した (図 2 6 を参照すること) 。質量分析では、全ての Trap LC / MS (E S I - T O F) 実験を、 Waters Q - T O F 2 質量分析機が接続されている Agilent 1100 HPLC システムにより実施した。5 μ g のゲル濾過精製抗体を、 Protein MicroTrap (1 . 0 \times 8 . 0 mm) に注入し、 1 % のアセトニトリルにより 8 分間、 1 ~ 2 0 % のアセトニル / 0 . 1 % のギ酸の勾配により 2 分間洗浄し、次に 2 0 ~ 6 0 % のアセトニル / 0 . 1 % のギ酸の勾配により 2 0 分間溶出した。溶出物 (3 0 ~ 5 0 μ L / 分) を、毎秒得たスペクトル (m / z 8 0 0 ~ 4 , 0 0 0) で分光計に導いた。 (図 2 8 を参照すること) それぞれ 8 5 % を超えるヘテロ二量体形成を有した AZ 1 2 および AZ 1 4 を除いて、 9 0 % を超えるヘテロ二量体を有する変種を、更なる分析により選択した。 10

【 0 2 7 2 】

実施例 3 : 示差走査熱量測定 (D S C) の使用によるヘテロ二量体 F c を有する二価単一特異性抗体の安定性の決定。

全ての D S C 実験は、 GE V P - C a p i l l a r y 器機を使用して実施した。タンパク質は、 P B S (p H 7 . 4) に緩衝液を交換し、 0 . 4 ~ 0 . 5 m g / m L に希釈し、 0 . 1 3 7 m L を試料セルに装填し、 1 / 分の走査速度により 2 0 ~ 1 0 0 で測定した。データは、 P B S 緩衝液バックグラウンドを差し引いて、 O r i g i n ソフトウェア (GE H e a l t h c a r e) の使用により分析した (図 2 7 を参照すること) 。試験した変種および決定した融解温度について、表 3 を参照すること。 7 0 以上の融解温度を有する変種、およびそれぞれの変種に特定の T m のリストは、表 4 を参照すること。 20

【表8】

表3 ホモ二量体形成と比較した、90%以上のヘテロ二量体形成を有するIgG1抗体における変種CH3ドメインの融解温度測定

変種	Tm°C	変種	Tm°C	変種	Tm°C	変種	Tm°C
野生型	81	AZ29	70	AZ63	71.5	AZ87	71
対照1	69	AZ30	71	AZ64	74	AZ88	72
対照2	69	AZ31	68	AZ65	73	AZ89	72.5
AZ3	65	AZ32	71.5	AZ66	72.5	AZ91	71.5
AZ6	68	AZ33	74	AZ67	72	AZ92	71.5
AZ8	68	AZ34	73.5	AZ68	72	AZ93	71.5
AZ12	77	AZ38	69	AZ69	71	AZ94	73.5
AZ14	77	AZ42	70	AZ70	75.5	AZ95	72
AZ15	71.5	AZ43	67	AZ71	71	AZ98	70
AZ16	68.5	AZ44	71.5	AZ72	70.5	AZ99	69
AZ17	71	AZ46	70.5	AZ73	71	AZ100	71.5
AZ18	69.5	AZ47	70.5	AZ74	71	AZ101	74
AZ19	70.5	AZ48	70.5	AZ75	70	AZ106	74
AZ20	70	AZ49	71	AZ76	71.5	AZ114	71
AZ21	70	AZ50	69	AZ77	71	AZ115	70
AZ22	69	AZ52	68	AZ78	70	AZ117	69.5
AZ23	69	AZ53	68	AZ79	70	AZ122	71
AZ24	69.5	AZ54	67	AZ81	70.5	AZ123	70
AZ25	70.5	AZ58	69	AZ82	71	AZ124	70
AZ26	69	AZ59	69	AZ83	71	AZ125	69
AZ27	68	AZ60	67	AZ84	71.5	AZ126	69
AZ28	69.5	AZ61	69	AZ85	71.5	AZ129	70.5
		AZ62	68	AZ86	72.5	AZ130	71

10

20

30

40

【表9-1】

表4 IgG1抗体における選択された変種CH3ドメインの融解温度測定

変種	Tm°C	変種	Tm°C	変種	Tm°C	変種	Tm°C
野生型	81.5	AZ42	70	AZ73	71	AZ91	71.5
対照1	69	AZ44	71.5	AZ74	71	AZ92	71.5
対照2	69	AZ46	70.5	AZ75	70	AZ93	71.5
AZ12	>77	AZ47	70.5	AZ76	71.5	AZ94	73.5
AZ14	>77	AZ48	70.5	AZ77	71	AZ95	72
AZ15	71.5	AZ49	71	AZ78	70	AZ98	70
AZ17	71	AZ63	71.5	AZ79	70	AZ100	71.5
AZ19	70.5	AZ64	74	AZ81	70.5	AZ101	74
AZ20	70	AZ65	73	AZ82	71	AZ106	74
AZ21	70	AZ66	72.5	AZ83	71	AZ114	71
AZ25	70.5	AZ67	72	AZ84	71.5	AZ115	70
AZ29	70	AZ68	72	AZ85	71.5	AZ122	71
AZ30	71	AZ69	71	AZ86	72.5	AZ123	70
AZ32	71.5	AZ70	75.5	AZ87	71	AZ124	70
AZ33	74	AZ71	71	AZ88	72	AZ129	70.5
AZ34	73.5	AZ72	70.5	AZ89	72.5	AZ130	71

【0273】

実施例4：表面プラズモン共鳴を用いたFcガンマR結合の評価

全ての結合実験は、10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、3.4 mMのEDTA、および0.05%のTween 20、pH 7.4により25℃でBioread Protein XPR36器機を使用して実施した。組み換えHER-2/neu(p185, ErbB-2 (eBiosciences, Inc.))は、およそ3000共鳴単位(RU)が停止した残りの活性基により固定化されるまで、10 mMのNaOAc(pH 4.5)中4.0 µg/mLを25 µL/分で注入することにより、活性化GLMセンサーチップに捕捉させた。40 µg/mLの、変種CH3ドメインを含む精製された抗HER-2/neu抗体は、25 µL/分により240秒間注入し(およそ500 RUをもたらした)、続いて緩衝液注入により安定したベースラインを確立したとき、Her-2/neuタンパク質を結合することによりセンサーチップに間接的に捕捉された。FcガンマR(CD16a(fアロタイプ)およびCD32b)濃度(6000、2000、667、222、および74.0 nM)を、180秒の解離相を伴って60 µL/分を120秒間注入して、一連の結合センサグラムを得た。得られたK_D値は、報告された値を3つの個別の実施からの平均として用いる平衡当て嵌めを使用した結合等温線により決定した。比較は、野生型IgG1 Fcドメインを行い、結合は、野生型のK_Dと変種の

10

20

30

40

50

kDの比として表す(表5を参照すること)。

【表10-1】

表5 野生型IgG1と、CD16aおよびCD32bに個別に結合する変種CH3ドメイン抗体とのkDの比

変種	野生型/変種の CD16a の比	野生型/変種の CD32b の比	変種	野生型/変種の CD16a の比	野生型/変種の CD32b の比
対照1	1.28	1.68	AZ64	0.95	0.9
対照2	1.1	1.13	AZ65	0.93	0.9
AZ3	1.75	1.87	AZ66	1.26	1.19
AZ6	1.38	1	AZ67	1.21	1.13
AZ8	1.75	1.64	AZ68	1.02	1.1
AZ12	該当なし	該当なし	AZ69	0.96	1.05
AZ14	該当なし	該当なし	AZ70	1.06	1.11
AZ15	0.72	0.59	AZ71	0.89	0.95
AZ16	0.95	0.64	AZ72	1.04	1.02
AZ17	2.28	2.37	AZ73	1.09	1.07
AZ18	1.53	1.7	AZ74	1.25	1.17
AZ19	1.55	1.89	AZ75	1.34	1.22
AZ20	2.56	1.93	AZ76	0.99	1
AZ21	2.41	3.28	AZ77	1	1.08
AZ22	2.02	2.37	AZ78	0.9	1
AZ23	1	2.16	AZ79	1.01	0.8
AZ24	1.79	2.26	AZ81	1.01	0.84
AZ25	2.02	2.37	AZ82	0.97	0.94
AZ26	2.38	2.59	AZ83	0.94	0.94
AZ27	2.27	2.38	AZ84	0.93	1
AZ28	1.45	2.15	AZ85	1.01	1.14
AZ29	1.62	2.13	AZ86	1.22	1.18

10

20

30

40

【表 10 - 2】

AZ30	1.61	2.38	AZ87	1.03	1.1
AZ31	1.63	2.29	AZ88	1.11	1.15
AZ32	1.82	2.48	AZ89	1.12	1.24
AZ33	1.91	1.89	AZ91	1.11	1.11
AZ34	1.88	1.88	AZ92	1.21	1.24
AZ38	1.78	1.44	AZ93	1.21	1.18
AZ42	1.28	1.09	AZ94	1.17	1.19
AZ43	1.63	1.73	AZ95	0.86	0.96
AZ44	2.76	3.07	AZ98	0.79	0.82
AZ46	2.16	2.66	AZ99	1.16	1.15
AZ47	1.76	2.12	AZ100	1.13	1.12
AZ48	2.02	1.59	AZ101	1.24	1.23
AZ49	2.09	2.9	AZ106	0.76	0.64
AZ50	2.33	1.86	AZ114	1.3	0.84
AZ52	1.55	1.5	AZ115	1.13	0.82
AZ53	1.87	1.27	AZ117	0.89	1
AZ54	1.36	1.64	AZ122	0.89	0.92
AZ58	2.33	1.48	AZ123	0.85	0.92
AZ59	1.18	1.57	AZ124	0.99	1.09
AZ60	1.51	1.23	AZ125	1	1
AZ61	1.41	1.75	AZ126	0.86	0.9
AZ62	1.53	1.88	AZ129	1.91	2.57
AZ63	0.9	0.95	AZ130	1.91	2.54

【0274】

実施例5：F c _ C H 3 操作を使用するヘテロ多量体 - 足場1 (1aおよび1b) の合理的な設計、ならびにAZ17-62およびAZ133-AZ2438の開発

初期AZ8の安定性および純度を改善するため、上記に記載された構造および計算戦略を用いた。（図24を参照すること）例えば、AZ8の徹底的な構造機能分析は、野生型ヒトIgG1と比較して、AZ8の導入された突然変異L351Y_V397S_F40

10

20

30

40

50

5 A _ Y 4 0 7 V / K 3 9 2 V _ T 3 9 4 W のそれについて詳細な理解を提供し、重要なコアヘテロ二量体突然変異が、L 3 5 1 Y _ F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V / T 3 9 4 W であり、一方、V 3 9 7 S、K 3 9 2 V がヘテロ二量体形成に関連性のないことを示した。コア突然変異 (L 3 5 1 Y _ F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V / T 3 9 4 W) は、本明細書において「足場 1」突然変異と呼ばれる。分析は、野生型 (WT) 亦モニ量体形成に関して損失した重要な界面ホットスポットが、WT - F 4 0 5 - K 4 0 9、Y 4 0 7 - T 3 6 6 の相互作用、ならびに Y 4 0 7 - Y 4 0 7 および - F 4 0 5 の詰め込みであることを、更に明らかにした (図 29 を参照すること)。このことは、ループ領域 D 3 9 9 - S 4 0 0 - D 4 0 1 (図 30 を参照すること) および K 3 7 0 での会合シートにおいて大きな立体配座の差を示す、詰め込み、空洞、および MD 分析を反映した。これは、鎖間相互作用 K 4 0 9 - D 3 9 9 の損失 (図 30 を参照すること)、および E 3 5 7 への強力な K 3 7 0 水素結合の弱まりをもたらした (K 3 7 0 は、もはや S 3 6 4 および E 3 5 7 と直接接触していないが、溶媒に完全に曝露されている)。WT - I g G 1 C H 3 ドメインにおいて、これらの領域は、縁で界面と連結し、コア相互作用を嵩高溶媒との競合から保護し、好み深い疎水性のファンデルワールス相互作用の動力学的な発生を増加する。結果は、WT と比較して A Z 8 の低い埋没表面、および疎水性コアの高い溶媒利用能であった。このことは、WT の安定性と比較して A Z 8 の低い安定性における最も重要な要因は、a) WT - F 4 0 5 - K 4 0 9 の相互作用および F 4 0 5 の詰め込みの損失、ならびに b) Y 4 0 7 - Y 4 0 7 および Y 4 0 7 - T 3 6 6 の強力な詰め込み相互作用の損失であったことを示した。図 29 を参照すること

10

20

【0275】

したがって、本発明者たちは、WT と比較して低い A Z 8 の安定性の原因である主要な残基 / 配列モチーフを同定した。A Z 8 の安定性およびヘテロ二量体特異性を改善するため、続く積極的設計操作努力は、したがって、より「閉鎖した」WT 様の立体配座における 3 9 9 - 4 0 1 の位置でループ立体配座を安定化すること (図 30 を参照すること)、ならびに T 3 6 6 および L 3 6 8 の位置における疎水性コアの詰め込みの全体的な僅かな減少 (ゆるまり) を補うことに特に焦点を合わせた (図 29 を参照すること)。

【0276】

3 9 9 - 4 0 1 の位置のループ立体配座の安定化を達成するため、記載されている計算手法を使用して、異なる標的設計構想を評価した。具体的には、3 つの異なる独立したヘテロ多量体 A Z 8 の選択肢を分析して、安定性を改善するため、同定された主要な領域を最適化した。第 1 には、K 4 0 9 および F 4 0 5 A の位置に近い空洞を、疎水性コアを保護すること、および 3 9 9 - 4 0 0 のループ立体配座を安定化することの両方のために、より良好な疎水性詰め込みについて評価した (図 30 を参照すること)。これらには、F 4 0 5 および K 3 9 2 の位置における追加の点突然変異が含まれるが、これに限定されない。第 2 には、3 9 9 - 4 0 0 のループ立体配座を安定化するため、および疎水性コアを保護するために、3 9 9 - 4 0 9 の位置の静電相互作用を改善する選択肢を評価した。これらには、T 4 1 1 および S 4 0 0 の位置における追加の点突然変異が含まれるが、これに限定されない。第 3 には、T 3 6 6、T 3 9 4 W、および L 3 6 8 の位置のコア詰め込みにおける空洞を、コア疎水性詰め込みを改善するために評価した (図 29 を参照すること)。これらには、T 3 6 6 および L 3 6 8 の位置における追加の点突然変異が含まれるが、これに限定されない。異なる独立した積極的設計構想を、コンピューターにより試験し、計算ツールを使用した最高ランクの変種 (A Z 1 7 - A Z 6 2) を、実施例 1 ~ 4 の記載されたように、発現および安定性について実験的に確認した。70 以上の融解温度を有するこの設計段階でのヘテロ多量体のリストは、表 4 を参照すること。

30

40

【0277】

ヘテロ多量体 A Z 3 3 は、足場 1 が修飾されて、安定性および純度を改善する足場 1 a 突然変異をもたらす、ヘテロ多量体の開発の一例である。このヘテロ多量体は、疎水性コアを保護すること、および 3 9 9 - 4 0 0 のループ立体配座を安定化することの両方のために、3 9 2 - 3 9 4 - 4 0 9 および 3 6 6 の位置における疎水性詰め込みを改善する目

50

的で A Z 8 に基づいて設計された。このヘテロ多量体 A Z 3 3 ヘテロ二量体は、 A Z 8 、 K 3 9 2 M 、および T 3 6 6 I のコア突然変異と異なる 2 つの追加の点突然変異を有する。突然変異 T 3 6 6 I _ K 3 9 2 M _ T 3 9 4 W / F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V は、本明細書において「足場 1 a 」突然変異と呼ばれる。突然変異 K 3 9 2 M は、疎水性コアを保護し、 3 9 9 - 4 0 0 のループ立体配座を安定化するために、 K 4 0 9 および F 4 0 5 A の位置に近い空洞における詰め込みを改善するように設計された（図 3 1 を参照すること）。 T 3 6 6 I は、コア疎水性詰め込みを改善するため、および T 3 9 4 W 鎖のホモ二量体の形成を排除するために設計された（図 2 9 を参照すること）。 A Z 3 3 の実験データは、初期の消極的設計ヘテロ多量体 A Z 8 (T m 6 8) よりも有意に改善された安定性を示し、 A Z 3 3 は、 7 4 の T m および > 9 8 % のヘテロ二量体含有量を有する。（図 2 5 10 C を参照すること）

【 0 2 7 8 】

ヘテロ多量体ヘテロ二量体の第 3 の設計段階での足場 1 突然変異の使用によるヘテロ多量体の開発

A Z 3 3 は、初期の出発変種 A Z 8 よりも安定性および特異性（または純度）の有意な改善を提供するが、本発明者たちの分析は、ヘテロ二量体の安定性への更なる改善が、 A Z 3 3 の実験データおよび上記に記載された設計方法を使用した更なるアミノ酸修飾により実施され得ることを示す。異なる設計構想を、発現および安定性について独立して試験したが、独立した設計構想は、移転可能であり、最も成功したヘテロ二量体は、異なる設計の組み合わせを含有する。具体的には、 A Z 8 の詰め込みの最適化において、 K 4 0 9 - F 4 0 5 A - K 3 9 2 に近い空洞における突然変異を、 L 3 6 6 T - L 3 6 8 の残基におけるコア詰め込みを最適化する突然変異から独立して評価した。これらの 2 つの領域 3 6 6 - 3 6 8 および 4 0 9 - 4 0 5 - 3 9 2 は、互いに遠位であり、独立していると考慮される。例えばヘテロ多量体 A Z 3 3 は、 4 0 9 - 4 0 5 - 3 9 2 における詰め込みが最適化されているが、 3 6 6 - 3 6 8 では最適化されておらず、これは、これらの最適化突然変異が別々に評価されているからである。 3 6 6 - 3 6 8 突然変異の比較は、 T 3 6 6 L が、 T 3 6 6 より、また、ヘテロ多量体 A Z 3 3 の開発に使用された点突然変異である T 3 6 6 I より改善された安定性を有することを示唆している。したがって、本発明の実験データは、例えば、 T 3 6 6 I の代わりに T 3 6 6 L の導入による A Z 3 3 の更なる最適化を直ちに示唆している。したがって、 C H 3 ドメインのアミノ酸修飾 T 3 6 6 L _ K 3 9 2 M _ T 3 9 4 W / F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V は、本明細書において「足場 1 b 」突然変異と呼ばれる。

【 0 2 7 9 】

類似の方法により、完全な実験データを分析して、現行の F c 変種ヘテロ二量体 A Z 3 3 を更に改善するために使用できる点突然変異を同定した。これらの同定された突然変異を、上記に記載された計算手法により分析し、ランク付けして、表 6 に示されているように、 A Z 3 3 に基づいた追加の F c 変種ヘテロ二量体のリストを生じた。

【 0 2 8 0 】

実施例 6 : F c _ C H 3 操作を使用するヘテロ多量体 - 足場 2 (a および b) の合理的な設計、ならびに A Z 6 3 - 1 0 1 および A Z 2 1 9 9 - A Z 2 5 2 4 の開発

初期の消極的設計段階のヘテロ多量体 A Z 1 5 を安定性および純度について改善するため、上記に記載された構造および計算戦略を用いた（図 2 4 を参照すること）。例えば、ヘテロ多量体 A Z 1 5 の徹底的な構造機能分析は、野生型 (W T) ヒト I g G 1 と比較して、 A Z 1 5 の導入された突然変異 L 3 5 1 Y _ Y 4 0 7 A / E 3 5 7 L _ T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F _ T 4 1 1 N のそれぞれについて詳細な理解を提供し、重要なコアヘテロ二量体突然変異が、 L 3 5 1 Y _ Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F であり、一方、 E 3 5 7 L 、 T 4 1 1 N が、ヘテロ二量体の形成および安定性に直接的な関連性のないことを示した。コア突然変異 (L 3 5 1 Y _ Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F) は、本明細書において「足場 2 」突然変異と呼ばれる。分析は、野生型 (W T) ホモ二量体形成に関して損失した重要な界面ホットスポットが、塩架橋 D 3 9 9 - K 4 0 9 、水素結合 Y 4 0 7 50

- T 3 6 6 、および Y 4 0 7 - Y 4 0 7 の詰め込みであることを、更に明らかにした。下記に提供される本発明者たちの詳細な分析は、独自のヘテロ多量体 A Z 1 5 の安定性、ならびに改善された安定性を有するヘテロ多量体を達成するために行われた位置およびアミノ酸修飾をどのように改善したかを記載する。

【 0 2 8 1 】

足場 2 を使用したヘテロ多量体の開発および足場 2 a 突然変異の更なる開発

本発明者たちのコンピューター分析は、ヘテロ多量体 A Z 1 5 の突然変異 K 4 0 9 F - T 3 6 6 A - Y 4 0 7 A の非最適化詰め込み、W T - Y 4 0 7 - Y 4 0 7 相互作用の損失に起因する疎水性コアの全体的に減少した詰め込みを示した。続く操作段階での積極的設計努力は、初期 F c 変種 A Z 1 5 におけるこれらの詰め込み欠陥を補うために点突然変異に焦点を合わせた。標的残基には、T 3 6 6 、L 3 5 1 、および Y 4 0 7 の位置が含まれた。これらの異なる組み合わせを、コンピューターにより試験し、計算ツールを使用した最高ランクの変種 (A Z 6 3 - A Z 7 0) を、実施例 1 ~ 4 の記載されたように、発現および安定性について実験的に確認した。

10

【 0 2 8 2 】

F c 変種 A Z 7 0 は、足場 2 が修飾されて、安定性および純度を改善する足場 2 a 突然変異をもたらす、ヘテロ多量体の開発の一例である。このヘテロ多量体は、上記に記載されているように、疎水性コアにおけるより良好な詰め込みを達成する目的で A Z 1 5 に基づいて設計された。ヘテロ多量体 A Z 7 0 は、T 3 6 6 が、T 3 6 6 A の代わりに T 3 6 6 V に突然変異されたことを除いて、上記に記載されたものと同じ足場 2 コア突然変異 (L 3 5 1 Y - Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A - K 4 0 9 F) を有する (図 3 3)。L 3 5 1 Y 突然変異は、3 6 6 A - 4 0 9 F / 4 0 7 A 変種の融解温度を 7 1 . 5 から 7 4 に改善し、3 6 6 A から 3 6 6 V への追加の変化は、T m を 7 5 . 5 に改善する。 (それぞれ 7 1 . 5 、7 4 、および 7 5 . 5 の T m を有する、表 4 の A Z 6 3 、A Z 6 4 、および A Z 7 0 を参照すること) コア突然変異 (Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A - K 4 0 9 F) は、本明細書において「足場 2 a 」突然変異と呼ばれる。F c 変種 A Z 7 0 の実験データは、初期の消極的設計 F c 変種 A Z 1 5 (T m 7 1) よりも有意に改善された安定性を示し、A Z 7 0 は、7 5 . 5 の T m および > 9 0 % のヘテロ二量体含有量を有する (図 3 3 および 2 7)。

20

【 0 2 8 3 】

30

足場 2 を使用したヘテロ多量体の開発および足場 2 b 突然変異の更なる開発

分子動力学シミュレーション (M D) および詰め込み分析は、ループ 3 9 9 - 4 0 0 の好みより「開放された」立体配座を示し、これは、W T 塩架橋 K 4 0 9 - D 3 9 9 の損失に起因する可能性があった。このことは、不十分な D 3 9 9 をもたらし、次には K 3 9 2 との相互作用を補うので好みなく、ループのより「開放された」立体配座を誘導した。このより「開放された」ループ立体配座は、コア C H 3 ドメイン界面残基の全体的に減少した詰め込み、および高い溶媒利用能をもたらし、次には有意に不安定化されたヘテロ二量体複合体をもたらす。したがって、標的積極的設計努力の 1 つは、D 3 9 9 - K 4 0 9 塩架橋および K 4 0 9 の詰め込み相互作用の損失を補う追加の点突然変異によって、このループをより「閉鎖された」W T 様立体配座に連結することであった。標的残基には、T 4 1 1 、D 3 9 9 、S 4 0 0 、F 4 0 5 、N 3 9 0 、K 3 9 2 、およびこれらの組み合わせの位置が含まれた。異なる詰め込み、疎水性および静電気積極的操作戦略を、上記の位置に関してコンピューターにより試験し、計算ツールの使用により決定された最高ランクのヘテロ多量体 (A Z 7 1 - A Z 1 0 1) を、実施例 1 ~ 4 に記載されているように、発現および安定性について実験的に確認した。

40

ヘテロ多量体 A Z 9 4 は、足場 2 が修飾されて、安定性および純度を改善する、追加の点突然変異を伴う足場 2 b をもたらす、F c 変種の開発の一例である。この F c 変種は、上記に記載されたように、ループ 3 9 9 - 4 0 0 をより「閉鎖された」W T 様立体配座に連結し、D 3 9 9 - K 4 0 9 塩架橋の損失を補う目的で A Z 1 5 に基づいて設計された。F c 変種 A Z 9 4 は、足場 2 への 4 つの追加の点突然変異 (L 3 5 1 Y - Y 4 0 7 A / T 3

50

6 6 A _ K 4 0 9 F) を有し、 L 3 5 1 Y を野生型 L 3 5 1 に戻して、この F c 变種のコア突然変異として (Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F) を残す。コア突然変異 Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F は、本明細書において「足場 2 b 」突然変異と呼ばれる。 A Z 9 4 の 4 つの追加の点突然変異は、 K 3 9 2 E _ T 4 1 1 E / D 3 9 9 R _ S 4 0 0 R である。突然変異 T 4 1 1 E / D 3 9 9 R は操作されて、追加の塩架橋を形成し、 K 4 0 9 / D 3 9 9 相互作用の損失を補った (図 3 4) 。加えて、この塩架橋は、両方の潜在的なホモ二量体において電荷間相互作用を避けることにより、ホモ二量体形成を防止するよう設計された。追加の突然変異 K 3 9 2 E / S 4 0 0 R は、別の塩架橋を形成し、したがって、 3 9 9 _ 4 0 0 ループをより「閉鎖された」 WT 様立体配座に更に連結することが意図された (図 3 4) 。 A Z 9 4 の実験データは、初期の消極的設計 F c 变種 A Z 1 5 (T m 7 1 、純度 > 9 1 %) よりも改善された安定性および純度を示し、 F c 变種 A Z 9 4 は、 7 4 の T m および > 9 5 % のヘテロ二量体含有量または純度を有する。

【 0 2 8 4 】

ヘテロ二量体の第 3 の設計段階での足場 2 突然変異の使用によるヘテロ多量体の開発

両方の F c 变種 A Z 7 0 および A Z 9 4 は、初期の消極的設計 F c 变種 A Z 1 5 より安定性および純度に有意な改善をもたらすが、本発明者たちの分析および A Z 7 0 と A Z 9 4 の比較は、 F c 变種ヘテロ二量体の安定性への更なる改善が更なるアミノ酸修飾により実施され得ることを直接的に示している。例えば、 F c 变種 A Z 7 0 および A Z 9 4 は、初期变種 A Z 1 5 の 2 つの別個の非最適化領域を標的にするように設計されており、これは、 3 9 9 - 4 0 1 の位置のループ立体配座を安定化するために、疎水性コアの詰め込みを改善すること、ならびに追加の塩架橋および水素結合をもたらすコア界面残基の外側に突然変異を起こすことによって実施した。 F c 变種 A Z 7 0 および A Z 9 4 の追加の点突然変異は、互いに遠位であり、したがって独立しており、 2 a および 2 b 突然変異を含む同じ足場 2 コア突然変異の周辺を設計した他の F c 变種に移転され得る。具体的には、 A Z 7 0 は、最適化コア突然変異 L 3 5 1 Y _ Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F のみを有するが、追加の塩架橋を有さず、一方、 A Z 9 4 は、 4 つの追加の静電突然変異 (K 3 9 2 E _ T 4 1 1 E / D 3 9 9 R _ S 4 0 0 R) を含むが、疎水性コア界面に 1 つ少ない突然変異 (Y 4 0 7 A / T 3 6 6 A _ K 4 0 9 F) を有する。これらの足場 2 b 突然変異は、 A Z 7 0 よりも安定性が少ないが (例えば、 A Z 9 4 と同等のコア突然変異を有し、 7 2 の T m を有する A Z 6 3 を参照すること) 、 K 3 9 2 E _ T 4 1 1 E / D 3 9 9 R _ S 4 0 0 R 突然変異の付加により補われる。本発明の実験安定性および純度データは、疎水性コアを最適化する A Z 7 0 の突然変異と、 A Z 9 4 の静電突然変異とを組み合わせることによって、 F c 变種を含むヘテロ二量体の安定性および純度を更に改善するはずであることを示す。類似の方法により、足場 2 F c 变種 (A Z 6 3 - 1 0 1) の完全な実験データを分析して、 F c 变種ヘテロ二量体 A Z 7 0 および A Z 9 4 を更に改善することに使用できる点突然変異を同定した。これらの同定された突然変異を、上記に記載された計算手法により更に分析し、ランク付けして、表 7 に示されているように、 A Z 7 0 および A Z 9 4 に基づいた追加の F c 变種ヘテロ二量体のリストを生じた。

【 0 2 8 5 】

実施例 7 : F c g R 結合に対するヘテロ二量体 C H 3 の作用

F c g R によるヘテロ二量体 F c 活性の原型例として、本発明者たちは、ヘテロ二量体 F c 領域 A : K 4 0 9 D _ K 3 9 2 D / B : D 3 9 9 K _ D 3 5 6 K (対照 1 (図 3 5 の h e t 1)) および A : Y 3 4 9 C _ T 3 6 6 S _ L 3 6 8 A _ Y 4 0 7 V / B : S 3 5 4 C _ T 3 6 6 W (対照 4 (図 3 5 の h e t 2)) を有する 2 つの変種抗体を、 F c g R 結合について実施例 4 に記載されている S P R アッセイにおいて、 H e r 2 結合 F a b 腕を用いて試験した。図 3 5 に示されているように、本発明者たちは、両方のヘテロ二量体 F c 領域が、野生型 I g G 1 F c 領域と同じ相対強度で異なる F c ガンマ受容体に結合するが、全体的に、ヘテロ二量体 F c 領域が、それぞれの F c g R に野生型抗体より僅かに良好に結合したことを観察する。このことは、 F c の C H 3 界面における突然変異が、本発明者たちの分子動力学シミュレーションおよび分析により観察されたように、 C

10

20

30

40

50

H 2 ドメイン全体にわたって F c ガンマ受容体への F c 領域の結合強度に影響を与えることを示す。

【 0 2 8 6 】

実施例 8 : F c g R 結合に対するヘテロ二量体 F c の C H 2 における非対称突然変異の作用

F c 領域の C H 2 ドメインにおける 2 6 7 の位置のセリンの、アスパラギン酸への突然変異 (S 2 6 7 D) は、 C H 2 ドメインの 2 つの鎖にホモ二量体的方法で導入されたとき、 F c ガンマ I I b F 、 I I b Y 、および I I a R 受容体への結合を増強することが知られている。この突然変異は、図 3 6 A に提示されたデータが示すように、この突然変異がホモ二量体 C H 2 F c に導入されたときに比べて結合強度における改善のほぼ半分を得るため、ヘテロ二量体 F c 分子の C H 2 ドメインの 1 つのみに導入され得る。一方、 F c のホモ二量体 C H 2 ドメインにおける E 2 6 9 K 突然変異は、 F c g R への F c 領域の結合を防止する。本発明者たちは、 F c の C H 2 ドメインの 2 つ鎖の一方に、これらの好ましいおよび好ましくない突然変異の非対称導入により、 F c g 受容体への F c 領域の結合強度の増強された操作についてのスキームを提示する。ヘテロ二量体 F c における C H 2 鎖の 1 つへの非対称的な方法による E 2 6 9 K 突然変異の導入は、提示される面において F c g R の結合を阻止し、 F c の他の面が通常の方法で F c g R と相互作用することを放置する、極性ドライバーとして作用する。この実験の結果を図 3 6 A に表す。独立した方法により F c の両方の鎖を介して結合強度を選択的に変える機会は、 F c と F c g 受容体の結合強度および選択性を操作する機会の増加を提供する。したがって、 C H 2 ドメインにおける突然変異のそのような非対称設計は、特定の結合モデルを好み、または避けて、選択性を導入する大きな機会を提供する、積極的および消極的設計戦略の導入を可能にする。

【 0 2 8 7 】

続く実験において、本発明者たちは、 F c ガンマ I I I a F および I I I a V 受容体への増加した結合強度を示し、同時に F c ガンマ I I a R 、 I I b F 、および I I b Y 受容体への弱い結合を示し続ける、塩基 F c 突然変異体 S 2 3 9 D _ D 2 6 5 S _ I 3 3 2 E _ S 2 9 8 A の選択性プロファイルを変更した。これは、図 3 6 B に示されている結合プロファイルにおいて示されている。鎖 A に非対称突然変異 E 2 6 9 K を導入し、鎖 B において I 3 3 2 E 突然変異を開始することにより、 I I a および I I b 受容体結合を更に弱め、 F c を I I I a 受容体結合に対してより特異的にする、新規 F c g R 結合プリファイルを生成することができた。

【 0 2 8 8 】

図 3 6 C に示されている別の例では、非対称突然変異が、 C H 2 ドメインに突然変異 S 2 3 9 D / K 3 2 6 E / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E / S 2 9 8 A を伴うホモ二量体 F c と比べて強調される。野生型 I g G 1 F c と比べて、この変種は、 I I I a 受容体への増加した結合を示すが、 I I a および I I b 受容体にも野生型 F c よりわずかに強く結合する。これらの突然変異の非対称的な方法による導入 A : S 2 3 9 D / K 3 2 6 E / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E および B : S 2 9 8 A は、 I I I a 結合を低減しながら、 I I a / I I b 受容体結合も増加し、その過程において選択性がゆるまる。このヘテロ二量体変種への非対称 E 2 6 9 K 突然変異を導入する、すなわち、 A : S 2 3 9 D / K 3 2 6 E / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E / E 2 6 9 K および B : S 2 9 8 A により、 I I a / I I b 結合を低減して、野生型レベルに戻すことができる。このことは、 F c の C H 2 ドメインにおける非対称突然変異の使用が、改善された F c ガンマ R 選択性を設計する有意な機会をもたらし得るという事実を強調している。

【 0 2 8 9 】

実施例に用いられる試薬は、市販されている、または市販の器機、方法を使用して調製され得る、または当該技術に既知の試薬であり得る。前述の実施例は、本発明の多様な態様および本発明の方法の実施を例示する。実施例は、本発明の多くの実施形態の網羅的な記載を提供することを意図しない。したがって、前述の発明は、理解を明確にする目的で

10

20

30

40

50

例示および例により幾らか詳細に記載されてきたが、当業者は、多くの変更および修正を、添付の特許請求の範囲の精神および範囲を逸脱することなく実施できることを容易に理解する。

【0290】

実施例9：S P R により決定されるF c R n 結合

F c R nへの結合は、2つの異なる方向においてS P R により決定した。

1. 固定化されたF c R nに対するヘテロ二量体変種の流れ：この実験では、高密度表面のおよそ5000R Uを、標準的なN H S / E D C カップリングの使用により作製した。

10 100nMのW T および各変種を、M E S pH 6 处理緩衝液により600秒の解離で50uL分により120秒間、三重に注入した。

2. 間接的に捕捉されたヘテロ二量体変種に対するF c R nの流れ：このS P R 実験において、ヤギ抗ヒトI g G 表面を使用して、抗体を間接的に捕捉し（それぞれ、およそ400R U）、続いて3倍のF c R n 希釀系列を注入した（高濃度の6000nM）。処理緩衝液は、10mMのM E S / 150mMのN a C l / 3.4mMのE D T A / 0.05のT w e e n 2 0、p H 6 であった。ヤギポリクローナル表面へのF c R nの有意な結合はなかった。全ての変種は、W T センサグラムと類似したものを示す。下記に表8は、流動F c R n (2) による間接的固定化により決定されたK d を示す。

【表11】

Kd[M] - pH6.0	Kd[M] - pH7.5	突然変異（鎖A）	突然変異（鎖B）
3.7E-06	-	Herceptin WT	
4. E-06	-	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
5. E-06	-	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
4.3E-06	-	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392M_T394W
4.1E-06	-	Y349C_T350V_F405A_Y407V	T350V_S354C_T366L_K392M_T394W
5. E-06	-	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W
3.9E-06	-	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W

10

20

30

【0291】

実施例10：例示的なヘテロ多量体の調製

1つの單ードメイン抗原結合構築物を含む以下のヘテロ多量体を調製した。

1. v 1 3 2 3 、一価抗E G F R 抗体（E G 2）であり、E G F R 結合ドメインは、鎖Aにおけるラクダ科動物V_hHであり、F c 領域は、鎖Aに突然変異T 3 5 0 V_L 3 5 1 Y_F 4 0 5 A_Y 4 0 7 V、および鎖BにT 3 5 0 V_T 3 6 6 L_K 3 9 2 L_T 3 9 4 Wを有するヘテロ二量体である。

この構築物を以下のように調製し、発現させた。

【0292】

抗体重鎖およびF c 領域をコードする遺伝子は、ヒト／哺乳類発現に最適化されたコドンを使用する遺伝子合成を介して構築した。抗E G F R s d A b をコードするs d A b 配列は、既知のE G F R 結合抗体E G 2から生成した（Bell et al. (2010) D i f f e r e n t i a l tumor - target i n g a b i l i t i e s o f t h r e e s i n g l e - domain a n t i b o d y f o r m a t s . C a n c e r L e t t e r s 2 8 9 : 8 1 ）。

40

【0293】

最終遺伝子産物を、哺乳類発現ベクターp T T 5 (N R C - B R I , C a n a d a) にサブクローンし、C H O 細胞において発現させた（D u r o c h e r , Y. , P e r r e t , S. & K a m e n , A. H i g h - l e v e l a n d h i g h - t h r o u g h p u t r e c o m b i n a n t p r o t e i n p r o d u c t i o n b y t

50

transient transfection of suspension-growing CHO cells. Nucleic acids research 30, E9 (2002)).

【0294】

CHO細胞を水性1mg/mLの25kDaポリエチレンイミン(PEI、Poly sciences)により、2.5:1のPEI:DNA比で対数増殖期(1.5~2百万細胞/mL)に形質移入した。(Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011))。DNAを、ヘテロ二量体形成を可能にする鎖A(CHA)と鎖B(CHB)の最適なDNA比(例えば、CHA/CHB比=50:50)で形質移入した形質移入された細胞を、5~6日後に培養培地から採取し、4000rpmで遠心分離して収集し、0.45μmフィルターの使用により清澄化した。

【0295】

実施例11：例示的なヘテロ多量体の精製および特徴決定

実施例1に記載されたヘテロ多量体を、下記に記載されたようにプロテインAクロマトグラフィーにより発現させ、精製した。

【0296】

プロテインA精製

20

清澄化された培養培地をMab Select Sure(GE Healthcare)プロテインAカラムに装填し、10カラム容量のPBS緩衝液によりpH7.2で洗浄した。抗体を10カラム容量のクエン酸緩衝液によりpH3.6で溶出し、プールした画分は、TRISによりpH11で中和された抗体を含有した。

【0297】

プロテインA精製後のヘテロ二量体純度のUPLC-SEC分析

v1323の純度は、下記に記載されている標準的条件下でUPLC-SECを使用して決定した。

カラム: Waters BEH 200 SEC、1.7μmの粒子、4.6×150mm

溶媒: 25mMのNaPO4、150mMのNaCl、pH7.00@23.4、20

30

.00mS/cm@23.4

流速: 0.4ml/分、約4280psi

温度: 30

試料: v1323 120607-KB

3回の注入(注入1回あたり約2μg)

【0298】

図41および42は、プロテインA精製後の例示的なヘテロ多量体のSDS-PAGEおよびUPLC-SEC分析の結果をそれぞれ描写している。図41は、プロテインA精製後の相対純度を例示し、V1323が、検出可能な汚染種を含有しなかったこと、およびSECによる追加の精製を必要としなかったことを示す。図42は、例えば、1323がプロテインA精製後に>97%のヘテロ二量体純度であることを例示して、図41の観察を支持するUPLC-SEC分析を含有する。

40

表9は、V1323の精製手順および収量のまとめを提供する。

【表12】

表9 V1323の収量および精製プロセス

変種	精製	濃度 mg/ml	合計
			50mlあたりのmg
1323	プロテインA	1.3	1.95 (1.5 ml)

【0299】

50

実施例 12：ヘテロ多量体は E G F R - E D 結合ドメイン特性を維持する

E G F R の細胞外ドメイン (E D) に結合する E G F R 結合ドメインを含む v 1 3 2 3 の能力を、 B I O - R A D からの P r o t e O n X P R 3 6 システムの使用により表面プラズモン共鳴 (S P R) により試験した。

【 0 3 0 0 】

およそ 3 0 0 0 R U の抗ヒト I g G 2 5 μ g / m l を、標準的なアミンカップリングの使用により G L C チップに固定化した。例示的な S D A C を、およそ 7 0 0 R U の捕捉レベルで抗ヒト I g G 固定化チップに捕捉した。組み換えヒト E G F R - E D を、処理緩衝液で希釈し、 5 0 μ l / 分の流速で 2 分間注入し、続いて更に 4 分間解離させた。センサグラムを、 1 : 1 のラングミュア結合モデルに包括的に当て嵌めた。全ての実験は室温で実施した。

【 0 3 0 1 】

v 1 3 2 3 の S P R 曲線を図 4 3 に示す。結果は、 v 1 3 2 3 が、 3 ~ 4 . 5 n M の低いナノモル範囲で高い親和性により E G F R - E D に結合することを示す。

【 0 3 0 2 】

実施例 13：A 5 4 9 、 B x P c 3 、および U 8 7 細胞に結合する V 1 3 2 3 の能力

細胞の表面に発現させた E G F R に結合する v 1 3 2 3 の能力は、下記に記載される蛍光細胞結合アッセイにより A 5 4 9 、 B x P c 3 、および U 8 7 細胞を使用して試験した。

【 0 3 0 3 】

例示的な二重特異的 S D A C の、 A 5 4 9 、 B x P c 3 、および U 8 7 細胞の表面への結合は、フローサイトメトリーにより決定した。細胞を P B S で洗浄し、 D M E M に 1 × 1 0 5 細胞 / 1 0 0 μ l で懸濁した。 1 0 0 μ l の細胞懸濁液を、それぞれのマイクロ遠心分離管に加え、続いて 1 0 μ l / 管の抗体変種を加えた。管を回転機により 4 で 2 時間インキュベートした。マイクロ遠心分離管を 2 0 0 0 R P M により室温で 2 分間遠心分離し、細胞ペレットを 5 0 0 μ l の培地で洗浄した。それぞれの細胞ペレットを、培地で 2 μ g / 試料に希釈された 1 0 0 μ l の蛍光標識二次抗体に再懸濁した。次に試料を回転機により 4 で 1 時間インキュベートした。インキュベートした後、細胞を 2 0 0 0 R P M により 2 分間遠心分離し、培地で洗浄した。細胞を 5 0 0 μ l の培地に再懸濁し、 5 μ l のヨウ化プロピジウム (P I) を含有する管で濾過し、製造会社の使用説明書に従って B D L S R I I フローサイトメーターにより分析した。

【 0 3 0 4 】

この実験の結果は、 v 1 3 2 3 が、試験した細胞に結合できることを示した (データ示されず) 。

【 0 3 0 5 】

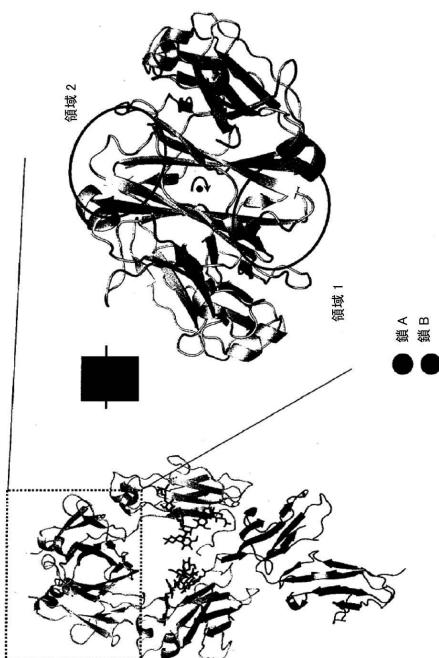
本明細書に記述された全ての公報、特許、および特許出願は、まるでそれぞれ個別の公報、特許、および特許出願が特定的および個別に参照として組み込まれるように示されているかのように、同じ程度で、参照として本明細書に組み込まれる。

10

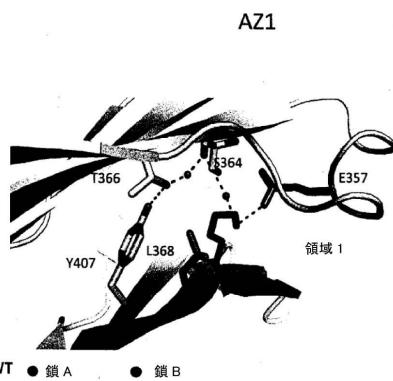
20

30

【図1】

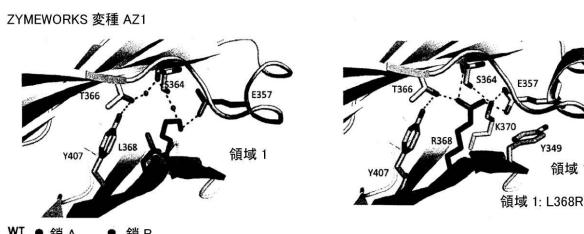


【図2】



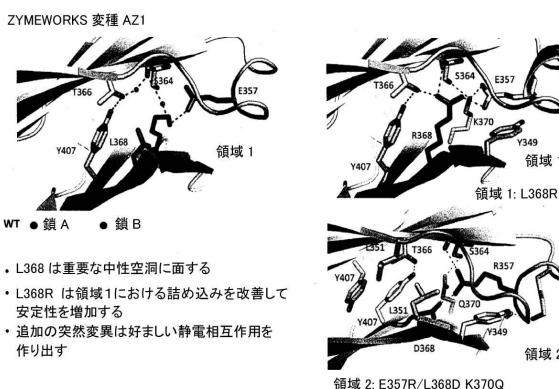
- L368 は重要な中性空洞に面する

【図3】



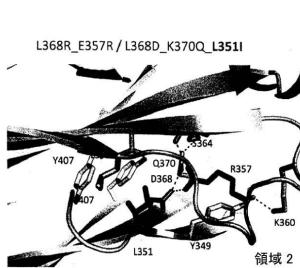
- L368 は重要な中性空洞に面する
- L368R は領域 1における詰め込みを改善して安定性を増加する

【図4】



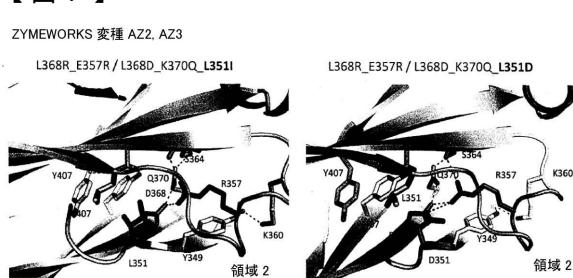
- L368 は重要な中性空洞に面する
- L368R は領域 1における詰め込みを改善して安定性を増加する
- 追加の突然変異は好ましい静電相互作用を作り出す

【図6】



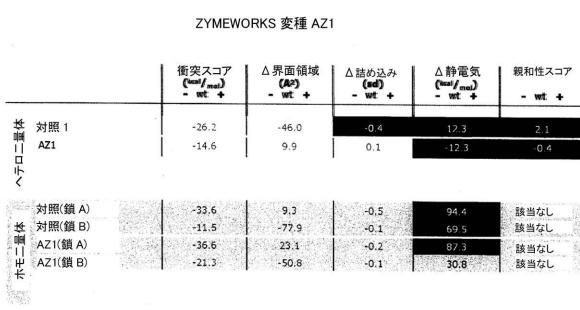
ZYMEWORKS 変種 AZ2, AZ3

【図7】



- AZ1 に構築された変種 AZ2 および 3
- L351I (AZ2) は詰め込みの改善により設計され、ヘテロ二量体形成に好ましい
- L351D (AZ3) は静電相互作用の改善により設計され、ヘテロ二量体形成に好ましい

【図5】



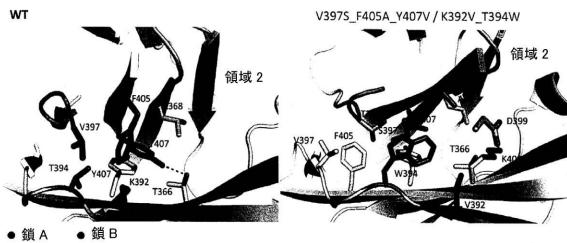
【図8】

	衝突スコア (wt/wt) - wt +	△界面領域 (ΔP) - wt +	△詰め込み (ed) - wt +	△静電気 (wt/wt) - wt +	親和性スコア - wt +
ヘテロ二量体 対照	-26.2	-46.0	-0.4	12.3	2.1
AZ1	-14.6	9.9	0.1	-12.3	-0.4
AZ2	-3.1	0.7	0.0	-17.2	-0.4
AZ3	-12.1	-16.1	0.1	-6.4	-0.4
ヘテロ二量体 対照(鎖A)	-33.6	9.3	-0.5	94.4	該当なし
対照(鎖B)	-11.5	-77.9	-0.1	69.5	該当なし
AZ1(鎖A)	-36.6	23.1	-0.2	87.3	該当なし
AZ1(鎖B)	-21.3	-50.8	-0.1	30.8	該当なし
AZ2(鎖B)	76.4	-123.5	-0.3	52.2	該当なし
AZ3(鎖B)	-16.8	-80.2	-0.4	60.6	該当なし

緑色 好ましい
赤色 好ましくない

【図9】

ZYMEWORKS 変種 AZ4



- T394W はヘテロ二量体形成を導くため界面コアにおいて消極的に設計される
- 周囲の突然変異は、詰め込みを最適化するため、および安定性を救出するために設計される

【図10】

ZYMEWORKS 変種 AZ4

	衝突スコア (wt/wt) - wt +	△界面領域 (ΔP) - wt +	△詰め込み (ed) - wt +	△静電気 (wt/wt) - wt +	親和性スコア - wt +
ヘテロ二量体 対照 2	-10.8	8.4	-0.1	8.1	0.7
AZ4	-3.5	-31.1	0.2	3.0	-0.7
対照 2(鎖 A)	154.2	-4.7	N/A	15.6	該当なし
対照 2(鎖 B)	8.3	-71.7	-0.3	-2.3	該当なし
AZ4(鎖 A)	553.6	1.1	N/A	32.1	該当なし
AZ4(鎖 B)	5.6	-115.5	-0.5	6.9	該当なし

緑色 好ましい
赤色 好ましくない

【図11】



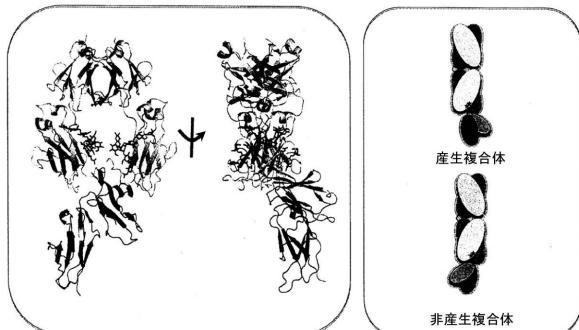
【図12】

ZYMEWORKS 変種 AZ4, AZ5, AZ6

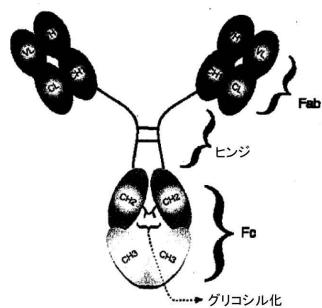
	衝突スコア (wt/wt) - wt +	△界面領域 (ΔP) - wt +	△詰め込み (ed) - wt +	△静電気 (wt/wt) - wt +	親和性スコア - wt +
ヘテロ二量体 対照 2	-10.8	8.4	-0.1	8.1	0.7
AZ4	-3.5	-31.1	0.2	3.0	-0.7
AZ5	-5.1	-25.1	0.2	-5.5	-0.8
AZ6	-13.8	-32.5	0.0	-11.7	-0.3
対照 2(鎖 A)	154.2	-4.7	N/A	15.6	該当なし
対照 2(鎖 B)	8.3	-71.7	-0.3	-2.3	該当なし
AZ4(鎖 A)	553.6	1.1	N/A	32.1	該当なし
AZ4(鎖 B)	5.6	-115.5	-0.5	6.9	該当なし
AZ5(鎖 A)	274.9	-44.3	N/A	35.5	該当なし
AZ6(鎖 B)	25.2	100.9	0.3	-16.1	該当なし

緑色 好ましい
赤色 好ましくない

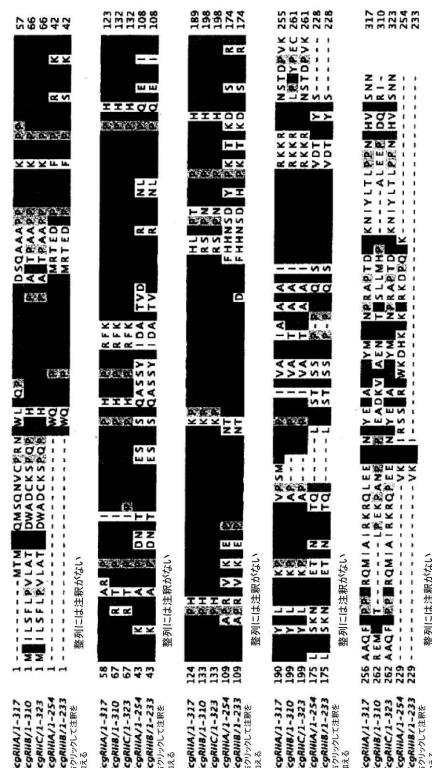
【図13】



【図14】



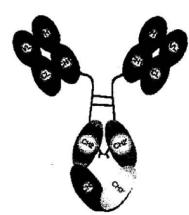
【図15】



【図16】



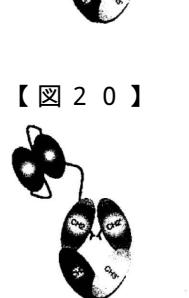
【図18】



【図17】



3

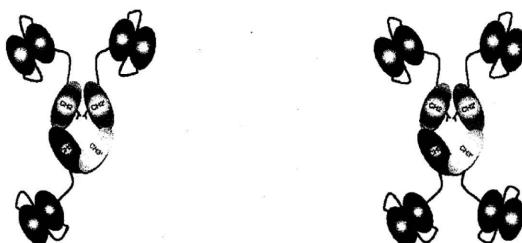


A diagram of a double helix structure, likely DNA, showing two strands of nucleotides twisted together. The strands are represented by black ovals with white symbols inside, forming a twisted ladder-like shape.

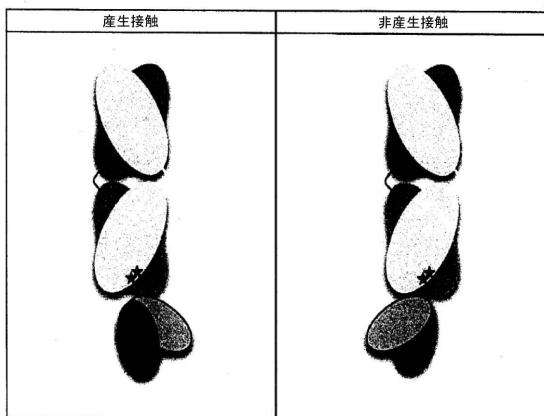
A black and white line drawing of a human respiratory system. It features a central trachea (windpipe) with a T-shaped valve. Two large, dark, irregular shapes representing lungs are attached to the trachea. Each lung is divided into several smaller, lighter-colored lobes. The entire diagram is rendered in a high-contrast, graphic style.

A diagram showing a pair of lungs with a trachea. The lungs are dark grey ovals with white spots representing air sacs. The trachea is a vertical line branching into the lungs.

【図21】



【図22】



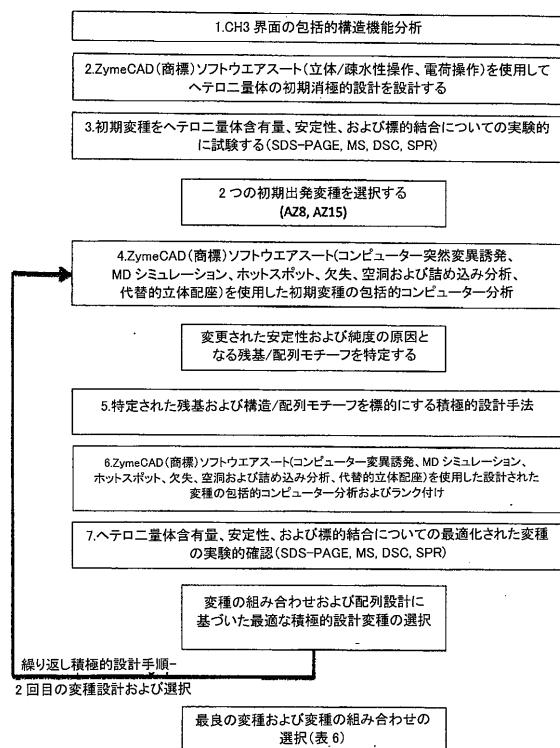
【図23】

親野生型重鎖 IgG1 配列

GGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGKFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

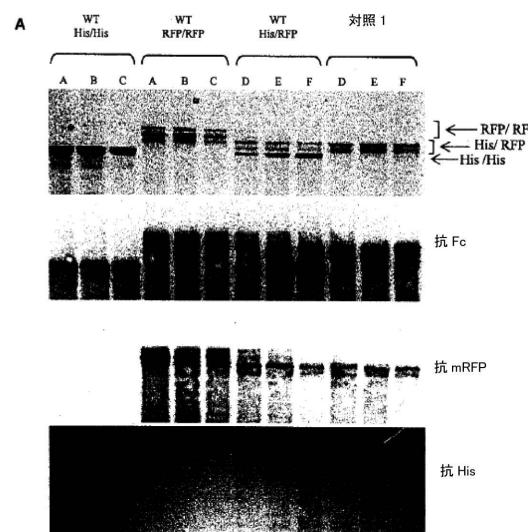
【図24】

ヘテロ二量体Fc設計の繰り返し戦略



【図25-1】

図25A ヘテロ二量体の純度を決定する非還元的 SDS-PAGE アッセイ



【図 25-2】

図25B ヘテロ二量体の純度を決定する非還元的 SDS-PAGE アッセイ

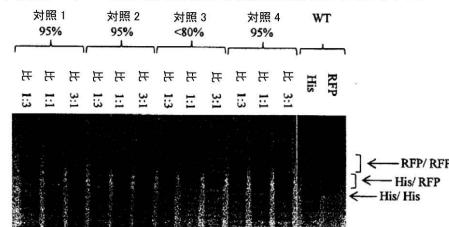
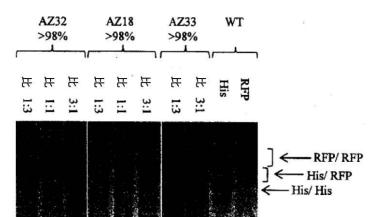
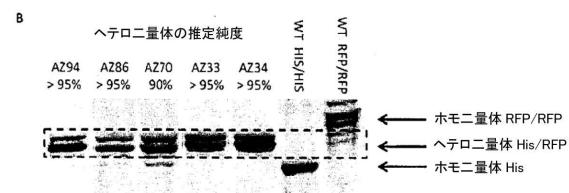
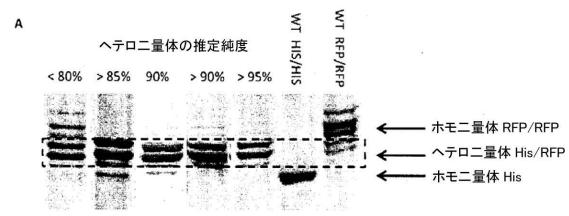


図25C ヘテロ二量体の純度を決定する非還元的 SDS-PAGE アッセイ



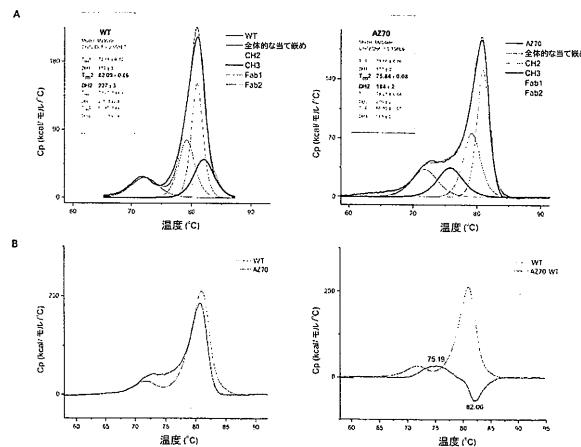
【図 26】

非還元的 SDS-PAGE を使用したプロテインA精製後のヘテロ二量体の純度の決定



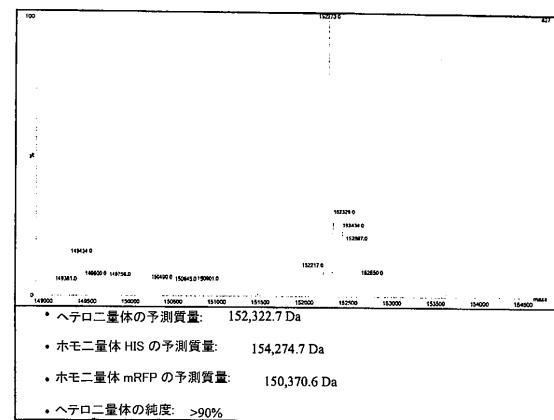
【図 27】

Tmを決定する試料 DSC データ分析:



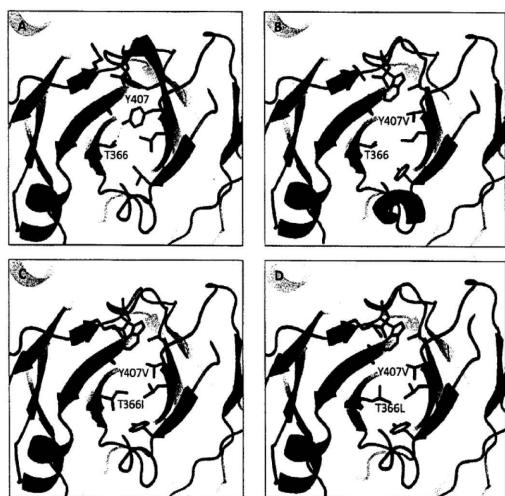
【図 28】

ヘテロ二量体の純度を決定する LC/MS データ分析



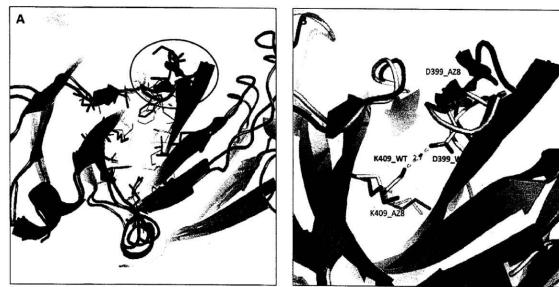
【図29】

初期の消極的设计の変種および独立した積極的設計の最適化:足場 1-疎水性コアのコンピューター分析



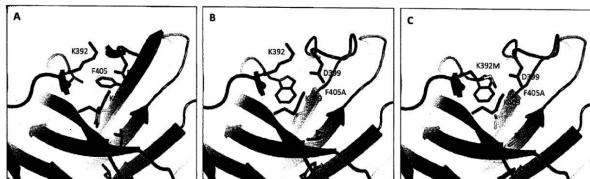
【図30】

初期の消極的设计の変種および独立した積極的設計の最適化:足場 1-399-400 ループの立体配座の安定化のコンピューター分析

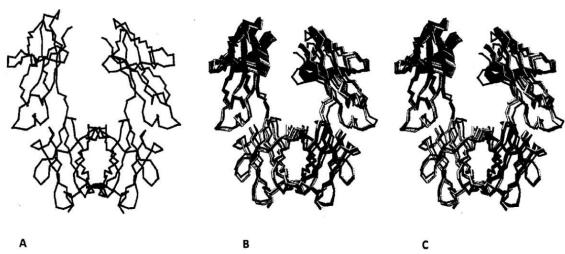


【図31】

初期の消極的设计の変種および独立した積極的設計の最適化:足場 1-399-400 ループの立体配座の安定化のコンピューター分析

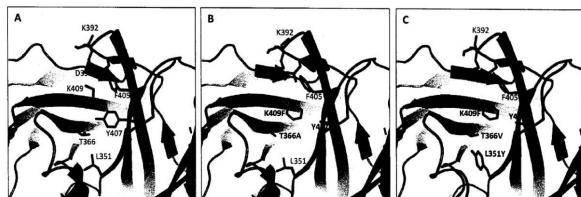


【図32】

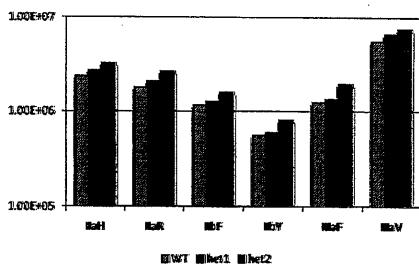


【図33】

初期の消極的设计の変種および独立した積極的設計の最適化:足場 2-疎水性詰め込みのコンピューター分析

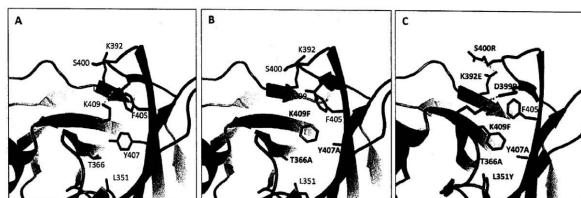


【図35】



【図34】

初期の消極的设计の変種および独立した積極的設計の最適化:足場 2-399-400 ループの立体配座の安定化のコンピューター分析



【図36】

図36A

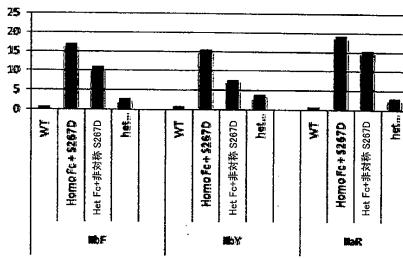


図36B

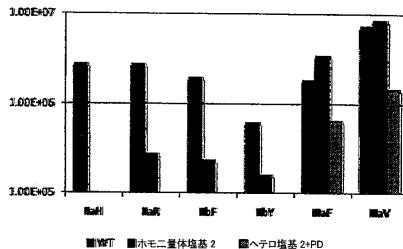
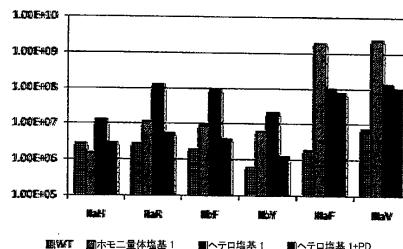


図36C



【図37-2】

【図37-1】

表6

更張	F=標準 A	F=標準 B
A213	L351* F405A, Y407V	T366L, K392L, T394W
A214	L347* T350V, L351V, F405A, Y407V	T350V, K392E, T366L, K392M, T304W, Y413R
A215	L351, F405A, Y407I	T366L, K392L, T394W
A216	L351, F405A, Y407I	T366L, K392M, T394W
A217	L351, F405A, Y407I	T366L, K392L, T394W
A218	L351, F405A, Y407V	T366L, K392M, T394W
A219	L351, F405A, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2140	L351, F405A, Y407V	T366L, K392L, T394W
A2141	L351, F405S, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2142	L351, F405S, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2143	L351, F405S, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2144	L351, F405S, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2145	L351, F405S, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2146	L351, F405S, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2147	L351, F405T, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2148	L351, F405T, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2149	L351, F405T, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2150	L351, F405T, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2151	L351, F405T, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2152	L351, F405T, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2153	L351, F405V, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2154	L351, F405V, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2155	L351, F405V, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2156	L351, F405V, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2157	L351, F405V, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2158	L351, F405V, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2159	L351V, F405A, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2160	L351V, F405A, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2161	L351V, F405S, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2162	L351V, F405S, Y407V	T366L, K392L, T394W
A2163	L351V, F405A, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2164	L351V, F405A, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2165	L351V, F405S, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2166	L351V, F405S, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2167	L351V, F405S, Y407I	T366L, K392F, T394W
A2168	L351V, F405S, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2169	L351V, F405S, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2170	L351V, F405S, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2171	L351V, F405T, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2172	L351V, F405T, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2173	L351V, F405T, Y407I	T366L, K392F, T394W
A2174	L351V, F405T, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2175	L351V, F405T, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2176	L351V, F405T, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2177	L351V, F405V, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2178	L351V, F405V, Y407I	T366L, K392M, T394W
A2179	L351V, F405V, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2180	L351V, F405V, Y407V	T366L, K392L, T394W
A2181	L351V, F405V, Y407V	T366L, K392M, T394W
A2182	L351V, F405V, Y407V	T366L, K392F, T394W
A2183	L351V, F405A, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2184	L347E, L351V, F405A, Y407I	T366L, K392L, T394W
A2185	L347E, L351V, F405A, Y407I	T366L, K392F, T394W
A2186	L347E, L351V, F405A, Y407V	T366L, K392L, T394W

【図37-3】

【図 3.7 - 4】

A203	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A204	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A205	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A206	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A207	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A208	Q3474	L351Y	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A209	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A210	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A211	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A212	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A213	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A214	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A215	Q3474	L351Y	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A216	Q3474	L351Y	F405V	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A217	Q3474	L351Y	F405V	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A218	Q3474	L351Y	F405V	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A219	Q3474	L351Y	F405V	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A220	Q3474	L351Y	F405V	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A221	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A222	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A223	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A224	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A225	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A226	Q3474	L351Y	F405V	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A227	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A228	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A229	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A230	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A231	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A232	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A233	Q3474	L351L	F405A	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A234	Q3474	L351L	F405A	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A235	Q3474	L351L	F405A	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A236	Q3474	L351L	F405A	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A237	Q3474	L351L	F405A	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A238	Q3474	L351L	F405A	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A239	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A240	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A241	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A242	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A243	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A244	Q3474	L351L	F405S	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A245	Q3474	L351L	F405S	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A246	Q3474	L351L	F405S	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A247	Q3474	L351L	F405S	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A248	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A249	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A250	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A251	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A252	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A253	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A254	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392L	T394W
A255	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392F	T394W
A256	Q3474	L351L	F405T	Y407I	K3600	T366L	K392M	T394W
A257	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W
A258	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392M	T394W
A259	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392F	T394W
A260	Q3474	L351L	F405T	Y407V	K3600	T366L	K392L	T394W

【図37-5】

【図37-6】

【図37-7】

【図37-8】

【 図 3 7 - 9 】

〔四三七 - 10〕

【図 3.7 - 1.1】

【图37-12】

【 図 3 7 - 1 3 】

【図3.7-14】

A2853	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2854	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2855	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2856	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2857	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411T
A2858	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2859	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2900	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2901	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392A_E394W_T411N
A2902	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392A_E394W_T411S
A2903	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392B_E394W_T411S
A2904	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411T
A2905	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411S
A2906	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411T
A2907	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2908	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2909	L3511_S4004_F4054_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2910	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2911	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2912	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T412N
A2913	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T412S
A2914	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T412S
A2915	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T412T
A2916	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2917	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2918	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2919	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2920	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2921	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411N
A2922	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2923	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411T
A2924	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411N
A2925	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411S
A2926	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411T
A2927	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2928	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2929	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2930	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2931	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411N
A2932	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411S
A2933	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392M_E394W_T411T
A2934	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411N
A2935	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411S
A2936	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392L_E394W_T411T
A2937	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411S
A2938	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411T
A2939	L3511_S4004_F4055_V407V	T3651_N3900_C392P_E394W_T411S

【図3.7-15】

【図37-16】

【図37-17】

【図 3.7 - 1.8】

【図37-19】

【图 37-20】

【図37-21】

【図37-22】

【図37-23】

【図37-24】

【図37-25】

【図37-26】

【図37-27】

【図37-28】

【図37-29】

【図37-30】

【図37-31】

【図37-32】

【図37-33】

A21985	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411S
A21986	L351Y	440KE	F405T	440V7	T3562	N390K	K329F	T394W	T411N
A21987	L351Y	440KE	F405T	440V7	T3563	N390K	K329F	T394W	T411L
A21988	L351Y	440KE	F405T	440V7	T3565	N390K	K329F	T394W	T411S
A21989	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411N
A21990	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3567	N390K	K329L	T394W	T411L
A21991	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3568	N390K	K329L	T394W	T411N
A21992	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3569	N390K	K329L	T394W	T411N
A21993	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411L
A21994	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3560	N390K	K329M	T394W	T411S
A21995	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329F	T394W	T411N
A21996	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3562	N390K	K329F	T394W	T411L
A21997	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3563	N390K	K329F	T394W	T411N
A21998	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329F	T394W	T411S
A21999	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411L
A22000	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329L	T394W	T411N
A22001	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411N
A22002	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411L
A22003	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411S
A22004	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3560	N390K	K329M	T394W	T411L
A22005	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329P	T394W	T411L
A22006	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329P	T394W	T411S
A22007	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411N
A22008	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411L
A22009	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329L	T394W	T411N
A22010	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411L
A22011	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3560	N390K	K329L	T394W	T411N
A22012	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329M	T394W	T411S
A22013	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411N
A22014	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411L
A22015	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411S
A22016	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329P	T394W	T411L
A22017	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329L	T394W	T411S
A22018	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329L	T394W	T411L
A22019	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411N
A22020	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411L
A22021	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329M	T394W	T411S
A22022	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329P	T394W	T411L
A22023	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411N
A22024	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329P	T394W	T411S
A22025	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411L
A22026	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411N
A22027	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329L	T394W	T411S
A22028	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411N
A22029	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411L
A22030	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411S
A22031	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329M	T394W	T411L
A22032	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3565	N390K	K329P	T394W	T411S
A22033	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329P	T394W	T411L
A22034	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329P	T394W	T411N
A22035	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411S
A22036	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329L	T394W	T411S
A22037	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411N
A22038	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3566	N390K	K329M	T394W	T411L
A22039	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329M	T394W	T411S
A22040	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329P	T394W	T411S
A22041	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3561	N390K	K329P	T394W	T411N
A22042	L351Y	440KE	F405V	440V7	T3564	N390K	K329P	T394W	T411S

【図37-34】

【図37-35】

【図37-36】

【図37-37】

【図37-38】

【図37-39】

【図37-40】

【 3 8 - 1 】

变通	F ₀ 突然变质带 A	F ₀ 突然变质带 B
A22439	T366Y_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407A
A22440	T366Y_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y406R_Y407A
A22441	T366I_K409F	L351Y_Y407I
A22442	T366I_K409F	L351Y_Y407I
A22443	T366I_K409F	L351Y_Y407V
A22444	T366M_K394S_K409F	L351Y_Y407A
A22445	T366M_K409F	L351Y_Y407I
A22446	T366M_K409F	L351Y_Y407V
A22447	T366V_K409F	L351Y_Y407A
A22448	T366V_K409F	L351Y_Y407I
A22449	T366V_K409F	L351Y_Y407V
A22450	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
A22451	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407I
A22452	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
A22453	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
A22454	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
A22455	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407A
A22456	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407I
A22457	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407L
A22458	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407M
A22459	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407V
A22460	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405E_Y407A
A22461	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405E_Y407I
A22462	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405E_Y407V
A22463	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405E_Y407M
A22464	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405E_Y407L
A22465	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407A
A22466	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407I
A22467	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407V
A22468	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407M
A22469	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407L
A22470	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407M
A22471	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407A
A22472	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407I
A22473	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407M
A22474	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407L
A22475	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407V
A22476	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405E_Y407A
A22477	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405E_Y407I
A22478	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405E_Y407V
A22479	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405E_Y407M
A22480	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
A22481	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405L_Y407I
A22482	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
A22483	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405L_Y407M
A22484	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405L_Y407L
A22485	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405M_Y407A
A22486	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405M_Y407I
A22487	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405M_Y407L
A22488	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405M_Y407M
A22489	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405M_Y407V
A22490	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405E_Y407A
A22491	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405E_Y407I
A22492	T366M_K394S_K409W	L351Y_F405E_Y407L

【 図 3 8 - 2 】

A22493	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407W
A22494	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407V
A22495	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407A
A22496	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407R
A22497	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407L
A22498	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407M
A22499	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407V
A22500	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407A
A22501	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407I
A22502	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407L
A22503	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407M
A22504	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22505	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407A
A22506	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407I
A22507	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407L
A22508	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407M
A22509	T3464M, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407V
A22510	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407A
A22511	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407I
A22512	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407L
A22513	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407M
A22514	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407V
A22515	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407A
A22516	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407I
A22517	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22518	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407M
A22519	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22520	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22521	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22522	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407A
A22523	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407L
A22524	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407M
A22525	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407V
A22526	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407W
A22527	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407I
A22528	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407M
A22529	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405L, Y407V
A22530	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407A
A22531	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407I
A22532	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22533	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407W
A22534	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407A
A22535	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407M
A22536	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407V
A22537	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405M, Y407W
A22538	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407A
A22539	T3466V, T3945, K409W	T351V, F405F, Y407L
A22540	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399C, Y407A
A22541	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399C, Y407I
A22542	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399C, Y407V
A22543	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399C, Y407W
A22544	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399F, Y407A
A22545	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399F, Y407I
A22546	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399F, Y407L
A22547	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399F, Y407M
A22548	T3466L, K392C, K409F, T411I	T351V, D399F, Y407V
A22549	T3466L, K392L, K409F, T411I	T351V, D399L, Y407A
A22550	T3466L, K392L, K409F, T411I	T351V, D399L, Y407I

【図38-3】

【 図 3 8 - 4 】

【 図 3 8 - 5 】

【図38-6】

【図38-7】

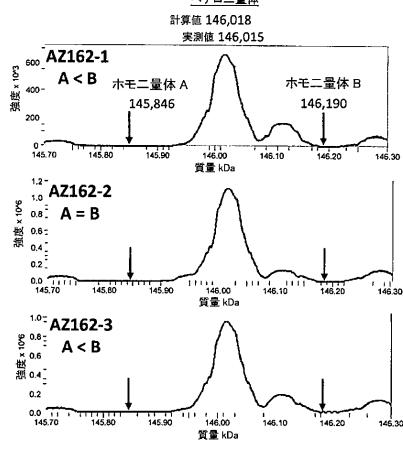
【図38-8】

【図38-9】

A22899	T366Y_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
A22900	T366Y_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
A22901	T366Y_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
A22902	T366Y_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
A22903	T366Y_N390K_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
A22904	T366Y_N390K_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
A22905	T366Y_N390K_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
A22906	T366Y_N390K_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
A22907	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
A22908	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
A22909	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
A22910	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
A22911	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
A22912	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
A22913	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
A22914	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
A22915	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
A22916	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
A22917	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
A22918	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
A22919	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
A22920	T366Y_N390K_N391L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
A22921	T366Y_N390K_N391L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
A22922	T366Y_N390K_N391L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
A22923	T366Y_N390K_N391L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
A22924	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
A22925	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
A22926	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
A22927	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
A22928	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
A22929	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
A22930	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
A22931	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
A22932	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
A22933	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
A22934	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
A22935	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
A22936	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
A22937	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
A22938	T366Y_N390K_N392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
A22939	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
A22940	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
A22941	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
A22942	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
A22943	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
A22944	T366Y_N390K_N392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V

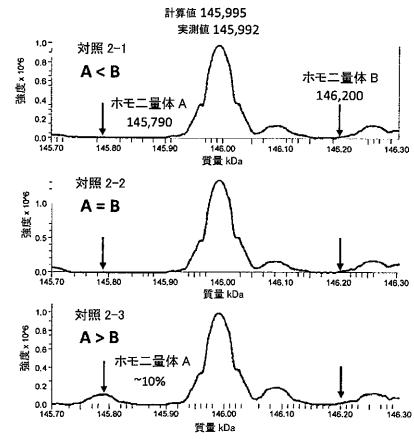
【図39-1】

図39A



【図39-2】

図39B



【図40-1】

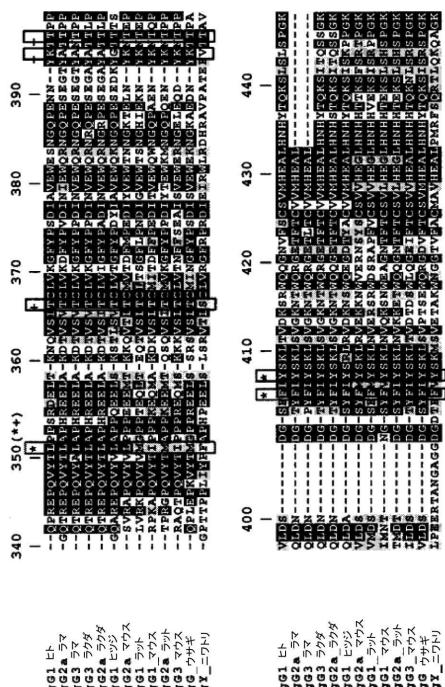
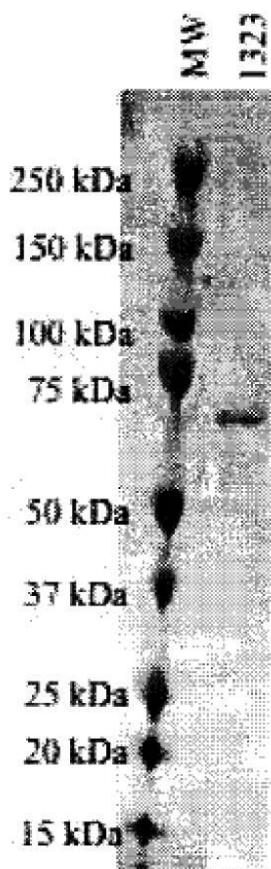


図40-A
足場 1 配列の整列

【 図 4 1 】



【図40-2】

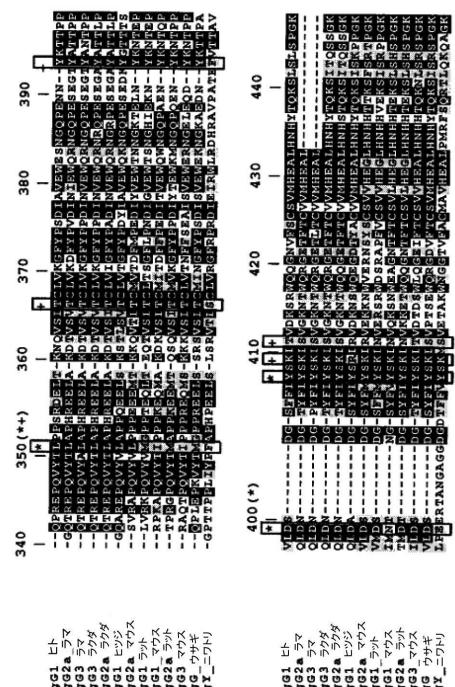
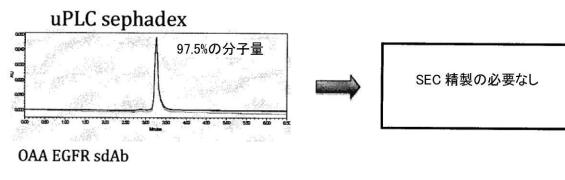


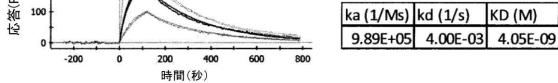
図40-B 足場2配列の整列

【 図 4 2 】



(図 4 3)

200



【図4-4】

QVKLEESGGGLVQAGDSLRVCAASGRDFSDYVMGWFRQAPGKEREVFVAASIRNG
LTTRYADSVKGRFTISRDNDKNMVLYQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPRSREY
DYWGQGTQTVSS

【配列表】

0006351572000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/13
			C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シュブレター フォン クロイデンシュタイン、トーマス

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、バンクーバー、ハーヴィッド ストリート 1007
- 1330

(72)発明者 エスコバル - カブレラ、エリック

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、ウッドリッジ ブレイス 8562

(72)発明者 ング、ゴードン イウ コン

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、バンクーバー、ウエスト シックスティーフォース
アヴェニュー 1535

(72)発明者 ディキシット、スルジット ビーマラオ

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、リッチモンド、キングフィッシャー ドライブ 116
51、51

(72)発明者 ラリオ、ポーラ イレーネ

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、バンクーバー、イースト ケント アヴェニュー
サウス 201-2080

(72)発明者 ブーン、デイヴィット カイ ユエン

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、リッチモンド、レイルウェイ アヴェニュー 9320

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 国際公開第2011/131746 (WO, A1)

国際公開第2011/063348 (WO, A1)

特表2011-508604 (JP, A)

特表2011-504742 (JP, A)

国際公開第2012/058768 (WO, A1)

Cancer Letters, 2010年, Vol.289, p.81-90

Nature Biotechnology, 1998年, Vol.16, p.677-681

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/46

C12N 15/13

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / WPI DS / BIOSIS (STN)