

## 明 細 書

発明の名称：

多量体 I g A 抗体の作製法及び多重特異性多量体 I g A 抗体

技術分野

[0001] 本発明は、多量体 I g A 抗体、好ましくは多重特異性多量体 I g A 抗体の作製法、及び多重特異性多量体 I g A 抗体に関する。

背景技術

[0002] 生体内において最も産生量の多い抗体である I g A 抗体はインフルエンザ等の粘膜組織を標的とした呼吸器感染症に対する生体防御の最前線防御因子として機能している。この分泌型 I g A 抗体 (S I g A) は二量体以上の多量体を形成しており、特に四量体 S I g A は、I g G や単量体 I g A より機能活性が高いことが明らかになっている。

[0003] 発明者らの以前の研究では、モノクローナル I g G 抗体の可変領域配列以外の定常領域を I g A のフレームに置き換えることにより、該モノクローナル抗体の抗原認識部位を保持しつつ I g A に変換した抗体を得、該抗体を人為的に分泌型化及び四量体化させたモノクローナル四量体 S I g A を作製する技術を開発した (特許文献 1)。しかしながら、この技術で作製した四量体 S I g A の持つ 8 つの F a b 領域は全て同一の可変領域を持っており、単一のエピトープに対する反応性しか有していない。

[0004] 現在、抗体に存在する複数の F a b にそれぞれ異なる可変領域を搭載した多重特異性抗体が実用化されている。多重特異性抗体は、抗体医薬だけでなく、研究用ツールや診断薬の開発など、さまざまな分野での応用が期待されている技術である。しかしながら、その製造方法は複雑であり、1 つの多重特異性抗体を作製するためには多大な労力を伴うことから、実用化されている多重特異性抗体の種類は限定的である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6564777号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、多量体IgA抗体、特に多重特異性多量体IgA抗体を簡便かつ効率よく製造する方法を提供することを目的とした。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意研究の結果、それぞれ別々の培養細胞で作製した二量体IgA抗体と単量体IgA抗体、及び分泌片（Secretory component、以下「SC」ともいう）を試験管内で混合することによって、簡便且つ効率よく二重特異性三量体及び四量体IgA抗体を製造できることを見出し、本発明を完成させた。さらに、分泌片を混合しない場合も、混合した場合より効率は落ちるが、同様に二重特異性三量体及び四量体IgA抗体を製造できることを見出した。本発明の技術は、二重特異性三量体及び四量体抗体だけでなく、単一特異性三量体及び四量体抗体、及び三重特異性以上の多重特異性三量体及び四量体抗体の製造にも適用できる。

[0008] すなわち、本発明は

[1] 二量体IgA抗体、及び単量体IgA抗体を混合することを含む、三量体及び四量体IgA抗体を製造するための方法、

[2] さらに分泌片を混合することを含む、[1]記載の方法、

[3] 前記二量体IgA抗体が第1の抗原結合部位を含み、前記単量体IgA抗体が第2の抗原結合部位を含む、少なくとも二重特異性の三量体及び四量体IgA抗体が製造される、[1]又は[2]記載の方法、

[4] 第3の抗原結合部位を含む別の単量体IgA抗体をさらに混合する、[3]記載の方法、

[5] 前記二量体IgA抗体の4つのFab領域がそれぞれ第1の抗原結合部位を含み、前記第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体の2つのFab領域がそれぞれ第2の抗原結合部位を含む、[3]記載の方法、

[6] 前記二量体IgA抗体の4つのFab領域がそれぞれ第1の抗原結合

部位を含み、前記第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体の2つのFab領域がそれぞれ第2の抗原結合部位を含み、前記別の単量体IgA抗体の2つのFab領域がそれぞれ第3の抗原結合部位を含む、[4]記載の方法、

[7] 前記分泌片が野生型SC又はSC変異体である、[2]～[6]のいずれか1項記載の方法、

[8] 分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質をさらに混合することを含む、請求項[1]～[7]のいずれか1項記載の方法、

[9] 前記二量体IgA抗体及び前記単量体IgA抗体がそれぞれ別々に培養細胞で作製された組換えIgA抗体である、[1]～[8]のいずれか1項記載の方法、

[10] 製造された三量体IgA抗体及び四量体IgA抗体を他のIgA抗体から分離することをさらに含む、[1]～[9]のいずれか1項記載の方法、

[11] 製造された三量体IgA抗体と四量体IgA抗体を分離することをさらに含む、[10]記載の方法。

[12] 第1の抗原結合部位を含む第1のFab領域、及び第2の抗原結合部位を含む第2のFab領域を含む、少なくとも二重特異性の三量体又は四量体IgA抗体、

[13] さらに分泌片を含む、[12]記載の抗体、

[14] 第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体1分子と、第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体1分子又は2分子との重合物である、[12]記載の抗体、

[15] 第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体1分子と、第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体1分子又は2分子と、分泌片との重合物である、[13]記載の抗体、

〔16〕 4つの第1のFab領域、及び少なくとも2つの第2のFab領域を含む、〔12〕～〔15〕のいずれか1項記載の抗体、

〔17〕 前記分泌片が野生型SC又はSC変異体である、〔13〕、〔15〕および〔16〕のいずれか1項記載の抗体、および

〔18〕 〔12〕～〔17〕のいずれか1項記載の抗体を含む医薬組成物を提供する。

### 発明の効果

〔0009〕 本発明の多量体IgA抗体は、1つの抗体分子の中に、1つの二量体IgA抗体に由来する4つのFab領域及び単量体IgA抗体に由来する2つ又は4つのFab領域を搭載することにより、一種類または二種類以上のFab領域を有することができる。したがって、本発明によれば、多量体IgA抗体、特に多重特異性多量体IgA抗体が得られる。本発明の多量体IgA抗体および多重特異性多量体IgA抗体は、各抗原に対する高い抗原結合性又は中和活性を有する。また、本発明の方法において二量体IgA抗体同士、単量体IgA抗体同士は重合することが出来ないことから、第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体及び第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体を用いる場合、本発明の方法により製造される三量体及び四量体IgA抗体は100%の確率で多重特異性抗体となる。本発明は、二量体IgA抗体、及び単量体IgA抗体の少なくとも2つのタンパク質をイン・ビトロで混合するだけという簡便な方法により、多量体抗体、特に多重特異性多量体抗体、特に多重特異性三量体及び四量体抗体、特に二重特異性三量体及び四量体抗体を作製するものであり、抗体を用いた研究用ツールやデリバリーツール、診断薬、医薬品の開発のプラットフォームとして有用である。本発明では、さらにSCを混合することにより、多量体抗体の製造効率が向上する。

### 図面の簡単な説明

〔0010〕 〔図1〕本願の二重特異性四量体IgA抗体の製造の一例を示す模式図である。

〔図2-1〕野生型SCのアミノ酸配列、及びSC12欠失変異体のアミノ酸配列

を示す。

[図2-2]野生型SCの塩基配列を示す。

[図2-3]SC12欠失変異体の塩基配列を示す。

[図3]SC12のIgA抗体多量体化促進能を示すグラフである。図中、「mA1+dA1+SC12」（実線で示される）は、単量体IgA1抗体と二量体IgA1抗体とSC12を混合した結果を示す。「mA1+SC12」は、単量体IgA1抗体とSC12を混合した結果を示す。「dA1+SC12」は、二量体IgA1抗体とSC12を混合した結果を示す。「Tri/Tet IgA」は、細胞内で作出した三量体及び四量体IgA1抗体（コントロール）を示す。

[図4]SC12とSC-wtのIgA抗体四量体形成促進能の比較を示すグラフである。図中、「mA1+mC-dA1+SC12」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、及びSC12を混合した結果を示す。「mA1+mC-dA1+SC-wt」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、及び野生型SCを混合した結果を示す。「mC-mA1+dA1+SC12」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、及びSC12を混合した結果を示す。「mC-mA1+dA1+SC-wt」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、及び野生型SCを混合した結果を示す。

[図5A]添加剤（Supple）の有無による、SC12存在下でのIgA抗体多量体形成効率を示すグラフである。図中、「mA1+mC-dA1+SC12」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、及びSC12を混合した結果を示す。「mA1+mC-dA1+SC12+Supple」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、SC12、及び添加剤を混合した結果を示す。「mC-mA1+dA1+SC12」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、及びSC12を混合した結果

を示す。「mC-mA1+dA1+SC12+Supple」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、SC12、及び添加剤を混合した結果を示す。

[図5B]添加剤(Supple)の有無による、野生型SC存在下でのIgA抗体多量体形成効率を示すグラフである。図中、「mA1+mC-dA1+SC-wt」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、及び野生型SCを混合した結果を示す。「mA1+mC-dA1+SC-wt+Supple」は、単量体IgA1抗体、蛍光標識mCherry融合型二量体IgA1抗体、野生型SC、及び添加剤を混合した結果を示す。「mC-mA1+dA1+SC-wt」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、及び野生型SCを混合した結果を示す。「mC-mA1+dA1+SC-wt+Supple」は、蛍光標識mCherry融合型単量体IgA1抗体、二量体IgA1抗体、野生型SC、及び添加剤を混合した結果を示す。

[図6]各添加剤によるIgA多量体形成促進効果を示すグラフである。

[図7]IgA抗体の定常領域の違い(IgA1及びIgA2m2)による多量体形成効率を示すグラフである。

[図8]反応時間の長さによる多量体形成効率の違いを示すグラフである。

[図9]異なる2種類の特異性を有した単量体及び二量体IgA抗体を用いて、SCの有無による三量体／四量体IgA抗体形成効率の違いを示すグラフである。図中、「Hetero」は異なる特異性を有する単量体IgA2m2(mA2)と二量体IgA1(dA1)の組み合わせを示し、「Homo」は同一の特異性を有するmA2とdA1の組み合わせを示す。

### 発明を実施するための形態

#### [0011] 1. 用語

本明細書において使用される用語は、特に定義されない限り、当該技術分野で一般に使用される意味を有する。

[0012] 「抗体」は、免疫グロブリン(Ig)と呼ばれるタンパク質であり、抗原

に特異的に結合する能力を有する。抗体は、Y字型に配置された2本の重鎖（H鎖）及び2本の軽鎖（L鎖）の計4本のポリペプチド鎖からなる基本単位を有し、1個以上の基本単位が集まって1つの抗体分子が形成される。該4本のポリペプチド鎖には、アミノ酸配列の変化が比較的少ない定常領域（重鎖の定常領域：CH1、CH2、CH3、及び軽鎖の定常領域：CL）、及びアミノ酸配列の変化が大きい可変領域（重鎖の可変領域：VH、及び軽鎖の可変領域：VL）が存在する。

- [0013] 「多量体」とは、上記の基本単位を2個以上含む抗体をいう。後述するように、本願の製造方法によって作製される抗体は、三量体及び四量体抗体である。したがって、本願明細書において使用される場合、「多量体」は、三量体又は四量体、又は三量体及び四量体の混合物を意味する。
- [0014] 「Fab領域」は、重鎖のVH及びCH1ドメインと軽鎖のVL及びCLドメインとからなる、抗原結合部位を含む領域である。
- [0015] 「多重特異性」とは、抗体が2つ以上の異なるエピトープ（抗原決定基）に特異的に結合することができることを意味する。「二重特異性」とは、抗体が2つの異なるエピトープに特異的に結合することができることを意味する。「三重特異性」とは、抗体が3つの異なるエピトープに特異的に結合することができることを意味する。同様に、四重特異性、五重特異性、六重特異性、七重特異性、及び八重特異性とは、抗体がそれぞれ4つ、5つ、6つ、7つ、及び8つの異なるエピトープに特異的に結合することができることを意味する。一般的に、多重特異性抗体は、各々が異なるエピトープに特異的な二種類以上の抗原結合部位（パラトープ）を含む。ここで、「異なるエピトープ」は、同じ抗原上の異なるエピトープであってもよく、または異なる抗原上のエピトープであってもよい。
- [0016] 「単一特異性」とは、抗体が同じ抗原の同じエピトープに結合する、1つ又は複数の抗原結合部位を有することを意味する。
- [0017] 「抗原結合部位」は、エピトープに結合する抗体分子上の領域を意味する。抗原結合部位は、重鎖のVH及び軽鎖のVLを含む。本明細書において、

第1の、第2の、第3の、及び第4の抗原結合部位とは、異なる抗原上のエピトープ又は同じ抗原上の異なるエピトープに結合する、それぞれ異なるアミノ酸配列からなる領域を意味する。

[0018] 「IgA」は、抗体（免疫グロブリン）のアイソタイプの1つである。本明細書においては、「IgA抗体」又は「IgA型抗体」ともいう。ヒトのIgAは、定常領域の違いによりIgA1とIgA2の2つのサブクラスに分類される。さらにIgA2は、IgA2m1、IgA2m2、およびIgA2（n）の3つのアロタイプに分けられる。IgAは、血清中では主に単量体IgAとして存在しており（血清型IgA）、IgA1が主要構成要素である。粘膜に分泌されると、二量体以上の多量体IgAとして存在し（分泌型IgA又はSIgA）、IgA2が約半分程度を占める。多量体IgAは、2分子以上のIgAがJ鎖（Joining chain）又はJ鎖及びSCにより重合したものである。多量体IgAには、SCを含むものと含まないものが存在する。二量体IgAは、一般に、重鎖：軽鎖：J鎖の割合が4：4：1である分子を指す。

[0019] 「SC（又は分泌片）」は、分子量約70kDaの糖鎖修飾されたポリペプチドであり、多量体免疫グロブリン受容体（pIgR）の細胞外ドメインに由来する。N末端から5つの免疫グロブリン様ドメインを有し、それぞれD1～D5と名付けられている。このうちD1が多量体IgAとの結合に必須であり、特にD1に存在する免疫グロブリンの可変領域のCDR（相補性決定領域）に類似した構造が、多量体IgAとの結合に重要な役割を担う。

[0020] pIgRは、粘膜上皮細胞の基底膜側の細胞膜上に発現している、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型の膜貫通型タンパク質であり、細胞外ドメイン、膜貫通領域及び細胞質内領域からなる。pIgRは、粘膜固有層に存在する形質細胞が産生したJ鎖を含む多量体IgA分子を特異的に認識して結合し、上皮細胞中に取り込み、結合したまま頂端部（apical）側へ輸送する。ここで、上皮細胞のタンパク質分解酵素により、pIgRの細胞外ドメインと膜貫通領域との間が切断され、多量体IgAがpIgRの細

胞外ドメイン部分と結合した状態で内腔側粘膜層へ分泌される（分泌型 I g A 又は S I g A）。切断後の p I g R の細胞外ドメインが S C に相当する。本明細書において使用する場合、S C を分子内に含む I g A 抗体を「分泌型 I g A 抗体」という。

[0021] 「J 鎖」は、N 結合型糖鎖を有する分子量約 15 k D a のポリペプチドである。J 鎖は、生物間で高度に保存されており、多量体 I g A が p I g R と相互作用するうえで不可欠である。

[0022] 2. 多量体 I g A 抗体の製造方法

本発明の第一の態様において、二量体 I g A 抗体、及び単量体 I g A 抗体を混合することを含む、三量体及び四量体 I g A 抗体の製造方法が提供される（以下、「本願の製造方法」ともいう）。本願の製造方法のさらなる態様として、二量体 I g A 抗体、単量体 I g A 抗体、及び S C を混合することを含む、三量体及び四量体 I g A 抗体の製造方法が提供される。本願の製造方法によれば、1 つの二量体 I g A 抗体と、2 つの単量体 I g A 抗体とが重合して、1 つの四量体 I g A 抗体が製造される。さらに、本願の製造方法によれば、1 つの二量体 I g A 抗体と、2 つの単量体 I g A 抗体と、S C とが重合して、1 つの四量体 I g A 抗体が製造される（図 1）。また、本願の製造方法によれば、1 つの二量体 I g A 抗体と、1 つの単量体 I g A 抗体とが重合して、1 つの三量体 I g A 抗体が製造される。またさらに、本願の製造方法によれば、1 つの二量体 I g A 抗体と、1 つの単量体 I g A 抗体と、S C とが重合して、1 つの三量体 I g A 抗体が製造される。

[0023] 混合する二量体 I g A 抗体と単量体 I g A 抗体は、それぞれ異なる可変領域を含んでいてもよく、又は同一の可変領域を含んでいてもよい。二量体 I g A 抗体及び単量体 I g A 抗体の全ての可変領域が同一である場合、得られる三量体及び四量体 I g A 抗体は単一特異性抗体である。二量体 I g A 抗体及び単量体 I g A 抗体が 2 種以上の異なる可変領域を含む場合、二重ないし八重の、多重特異性抗体が得られる。例えば、4 つの F a b 領域の全てが第 1 の抗原結合部位を含む二量体 I g A 抗体と、2 つの F a b 領域の両方が第

2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体を用いて、二重特異性三量体及び四量体IgA抗体を得てもよい。例えば、4つのFab領域の全てが第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体と、2つのFab領域の両方が第2の抗原結合部位を含む第1の単量体IgA抗体と、2つのFab領域の両方が第3の抗原結合部位を含む第2の単量体IgA抗体とを用いて、三重特異性四量体IgA抗体を得てもよい。例えば、4つのFab領域の2つが第1の抗原結合部位を含み、残りの2つが第2の抗原結合部位を含む二重特異性二量体IgA抗体と、2つのFab領域の両方が第3の抗原結合部位を含む第1の単量体IgA抗体と、2つのFab領域の両方が第4の抗原結合部位を含む第2の単量体IgA抗体とを用いて、三重特異性三量体IgA抗体、及び三重又は四重特異性四量体IgA抗体を得てもよい。このように、混合する二量体IgA抗体と単量体IgA抗体に含まれる可変領域を変更することにより、所望の二重ないし六重の多重特異性三量体IgA抗体、及び所望の二重ないし八重の多重特異性四量体IgA抗体を得ることができる。したがって、本発明の好ましい態様では、第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体及び第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体を混合することを含む、又は第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体、第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体、及びSCを混合することを含む、少なくとも二重特異性の三量体及び四量体IgA抗体の製造方法が提供される。

[0024] 本願の製造方法においては、二量体IgA抗体同士は重合せず、また、単量体IgA抗体同士も重合しない。したがって、第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体と、第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体とを混合した場合、又は第1の抗原結合部位を含む二量体IgA抗体と、第2の抗原結合部位を含む単量体IgA抗体と、SCを混合した場合は、少なくとも二重特異性の三量体及び四量体IgA抗体が100%の確率で得られる

[0025] 混合する二量体IgA抗体及び／又は単量体IgA抗体は、その重鎖定常領域の第458番目のアミノ酸残基が疎水性アミノ酸であることが好ましい。疎水性アミノ酸として、例えば、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、

トリプトファン、グリシンが挙げられ、好ましい例として、イソロイシンが挙げられる。このようなIgA抗体の重鎖定常領域は、天然配列からなるものであってもよく、又は遺伝子組み換え技術によって第458番目のアミノ酸残基が疎水性アミノ酸に改変されたものであってもよい。本発明によると、重鎖定常領域の第458番目のアミノ酸残基がイソロイシンであるIgA2m2抗体を用いた場合、重鎖定常領域の第458番目のアミノ酸残基が疎水性アミノ酸以外であるIgA1抗体のみを用いた場合と比べて、多量体IgA抗体の形成効率が上がった（実施例5）。IgA1の定常領域のアミノ酸配列を配列番号1に、IgA2m2の定常領域のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

[0026] SCとしては、野生型SC又はSC変異体のいずれを用いてもよい。SC変異体としては、例えば、少なくともドメインD1を含むSC変異体が挙げられ、例えば、SCのドメインD2～D5のうち1以上のドメイン又はD2～D5の領域の一部を欠失した変異体が挙げられる。好ましくは、少なくともドメインD1およびD2を含むSC変異体、SCのドメインD4及びD5の欠失変異体、SCのドメインD3～D5の全てを欠失した変異体（本明細書において、「SC12」という）等が挙げられる。さらに好ましくは、SCとして、野生型SC（配列番号3）又はSC12（配列番号4）あるいはそれらの変異体がいられ、またさらに好ましくはSC12又はその変異体がいられる。かかるSC変異体としては、例えば、配列番号3又は配列番号4で示されるアミノ酸配列に対し、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。本願の製造方法では、SCを用いても、用いなくてもよく、好ましくはSCを用いる。SCを用いると、三量体及び／又は四量体IgA抗体の形成効率が向上する。

[0027] 本願の製造方法において使用されるIgA抗体の由来は、特に限定されず

、例えば、ヒト抗体、非ヒト哺乳動物抗体、げっ歯類由来の抗体、鳥類由来の抗体等が挙げられる。

[0028] I g A抗体が特異的に結合する抗原は、特に限定されない。所望の三量体 I g A抗体及び／又は四量体 I g A抗体を作製するために適当な I g A抗体を選択すればよい。

[0029] 本願の製造方法において使用される I g A抗体のサブクラスは、I g A 1又はI g A 2のいずれであってもよく、又はI g A 1及びI g A 2の両方を使用してもよい。好ましくは、I g A 1及びI g A 2の両方を使用してもよい。例えば、二量体 I g A 1抗体と単量体 I g A 2抗体を使用してもよい。さらに、I g A 2のいずれのアロタイプを用いてもよい。

[0030] 本願の製造方法において使用される I g A抗体は、天然の I g A抗体であってもよく、又は組み換え I g A抗体であってもよい。ここで、「組み換え抗体」とは、天然の抗体配列を改変した抗体、および配列改変の有無にかかわらず、遺伝子組み換え技術により人為的に作製した抗体を包含する。例えば、非 I g A型抗体を I g A型に変換した組み換え I g A抗体を用いてもよい。非 I g A型抗体としては、例えば、I g G抗体、I g M抗体、I g E抗体、I g D抗体、I g Y抗体が挙げられる。非 I g A型抗体の由来は、特に限定されず、例えば、ヒト抗体、非ヒト哺乳動物抗体、げっ歯類由来の抗体、鳥類由来の抗体等が挙げられる。例えば、I g G抗体の可変領域を I g A抗体のバックボーンフレームワークに移植することによって、又はI g G抗体の C D Rのみを I g A抗体の C D Rに移植することによって作製された組み換え I g A抗体を使用してもよい。さらに、組み換え I g A抗体には、ある動物種由来の抗体の可変領域と別の動物種の由来の I g A抗体の定常領域を組み合わせたキメラ組み換え I g A抗体、ある動物種由来の抗体の相補性決定領域（C D R）を別の動物種の由来の I g A抗体の C D Rに移植した組み換え抗体も包含される。遺伝子組み換え技術は、当該分野でよく知られている。

[0031] したがって、本明細書において「I g A抗体」とは、少なくとも一部が I

g A 抗体に由来するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。

[0032] 本願の製造方法において使用される二量体 I g A 抗体は、好ましくは S C を含まない。また、本願の製造方法において使用される二量体 I g A 抗体は、J 鎖を含む。

[0033] 混合する二量体 I g A 抗体及び単量体 I g A 抗体は、当該分野において既知の方法によって作製すればよい。例えば、二量体 I g A 抗体及び単量体 I g A 抗体は、それぞれ別々に培養細胞で作製されたものであってもよい。二量体 I g A 抗体は、例えば、該 I g A 抗体を構成する重鎖タンパク質、軽鎖タンパク質及び J 鎖を 1 つの宿主細胞内で共発現させることによって作製してもよい。単量体 I g A 抗体は、例えば、該 I g A 抗体を構成する重鎖タンパク質及び軽鎖タンパク質を 1 つの宿主細胞内で共発現させることによって作製してもよい。

[0034] 宿主細胞としては、哺乳動物細胞、昆虫細胞、細菌、酵母等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、限定するものではないが、293F 細胞、CHO 細胞等が挙げられる。昆虫細胞としては、限定するものではないが、Sf9 細胞株、Sf21 細胞株等が挙げられる。

[0035] 上記のタンパク質（二量体 I g A 抗体の場合、重鎖タンパク質、軽鎖タンパク質及び J 鎖；単量体 I g A 抗体の場合、重鎖タンパク質及び軽鎖タンパク質）を 1 つの宿主細胞内で共発現させる工程は、例えば、これらのタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを該細胞内に導入することによって行えばよい。発現ベクター及び導入方法は当該分野でよく知られている。発現ベクターとしては、ファージベクター、ウイルスベクター、プラスミドベクター等を使用することができ、宿主に適切なベクターが当業者により適宜選択される。発現ベクター導入後、細胞を培養して目的のタンパク質を発現させる。細胞培養条件は当業者によって適宜選択される。

[0036] 本願の製造方法においては、二量体 I g A 抗体及び単量体 I g A 抗体、又は二量体 I g A 抗体、単量体 I g A 抗体及び S C に加えて、分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還

元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質をさらに混合してもよい。分子シャペロンタンパク質は、タンパク質分子のフォールディングに寄与するタンパク質である。分子シャペロンタンパク質としては、H s p 6 0ファミリー、H s p 7 0ファミリー、H s p 9 0ファミリー、H s p 1 0 0ファミリー、低分子量H s pファミリー、イソメラーゼ類、及びこれらの補助因子などがあり、例えば、D n a k、D n a J、G r p E、G r o E、G r o E L、G r o E S等が挙げられ、2種以上の分子シャペロンタンパク質を用いてもよい。ジスルフィド結合イソメラーゼは、アミノ酸残基間のジスルフィド結合に寄与する酵素である。酸化型グルタチオンは、ジスルフィド結合を形成するために必要な酸化的条件を作り出す。これらの物質の少なくとも1つを用いることにより、I g A抗体の四量体形成が促進される。本願の製造方法において、好ましくは、分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも2つの物質をさらに混合してもよく、さらに好ましくは、分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ及び酸化型グルタチオンをさらに混合する。また、本願の製造方法において、好ましくは、分子シャペロンタンパク質及びジスルフィド結合イソメラーゼからなる群から選択される少なくとも1つの物質をさらに混合してもよい。

[0037] 本願の製造方法において、二量体I g A抗体及び単量体I g A抗体、又は二量体I g A抗体、単量体I g A抗体、及びS C、又は二量体I g A抗体、単量体I g A抗体、ならびに分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質、又は二量体I g A抗体、単量体I g A抗体、S C、ならびに分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質の混合は、p H 6 ~ 1 0、好ましくはp H 7 ~ 8に調整した緩衝液中で行えばよい。緩衝液としては、例えば、限定するも

のではないが、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。混合時の適当な温度は、当業者により適宜決定することができるが、例えば25℃～45℃、好ましくは30℃～43℃、より好ましくは35℃～40℃、例えば37℃前後である。混合時間は、特に限定されず、反応容量等の他の条件に基づき当業者により適宜決定することができるが、例えば、6時間以上、12時間以上、24時間以上、又は48時間以上であってもよく、好ましくは24時間～72時間程度であってもよい。二量体IgA抗体及び単量体IgA抗体の混合比率、又は二量体IgA抗体、単量体IgA抗体、及びSCの混合比率、又は二量体IgA抗体、単量体IgA抗体、ならびに分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質の混合比率、又は二量体IgA抗体、単量体IgA抗体、SC、ならびに分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも1つの物質の混合比率は、特に限定されず、当業者により適宜決定することができる。

[0038] かくして製造された三量体及び四量体IgA抗体は、その分子サイズ等の特性に基づいて、他のIgA抗体（多量体化しなかった二量体IgA抗体及び単量体IgA抗体）から分離することができ、さらに、三量体IgA抗体と四量体IgA抗体も互いに分離することができる。三量体及び四量体IgA抗体の他のIgA抗体からの分離には、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、質量分析等を用いることができる。したがって、本願の製造方法は、三量体IgA抗体及び四量体IgA抗体を他のIgA抗体から分離する工程をさらに含んでもよい。

[0039] また、本願の製造方法によって製造された三量体及び四量体IgA抗体の特異性の確認は、ELISA法、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の既知の方法により行うことができる。本願の製造方法によって製造される多量体IgA抗体は、その多くが四量体IgA

抗体である。したがって、本願の製造方法によれば、三量体 I g A 抗体と比べて四量体 I g A 抗体を高い割合で含む、三量体 I g A 抗体と四量体 I g A 抗体の混合物が得られる。

[0040] 3. 多重特異性多量体 I g A 抗体

本発明の第二の態様において、第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の F a b 領域、及び第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の F a b 領域を含む、少なくとも二重特異性の三量体又は四量体 I g A 抗体が提供される（以下、「本願の多重特異性多量体 I g A 抗体」ともいう）。本願の多重特異性多量体 I g A 抗体のさらなる態様として、第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の F a b 領域、第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の F a b 領域、及び S C を含む、少なくとも二重特異性の三量体又は四量体 I g A 抗体が提供される。本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、好ましくは、上記した本願の製造方法によって得られる。

[0041] 該多重特異性多量体 I g A 抗体は、好ましくは、1 つの二量体 I g A 抗体と、1 つ又は 2 つの単量体 I g A 抗体との重合物である。該多重特異性多量体 I g A 抗体は、さらに好ましくは、1 つの二量体 I g A 抗体と、1 つ又は 2 つの単量体 I g A 抗体と、S C との重合物である。例えば、1 つの二量体 I g A 抗体と、1 つ又は 2 つの単量体 I g A 抗体は、S C を介して三量体化又は四量体化されている。例えば、該二量体 I g A 抗体は第 1 の抗原結合部位を含み、該単量体 I g A 抗体は第 2 の抗原結合部位を含む。好ましい例において、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、4 つの第 1 の F a b 領域、及び少なくとも 2 つの第 2 の F a b 領域を含む。さらに好ましい例において、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、4 つの第 1 の F a b 領域、少なくとも 2 つの第 2 の F a b 領域、及び S C を含む。またさらに好ましい例において、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、4 つの第 1 の F a b 領域及び 2 つの第 2 の F a b 領域を含む二重特異性三量体 I g A 抗体、又は 4 つの第 1 の F a b 領域及び 4 つの第 2 の F a b 領域を含む二重特異性四量体 I g A 抗体、又は 4 つの第 1 の F a b 領域、2 つの第 2 の F a b 領域、及び 2 つの第 3 の F a b 領域を含む三重特異性四量体 I g A 抗体であってもよい。また

さらに好ましい例において、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、4つの第1の F a b 領域、2つの第2の F a b 領域及び S C を含む二重特異性三量体 I g A 抗体、又は4つの第1の F a b 領域、4つの第2の F a b 領域及び S C を含む二重特異性四量体 I g A 抗体、又は4つの第1の F a b 領域、2つの第2の F a b 領域、2つの第3の F a b 領域及び S C を含む三重特異性四量体 I g A 抗体であってもよい。またさらに好ましい例において、前記4つの第1の F a b 領域は二量体 I g A 抗体に由来し、前記2つ又は4つの第2又は第3の F a b 領域は単量体 I g A 抗体に由来する。

[0042] 本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、I g A 1 又は I g A 2 のいずれであってもよく、又はその両方を含んでいてもよい。好ましくは、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、I g A 1 又は I g A 2 の両方を含んでいてもよい。さらに好ましくは、該多重特異性多量体 I g A 抗体は、二量体 I g A 1 由来の4つの F a b 領域、及び単量体 I g A 2 由来の2つ又は4つの F a b 領域を含んでいてもよい。また、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体に含まれる I g A 2 は、I g A 2 m 1、I g A 2 m 2、又は I g A 2 (n) であってもよい。

[0043] 本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、その重鎖定常領域の第458番目のアミノ酸残基が疎水性アミノ酸であってもよい。疎水性アミノ酸として、例えば、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、グリシンが挙げられ、好ましい例として、イソロイシンが挙げられる。

[0044] 本願の多重特異性多量体 I g A 抗体は、組み換え I g A 抗体であってもよい。例えば、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体が、1つの二量体 I g A 抗体と1つ又は2つの単量体 I g A 抗体との重合物である場合、又は1つの二量体 I g A 抗体と1つ又は2つの単量体 I g A 抗体と S C との重合物である場合、該二量体 I g A 抗体及び該単量体 I g A 抗体のいずれか、又は全てが組み換え I g A 抗体であってもよい。

[0045] 本願の多重特異性多量体 I g A 抗体を構成する I g A 抗体及び S C については、上記「2. 多量体 I g A 抗体の製造方法」に記載したとおりである。

[0046] 4. 医薬組成物

本発明の第三の態様において、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体を含む医薬組成物が提供される（以下、「本願の医薬組成物」ともいう）。本願の医薬組成物は、好ましくは、本願の多重特異性多量体 I g A 抗体、又は該多重特異性多量体 I g A 抗体の混合物を有効成分として含む。

[0047] 本願の医薬組成物は、例えば、疾患の治療、予防、又は診断等のために使用することができる。本願の医薬組成物を使用する対象疾患は、特に限定されず、例えば、感染症、例えば、寄生虫、細菌、真菌、ウイルス、異常プリオン等の病原体による感染症、及び悪性腫瘍等が挙げられる。感染症のさらなる例として、インフルエンザウイルス感染症、RSウイルス感染症、エボラウイルス感染症、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、重症急性呼吸器症候群（SARS）、中東呼吸器症候群（MERS）、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の粘膜感染症が挙げられる。

[0048] 本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体は、該医薬組成物の使用目的に適当な抗原結合部位を有する。例えば、疾患の診断、予防、治療等に用いる場合、例えば、1つの対象疾患に関連する2つの異なるタンパク質（例えば、原因タンパク質、マーカータンパク質等）に特異的に結合する、多重特異性多量体 I g A 抗体を用いることができる。例えば、本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体は、インフルエンザウイルスのHAタンパク質及びNAタンパク質にそれぞれ特異的に結合するものであってもよい。また、例えば、本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体は、標的細胞に特異的なタンパク質及び治療に有効なタンパク質にそれぞれ特異的に結合するものであってもよい。本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体の標的となり得る抗原又はエピトープの例として、限定するものではないが、エボラウイルスの糖タンパク質の複数のエピトープ、SFTSウイルスの糖タンパク質であるGnタンパク質及びGcタンパク質、CD3やCD8などのリンパ球のマーカータンパク質、及び癌特異抗原等が挙げられる。

[0049] 本願の医薬組成物は、粉剤、液剤等の剤型に製剤化して投与することができる。本願の医薬組成物は、製薬分野で既知の賦形剤、添加剤、増粘剤等をさらに含んでもよい。例えば、本願の医薬組成物は、鼻腔粘膜上への噴霧による投与、ネブライザーを用いた下気道への吸入による投与等により投与してもよい。

[0050] 本願の医薬組成物は、ヒトを対象とするものであってもよく、又は非ヒト哺乳動物、例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等の家畜動物、イヌ、ネコ等のペット動物、チンパンジー、ゴリラ、カニクイザル等の霊長類、マウス、ラット、モルモット等のげっ歯類等を対象とするものであってもよい。

[0051] 本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体の重鎖、軽鎖、S C、及び J 鎖のいずれかは、当該医薬組成物の対象動物に由来する（対象とする動物型である）アミノ酸配列を含むことが好ましい。さらに好ましくは、本願の医薬組成物に含まれる多重特異性多量体 I g A 抗体の重鎖、軽鎖、S C、及び J 鎖はいずれも、当該医薬組成物の対象動物に由来する（対象とする動物型である）アミノ酸配列を含む。ここで、重鎖及び軽鎖に関し「対象とする動物型である」とは、多重特異性多量体 I g A 抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域が対象とする動物の I g A 重鎖及び I g A 軽鎖の定常領域のアミノ酸配列を有していることを意味する。S C 及び J 鎖に関し「対象とする動物型である」とは、多重特異性多量体 I g A 抗体の S C 及び J 鎖が対象とする動物の S C 及び J 鎖のアミノ酸配列を有していることを意味する。I g A 重鎖、I g A 軽鎖、S C 及び J 鎖のアミノ酸配列は、目的とする抗原結合活性を有している限り変異を含んでもよい。

### 実施例

[0052] 以下、実施例を用いて本発明をさらに説明するが、本発明の実施例に限定されるものではない。

[0053] [材料及び調製]

#### 1. I g A 発現プラスミドベクターの作製

ヒトIgA1の定常領域である $\alpha 1$ 重鎖(HC)の発現ベクターは下記の通り作製した。PCRはPrimeSTAR™(登録商標) MAX DNA Polymerase (Takara Bio, Kusatsu, Japan)を使用して、実施した。簡潔に記述すると、鋳型としてpFUSE-CHlg-hA1 (InvivoGen)、プライマーは制限酵素であるXhoIとHindIIIが認識するサイトを含むIgA1抗体定常領域を増幅する適切なプライマーセットを用いて、ヒトIgA1抗体定常領域遺伝子をPCRを行い増幅した。PCR条件は98℃ 10秒、55℃ 5秒、72℃ 10秒で30サイクルで実施した。続いて、T. Tillerら(J Immunol Methods, 329, 112-24, 2008)が報告したヒト $\gamma 1$ HCの発現ベクターを鋳型とし、XhoIとHindIIIが認識するサイトを含み、シグナル配列を除くIgG1抗体定常領域である $\gamma 1$ HCを除去するための適切なプライマーセットを用いてPCRを実施した。PCR条件は98℃ 10秒、55℃ 5秒、72℃ 30秒で30サイクルで実施した。PCR産物の精製はMonoFas DNA精製キットI (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。精製された $\alpha 1$ HCと $\gamma 1$ HCを除去したT. Tillerらの発現ベクターはXhoI (New England Biolabs)、HindIII-HF (New England Biolabs)を用いて37℃で制限酵素処理した。制限酵素産物の精製は、MonoFas DNA精製キットIを用いて行った。制限酵素処理したDNAのライゲーションはDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Thermo Fisher Scientific)を使用して行い、全量をCompetent Quick DH5 $\alpha$ へ42℃で形質転換した。プラスミド抽出はPureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)により行った。抽出したプラスミドはApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerを用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応はBigDye Ter

minator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行い、精製はBigDye X Terminator™ Kitにより行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。

[0054] ヒトIgA2のアロタイプである $\alpha 2m2$  HCは、IMGT/GENE-DBに登録されている配列 (Accession numberは、 $\alpha 2m2$  HC がM60192及びAJ012264) をヒト用にコドン最適化を行い、人工合成した (GeneArt Strings DNA Fragments)。その時に可変領域のクローニングを容易にするため、可変領域の最後のアミノ酸アラニンと定常領域の最初のアミノ酸セリンのコドンを変更し、NheI切断サイトを作製した。NheI-HF (New England Biolabs) 及びHindIII-HFで処理した合成配列と、同一の制限酵素で処理した $\alpha 1$  HCは、MonoFas DNA精製キットIを用いて精製した。制限酵素処理したDNAのライゲーションはDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Thermo Fisher Scientific) を使用して行い、一部をCompetent Quick DH5 $\alpha$ へ42℃で形質転換した。プラスミド抽出はPureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) により行った。抽出したプラスミドはApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerを用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行い、精製はBigDye X Terminator™ Kitにより行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。

[0055] ヒト軽鎖 (LC) は、抗体の各アイソタイプ間で共通であるため、T. Tillerらによって報告された $\lambda$  LC発現ベクターを使用した。

[0056] 2. 抗体可変領域遺伝子の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2m2$  HC、及び $\lambda$  LC発現ベクターへのクローニング

インフルエンザウイルス (H3N2) のヘマグルチニン (HA) に対して

広域に結合する抗体クローンとして知られているF045-092を使用した。F045-092はNucleotideに登録されている配列(Accession numberは重鎖がAB649270, 軽鎖がAB649271)をヒト用にコドン最適化を行い、それぞれ $\alpha 1$  HC(重鎖)、 $\alpha 2m2$  HC(重鎖)、及び $\lambda$  LC( $\lambda$ 鎖)の発現ベクターへ組み込むように調整し人工合成した(GeneArt Strings DNA Fragments)。AgeI-HF(全ての鎖)及びNheI-HF(重鎖)、XhoI( $\lambda$ 鎖)(New England Biolabs)で処理した合成配列と、同一の制限酵素で処理した $\alpha 1$  HC、 $\alpha 2m2$  HC、及び $\lambda$  LCの発現ベクターは、MonoFas DNA精製キットIを用いて精製した。制限酵素処理したDNAのライゲーションはDNA Ligation Kit <Mighty Mix>(Thermo Fisher Scientific)を使用して行い、一部をCompetent Quick DH5 $\alpha$ へ42℃で形質転換した。プラスミド抽出はPureYield™ Plasmid Miniprep System(Promega)により行った。抽出したプラスミドはApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerを用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行い、精製はBigDye X Terminator™ Kitにより行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。

[0057] 3. 蛍光標識IgA1(mC-A1)、及びIgA2m2抗体(mC-A2)の発現プラスミドDNAの作製

IgA抗体の異なるサブクラスである $\alpha 1$ 及び $\alpha 2m2$ の重鎖における241番目のシステインまでを欠損させたCH2及びCH3から構成されたIgA1 $\Delta$ 及びIgA2m2 $\Delta$ 変異体を、制限酵素サイトを付加した特異的プライマーセットとPrimeSTAR Max DNA Polymerase(Takara Bio, Kusatsu, Japan)を用い

てPCRにより作出した。また、5' 及び3' 末端に制限酵素A g e l の認識配列を付加したプライマーセットとP r i m e S T A R M a x D N A P o l y m e r a s e (T a k a r a B i o) を用いてPCRを行い、蛍光タンパク質であるmC h e r r y の配列を特異的に増幅させた。その後、各I g A Δ変異体、及びmC h e r r y を制限酵素A g e l (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を用いて至適条件で制限酵素処理を実施した後、アガロースゲル電気泳動を行うことで、制限酵素によって消化された目的産物のバンドのみを回収した。回収した目的産物をM o n o F a s D N A 精製キットI (G L S c i e n c e s I n c. , T o k y o , J a p a n) を用いて精製し、その精製したI g A Δ変異体をコードしたDNA断片及び、mC h e r r y をコードしたDNA断片を1 : 3 (= I g A 1 Δ : mC h e r r y) で混合し、等量のDNA L i g a t i o n K i t <M i g h t y M i x> (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を加え、16℃で30分反応させライゲーションを行った。環化されたI g A ΔとmC h e r r y をE. c o l i D H 5 α C o m p e t e n t C e l l s (T a k a r a B i o, K u s a t s u, J a p a n) に42℃で形質転換した。プラスミドDNA抽出は、P u r e Y i e l d P l a s m i d M i n i p r e p S y s t e m (P r o m e g a) により行い、サンガー法を用いてシーケンス配列の解析を行った。mC h e r r y は、I g A 1 Δ及びI g A 2 m 2 Δをコードする配列の5' 側に付加した。また、この蛍光タンパク質mC h e r r y が融合したI g A Δ変異体をそれぞれmC - A 1 抗体、並びにmC - A 2 抗体とした。実施した操作は全て添付された説明書に従った。

[0058] 4. J鎖及び分泌片(S C)のクローニング

J鎖(G e n B a n k a c c e s s i o n n o. N M \_ 1 4 4 6 4 6) を、コーディング配列の5' 側にX h o I 認識配列及びK o z a k 配列を、さらに3' 側にN o t I 認識配列を付加したものを人工遺伝子合成サービス(ユーロフィンジェノミクス)により人工合成した。その後、X h o I

(New England Biolabs) 及び NotI-HF (New England Biolabs) を用いて、至適の条件で制限酵素処理を実施し、同一の条件で哺乳類培養細胞用の発現ベクターである pCXS N ベクターもまた制限酵素処理を実施した。制限酵素処理した DNA のライゲーションは DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Thermo Fisher Scientific) を使用して行い、一部を Competent Quick DH5 $\alpha$  へ 42°C で形質転換した。プラスミド抽出は PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) により行った。抽出したプラスミドは Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer を用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて行い、精製は BigDye X Terminator™ Kit により行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。

[0059] 野生型 SC (SC-wt) は、plgR (GenBank accession no. NM\_002644) の 5' 末端から 1809 bp (シグナル配列を含む) を使用し、その SC 配列の 5' 側に XhoI 認識配列と kozak 配列、3' 側に HindIII 認識配列、Thrombin 切断配列、6x His tag を含む DNA フラグメント (配列番号 7) を、GeneArt (登録商標) Strings DNA Fragments (Life Technologies) を用いて人工合成を行った。合成した DNA フラグメントを PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて PCR を実施し、DNA 精製を行った。その後、至適の条件下で XhoI と HindIII を用いて制限酵素処理を行い、同一の条件で哺乳類培養細胞用の発現ベクターである pCXS N ベクターもまた制限酵素処理を実施した。制限酵素処理した DNA のライゲーションは DNA Liga

tion Kit <Mighty Mix> (Thermo Fisher Scientific) を使用して行い、一部をCompetent Quick DH5 $\alpha$ へ42℃で形質転換した。プラスミド抽出はPure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega) により行った。抽出したプラスミドはApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerを用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行い、精製はBigDye X Terminator™ Kitにより行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。実施した操作は全て添付された説明書にしたがった。SC-wtをコードする遺伝子配列を図2-2に示す。

[0060] 5. SC12欠失変異体の発現プラスミドDNAの作製

5つのドメインを持つSCを鋳型として、特異的なプライマーとPrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を使用し、最適なプライマーセット及び塩基長を考慮し至適条件でPCRを行うことで、SCのドメイン1及び2をコードする配列を増幅させた。また、SCの各ドメインはBethらの先行研究 (eLife, 5, e10640, 2016) に従って決定した。PCR反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的の塩基長が特異的に増幅されていることを確認し、PCR産物をMonoFast DNA精製キットI (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を用いて、DNA精製を行った。また、精製したDNAフラグメントは、T4 polynucleotide kinase (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いてリン酸化し、T4 DNA ligase (Takara Bio, Kusatsu, Japan) により環状にセルフライゲーションさせた。ライゲーションの操作が終了後、環化された欠失変異体をコードしたプラスミドDNA (配列番号8) を

E. coli DH5 $\alpha$  Competent Cells (Takara Bio, Kusatsu, Japan) に42℃で形質転換した。プラスミドDNA抽出はPureYield Plasmid Miniprep Systemにより行った。抽出したプラスミドはApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerを用いてシーケンスを実施した。シーケンス反応はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行い、精製はBigDye X Terminator™ Kitにより行った。以上、全ての操作は添付の説明書に従い実施した。実施した操作は全て添付された説明書にしたがった。SC12欠失変異体をコードする遺伝子配列を図2-3に示す。

[0061] 6. 単量体IgA抗体、及び二量体IgA抗体の発現

単量体IgA抗体の構成分子は重鎖、軽鎖であり、二量体IgA抗体は重鎖、軽鎖、J鎖から構成されている。単量体及び二量体IgA抗体を構成する分子を発現するプラスミドDNAを、ヒト腎臓細胞由来の哺乳培養細胞であるExpi293F human cell (Thermo Fisher Scientific)  $2.9 \times 10^6$  cells/mLに、Expi293 Expression System Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)を用いて、それぞれ共導入した。その後、37℃、8% CO<sub>2</sub>、120 rpmで振盪培養を行い、一週間後に細胞培養液を回収した。

[0062] 7. mC-A1、及びmC-A2抗体の発現

mC-A1及びmC-A2抗体は、軽鎖を有していないため、各重鎖とJ鎖をコードしたプラスミドDNAをそれぞれ、ヒト腎臓細胞由来の哺乳培養細胞であるExpi293F human cell (Thermo Fisher Scientific)  $2.9 \times 10^6$  cells/mLにExpi293 Expression System Kit (T

hermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて、共導入した。その後、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $8\% \text{CO}_2$ 、 $120 \text{rpm}$  で振盪培養を行い、一週間後に細胞培養液を回収した。

[0063] 8. 組換え IgA 抗体、及び mC-A1/2 の精製

回収した細胞培養液を、 $3000 \text{rpm}$  で 20 分間の遠心分離により細胞などのデブリを取り除き、培養上清のみを回収した。また、この遠心の操作は計 2 回行った。その後、グラスファイバーフィルター及びステリカップ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて、上清のろ過を行った。組換え IgA 抗体、及び mC-A1/2 の精製はヒト IgA 抗体の定常領域を特異的に認識する Capture Select IgA Affinity Matrix (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。精製方法は説明書に従い実施した。簡潔に精製方法を以下に記述する。カラムは  $10 \text{CV}$  の PBS で平衡化され、濾過した培養上清をカラムにロードする。 $10 \text{CV}$  の PBS でカラムを洗浄し、 $5 \text{CV}$  の  $0.1 \text{M Glycine-HCl}$  ( $\text{pH } 3.0$ ) で抗体を溶出し、溶出液は  $1 \text{M Tris-HCl}$  ( $\text{pH } 8.0$ ) で中和した。抗体の濃縮は Amicon (登録商標) Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて、説明書に従って実施した。

[0064] 9. ゲル濾過クロマトグラフィーによる単量体及び二量体 IgA 抗体の分離

単量体及び二量体 IgA 抗体の濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。組換え IgA 抗体の分画には、Superose 6  $10/300 \text{GL}$  (GE Healthcare) を用いて、また、mC-A1/2 は Superose 12  $10/300 \text{GL}$  を用いて、説明書に従ってゲル濾過クロマトグラフィーを実施した。クロマトグラフィーの条件は、PBS を流速  $0.5 \text{mL/分}$ 、カラム平衡化  $1.5 \text{CV}$ 、溶出  $0.2 \text{mL/Fraction}$  (計  $1.5 \text{CV}$ ) で実施した。単量体、及び二量体

IgA抗体を含むフラクションをAmicon（登録商標）Ultra Centrifugal Filter Devicesを用いて濃縮した。濃度はNanoDropで測定した。

[0065] 10. 組換えSC12の発現と精製

SC12をコードするプラスミドDNAを、ヒト腎臓細胞由来の哺乳培養細胞であるExpi293F human cell（Thermo Fisher Scientific） $2.9 \times 10^6$  cells/mLにExpi293 Expression System Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて、遺伝子導入した。その後、 $37^\circ\text{C}$ 、8%  $\text{CO}_2$ 、120 rpmで振盪培養を行い、一週間後に細胞培養液を回収した。その後、回収した細胞培養液を3000 rpmで20分間の遠心分離により細胞などのデブリを取り除き、培養上清のみを回収した。また、この遠心の操作は計2回行った。培養上清中のSC12は、各タンパク質のC末端側のHisタグを認識するNi Sepharose excel（GE Healthcare）が充填されたアフィニティカラムを用いて精製した。簡潔に記述すると、平衡化溶液は20 mMリン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、pH 7.4、洗浄液は20 mMリン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、10 mMイミダゾール、pH 7.4、溶出液は20 mMリン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、500 mMイミダゾール、pH 7.4を使用した。平衡化溶液5 CV（カラム体積）を通し、カラムの平衡化をした後、培養上清を通した。洗浄は、洗浄液20 CVで行い、溶出は溶出液5 CVで実施し、平衡化溶液5 CVで再平衡化した。SC12の濃縮はAmicon（登録商標）Ultra Centrifugal Filter Devices（Millipore）を用いて、説明書に従って実施した。

[0066] [実施例1：細胞外における多量体IgA抗体の形成]

発明者らの先行研究（特許文献1）により、三量体及び四量体分泌型IgA抗体（tSIgA）を構成する重鎖（HC）と軽鎖（LC）、J鎖（JC

）及び分泌片（SC）を哺乳類培養細胞へ共発現させることで、効率良く t S I g A が産生されることが明らかにされた。さらに、SCの有無によって t S I g A の形成効率に差があることから、SCは培養細胞内において I g A 抗体の三量体及び四量体形成の促進因子として機能していることが示唆された。このSCが有する I g A 抗体の三量体及び四量体形成促進能は、細胞内に共在した4種類のタンパク質が相互作用することで形成された三量体及び四量体 I g A 抗体（T r i / T e t I g A）を測定することで評価された。そこで、細胞内という限定的な環境ではなく、細胞外条件において、SCが、別々の細胞から産生された各単離タンパク質からの多量体 I g A 抗体形成の促進因子として機能するかを評価した。なお、SCのドメイン1及び2から構成されるSC12は、細胞内における三量体及び四量体形成促進能がSC-wtよりも高いことが示されたことから、本実施例では、SCとしてSC12を用いた。

[0067] 上記の通り作製した、SC12、単量体 I g A 1 抗体（m A 1）及び二量体 I g A 1 抗体（d A 1）の最終濃度がそれぞれ1.25mg/mLになるようにリン酸緩衝液（pH7.4）中で混合し、ローテーターを用いて37℃で一週間反応させた。その後、コスモスピンフィルターH（ナカライテクス）を用いて抗体サンプルの前処理を行い、反応液中に生成されたT r i / T e t I g A をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により分子サイズにより分離後、UV（280nm）により検出し、抗体の重合度の評価を行った。HPLCシステムはA g i l e n t 1260 I n f i n i t y （A g i l e n t T e c h n o l o g i e s）、カラムはKW404-4 F（s h o d e x）を使用した。溶離液にはリン酸緩衝液pH7.4を用いて、流速0.2mL/minの条件で実施した。また、I g A 抗体混合液はそれぞれ9μL使用した。クロマトグラムはO p e n L A B C D S C h e m S t a t i o n E d i t i o n （A g i l e n t T e c h n o l o g i e s）を用いて解析を行った。

[0068] 結果を図3に示す。図中、「m A 1 + d A 1 + S C 1 2」は、単量体 I g

A抗体と二量体IgA抗体とSC12を混合した結果を示す。「mA1+SC12」は、単量体IgA抗体とSC12を混合した結果を示す。「dA1+SC12」は、二量体IgA抗体とSC12を混合した結果を示す。コントロールとして、特許文献1に記載の方法を用いて細胞内で作出した三量体及び四量体IgA抗体(Tri/Tet IgA)を使用した。

[0069] その結果、「mA1+SC12」及び「dA1+SC12」の組合せでは、三量体／四量体IgA抗体のピークは検出されなかった。一方で、「mA1+dA1+SC12」の3種類のタンパク質を混合させることで、dA1よりも分子量が大きく、また細胞内条件で作出した「Tri/Tet IgA」と同等の検出時間で、多量体IgA抗体のピークが検出された。以上の結果により、三量体／四量体IgA抗体形成にはSC12の存在に加え、mA1とdA1の共存が必要であることが示された。さらに、細胞外においても細胞内と同様に三量体／四量体IgA抗体の形成が可能なが明らかとなった。さらに、単量体同士、二量体同士では重合しないことが示された。したがって、三量体／四量体IgA抗体は、二量体IgA抗体と単量体IgA抗体が重合することによって形成されることが分かった。

[0070] [実施例2：SC12とSC-wt存在下における多量体IgA抗体形成の比較]

実施例1により、細胞外において、SC、単量体及び二量体IgA抗体を混合することにより多量体IgA抗体が形成したことから、SCは多量体IgA抗体形成に寄与することが示された。また、発明者らの以前の研究では、細胞内条件においてSC-wtと比べ、SC12は三量体／四量体形成促進能が高いことが示された。そこで、細胞外条件において効率良く三量体／四量体IgA抗体を産生する方法を探索するために、SC12とSC-wtの四量体形成促進能を比較した。

[0071] 上記の通り作製した、SC12、SC-wt、mA1及びdA1、並びに蛍光タンパク質であるmCherryをIgA抗体のFabに相当する領域に置換したmCherry融合IgA抗体(mC-A1)の単量体(mC-

m A 1) 及び二量体 (m C - d A 1) の最終濃度がそれぞれ 0. 5 m g / m L になるようにリン酸緩衝液 (p H 7. 4) 中で混合し、ローテーターを用いて 3 7 ° C で 6 時間反応させ、反応液中に生成された三量体 / 四量体 I g A を E L I S A 法によって検出した。

[0072] E L I S A 法は以下のように行った。9 6 ウェルハーフプレートに 5 0 μ l の組換え H A (A / S y d n e y / 5 / 1 9 9 7 (H 3 N 2) 由来, 5 μ g H A / m L) を 4 ° C で一晩固相化した後、1 % B S A - P B S を加え室温、1 時間ブロッキングを行った。その後、2 0 0 倍希釈した抗体サンプルの 3 倍段階希釈系列をつくり、各ウェルに添加し、3 7 ° C で 2 時間反応させた。P B S T での洗浄後、H A 抗原を介してプレートに捕捉された抗体を、5 n g / m L の D i r e c t - B l o t H R P a n t i - m C h e r r y (B i o L e g e n d) と 3 7 ° C で 1 時間反応させた。P B S T での洗浄後、I m m o b i l o n W e s t e r n C h e m i l u m H R P S u b s t r a t e (M E R C K) を用いて、発色反応をさせ、4 5 0 n m の波長における吸光度を測定した。また、解析はコントロールの O D 値が 1. 5 になるようにプレートごとに係数を算出し、その係数を各サンプルに乗算することでプレート間の補正を実施した。

[0073] 結果を図 4 に示す。S C 1 2 又は S C - w t の存在下で、m A 1 と m C - d A 1 を反応させた時は、m C - m A 1 と d A 1 を反応させた時と比べ、O D 値は高い値を示した。また、S C 1 2 と S C - w t を比較すると、m C - m A 1 を用いた場合では差がないものの、m C - d A 1 を用いた際、S C 1 2 存在下において O D 値が高い値を示す結果となった。以上の結果から、S C 1 2 は、I g A 抗体の多量体形成の促進能が高いことが明らかにされた。さらに、本実験で用いた I g A 抗体は、F 0 4 5 - 0 9 2 の可変領域を含む F a b 領域を有する I g A 抗体と m C - A 1 であり、これらの抗体は同一の定常領域をもつものの、可変領域が異なる。つまり、本願の多量体 I g A 抗体の製造方法は、可変領域非依存型であり、特異性の異なる二重以上の特異性、好ましくは二重ないしは三重特異性の I g A 抗体を作製可能であること

、さらに、二量体 I g A 抗体と単量体 I g A 抗体が異なる可変領域を有していても、多量体 I g A 抗体を形成可能であることが示された。

[0074] [実施例 3：多量体形成促進に関わる因子の同定 1]

実施例 2 により、SC 1 2 は、SC-wt と比べて、I g A 抗体の多量体形成促進能が高いことが明らかになった。そこで、更に多量体形成を増強させるために SC 及び I g A 抗体以外のタンパク質成分添加の検討を行った。

[0075] 上記の通り作製した、SC 1 2、SC-wt、mA 1 及び dA 1、並びに mC-mA 1 及び mC-dA 1 をそれぞれ最終濃度 0.5 mg/mL、及び添加剤 (Supple) をリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で混合し、ローターを用いて 37℃ で 6 時間反応させた。Supple は、シャペロンタンパク質 DnaK Mix (5 µM DnaK、1 µM DnaJ、1 µM GrpE) 及び GroE Mix (0.5 µM GroEL、1 µM GroES)、ジスルフィド結合イソメラーゼ DsbC (375 µg/mL)、及び酸化グルタチオン GSSG (30 mM) を含有した。反応液中に生成された三量体/四量体 I g A を、実施例 2 と同様に ELISA 法によって検出した。

[0076] 結果を図 5 A 及び B に示す。SC 1 2 存在下では、「mA 1 + mC-dA 1」及び「mC-mA 1 + dA 1」のどちらの混合液においても Supple を加えることで、三量体/四量体 I g A 形成の指標である OD 値の上昇が認められた (図 5 A)。また、どちらの混合液においても、OD 値が二倍以上上昇した。さらに、SC-wt 存在下においても同様に、Supple を加えることで SC 1 2 と同程度ほどの大幅な OD 値の上昇が認められた (図 5 B)。

[0077] [実施例 4：多量体形成促進に関わる因子の同定 2]

Supple に含まれる 4 つの大きな構成因子をそれぞれ単独で SC 1 2 の存在下で mC-mA 1 と dA 1 を反応させることで、各因子の多量体形成への寄与を評価した。反応および検出は、添加剤として DnaK Mix、GroE Mix、GSSG、または DsbC を単独で添加する以外は実施

例3と同様に行った。

[0078] 結果を図6に示す。分子シャペロンとして働くDnaK Mix又はGroE Mixを添加した場合、同程度のOD値が認められた。一方で、ジスルフィド結合イソメラーゼであるDsbCは、4つの構成因子の中で最も高いOD値の増強が認められた。しかしながら、ジスルフィド結合を形成するために必要な酸化的条件を作り出す酸化型グルタチオンGSSG添加条件では、4つの因子の中で三量体／四量体IgA形成促進効率が最も低かった。以上の結果により、本実験で使用したSuppleは、IgA抗体の三量体化／四量体化を促進するために有用であることが明らかとなった。

[0079] [実施例5：多量体形成促進に関わる因子の同定3]

IgA抗体の多量体化に寄与する因子として、IgA抗体の定常領域に着眼した。IgA抗体は、定常領域の違いによりIgA1とIgA2の2つのサブクラスに分類され、さらにIgA2はIgA2m1、IgA2m2、IgA2(n)の3つのアロタイプに分けられる。発明者らの先行研究（特許文献1）では、これらの定常領域の違いにより、細胞内条件において三量体／四量体IgA抗体形成効率が異なった。そこで、細胞外条件においても同様にIgA抗体サブクラスの違いにより多量体形成効率に差が認められるかを評価した。すなわち、IgA抗体の定常領域の違いによる多量体形成効率を、異なるサブクラスであるIgA1とIgA2m2を用いて比較した。

[0080] 上記の通り作製したmC-A1およびmC-A2を、実施例3と同様に、単量体と二量体IgA抗体の組み合わせにSC12を加え、さらにSuppleも加え反応させた後、三量体／四量体IgA形成の評価を行った。

[0081] 結果を図7に示す。IgA1抗体の単量体及び二量体を組み合わせた場合と比べ、IgA2m2抗体とIgA1抗体の組み合わせでは、OD値の増強が認められた。以上の結果により、IgA2m2は四量体形成能が高いことが明らかとなった。

[0082] [実施例6：多量体形成促進に関わる因子の同定4]

IgA抗体の多量体化に与える因子として、反応時間の検討を実施した。

SC12及びSuppleの存在下で、mC-mA1とdA1をリン酸緩衝液(pH7.4)中、37℃で反応させた。反応開始の6時間、12時間、及び24時間後にサンプルを回収し、ELISA法にて、三量体/四量体IgA形成を評価した。

[0083] 結果を図8に示す。大きな変化は認められないものの、反応時間を伸ばすことでOD値の増強認められた。以上の結果から、至適な反応時間を探索することで、更なる多量体IgA抗体の形成効率の増加が見込まれる。

[0084] [実施例7：異なる亜型のHAを用いた二重特異性IgA抗体の評価]

実施例2では、mCherry融合型IgA抗体の単量体及び二量体をSC-wt及びSC12の存在下で混合することにより、可変領域の異なる三量体/四量体IgA抗体が形成されることを明らかにした。更に、実施例5では、IgA抗体のサブクラスの違いによる多量体形成効率の違いについても明らかにした。そこで、本実施例では、検出タグを付加した亜型の異なる2種類のインフルエンザウイルスタンパク質HAと、それぞれのHAに特異性を有するIgA抗体クローンを用いて、本願の方法により形成された三量体/四量体IgA抗体の二重特異性を検証した。

[0085] 抗体クローンとして、インフルエンザA型のH1及びH3亜型に対して特異性を有する抗体クローンである、18-18K(H1)及び15-19L(H3)を使用した。これらのクローンは、経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験を実施し、被験者から分離されたものである。これらの抗体由来の可変領域を上記と同様の方法によって、 $\alpha 1$  HC、 $\alpha 2 m 2$  HC、及び $\lambda$  LCの発現ベクター中にクローニングし、インフルエンザウイルスA/California/7/2009(H1N1)(H1/HA)に対して特異性を有する抗体クローン18-18Kの二量体IgA1抗体、A/NewYork/39/2012(H3N2)(H3/HA)に対して特異性を有する抗体クローン15-19Lの単量体IgA2m2抗体及び二量体IgA1抗体を作製した。18-18K(H1)の重鎖可変領域の遺伝子配列を配列番号9に、アミノ酸配列を配列番号10に、軽鎖可変領域の遺伝子配列

を配列番号 11 に、アミノ酸配列を配列番号 12 に示す。15-19L (H3) の重鎖可変領域の遺伝子配列を配列番号 13 に、アミノ酸配列を配列番号 14 に、軽鎖可変領域の遺伝子配列を配列番号 15 に、アミノ酸配列を配列番号 16 に示す。SC 及び SC12 も、上記の通り作製した。

[0086] 18-18K の二量体 IgA1 抗体、15-19L の単量体 IgA2m2 抗体及び二量体 IgA1 抗体、及び SC 又は SC12 を各タンパク質の最終濃度が 0.3 mg/mL になるようにリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で混合した。具体的には、18-18K の二量体 IgA1 抗体と 15-19L の単量体 IgA2m2 抗体を混合した Hetero 群、及び 15-19L の単量体 IgA2m2 抗体と二量体 IgA1 抗体を混合した Homo 群にそれぞれ、SC-wt 又は SC12 を加えた混合液、又は SC-wt 及び SC12 のいずれも加えない混合液を、さらに還元型グルタチオン (富士フイルム和光純薬株式会社) を最終濃度 0.03 mM になるように添加し、サーマルサイクラーを用いて 37°C で 12 時間反応させた。反応液中に生成された三量体/四量体 IgA を ELISA 法によって検出した。

[0087] ELISA 法は以下のように行った。384 ウェルプレートに 40 µl の strept タグを付加した組換え H3/HA-Strept (A/New York/39/2012 (H3N2) 由来, 5 µg HA/mL) を 4°C で一晩固相化した後、1% BSA-PBS を加え室温、1 時間ブロッキングを行った。その後、100 倍希釈した抗体サンプルの 2 倍段階希釈系列をつくり、各ウェルに添加し、37°C で 2 時間反応させた。PBST での洗浄後、40 µl の His タグを付加した組換え H1/HA-His (A/California/7/2009 (H1N1) 由来, 1 µg HA/mL) を各ウェルに添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST での洗浄後、40 µl の 6000 倍希釈した mAb-HRP-Direct (MBL) を各ウェルに添加し、37°C で 1 時間反応させた。PBST での洗浄後、Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (MERCK) を用いて、発色反応をさせ、450 nm の波長における吸

光度を測定した。

[0088] 結果を図9に示す。異なる特異性を有した抗体クローンを組み合わせたHetero群では、SC非存在下と比べ、SC存在下でOD値の増強が認められた。さらに、これまでの結果と同様にSC12存在下ではSC-wtと比べ、OD値の更なる増強が認められた。一方で、同一の特異性を有した単量体IgA2m2 (mA2) 及び二量体IgA1 (dA1) を組み合わせたHomo群では、SC-wt又はSC12存在下においても、SC非存在下のHetero群に匹敵するOD値は検出されなかった。

[0089] 以上の結果から、H1/H Aへの結合能の獲得は、三量体/四量体IgA抗体の形成自体によるものではなく、H3/H Aに特異性を示す抗体クローン15-19LのdA1とH1/H Aに特異性を示す抗体クローン18-18KのmA2の二種類のIgA抗体分子が、一つの三量体/四量体IgA抗体分子を形成したことによるものであることが示された。また、SC非存在下のIgA1とIgA2m2のIgAアロタイプの組み合わせにおいても、三量体/四量体IgA抗体が形成された。さらにSC-wt又はSC12存在下でIgA抗体を反応させることで、より効率良く二重特異性を有した三量体/四量体IgA抗体を作製することができると明らかとなった。

#### 配列表フリーテキスト

[0090] SEQ ID N0:1; Amino acid sequence of IgA1 constant region  
SEQ ID N0:2; Amino acid sequence of IgA2m2 constant region  
SEQ ID N0:3; Amino acid sequence of wild-type SC  
SEQ ID N0:4; Amino acid sequence of SC12  
SEQ ID N0:5; Amino acid sequence of wild-type SC containing signal sequence, thrombin site, His tag  
SEQ ID N0:6; Amino acid sequence of SC12 containing signal sequence, thrombin site, His tag  
SEQ ID N0:7; Nucleotide sequence of wild-type SC containing signal sequence, thrombin site, His tag

SEQ ID N0:8; Nucleotide sequence of SC12 containing signal sequence, thrombin site, His tag

SEQ ID N0:9; Nucleotide sequence of heavy chain variable region of 18-18K(H1 specific)

SEQ ID N0:10; Amino acid sequence of heavy chain variable region of 18-18K(H1 specific)

SEQ ID N0:11; Nucleotide sequence of light chain variable region of 18-18K(H1 specific)

SEQ ID N0:12; Amino acid sequence of light chain variable region of 18-18K(H1 specific)

SEQ ID N0:13; Nucleotide sequence of heavy chain variable region of 15-19L(H3 specific)

SEQ ID N0:14; Amino acid sequence of heavy chain variable region of 15-19L(H3 specific)

SEQ ID N0:15; Nucleotide sequence of light chain variable region of 15-19L(H3 specific)

SEQ ID N0:16; Amino acid sequence of light chain variable region of 15-19L(H3 specific)

### 請求の範囲

- [請求項1] 二量体 I g A 抗体、及び単量体 I g A 抗体を混合することを含む、三量体及び四量体 I g A 抗体を製造するための方法。
- [請求項2] さらに分泌片を混合することを含む、請求項 1 記載の方法。
- [請求項3] 前記二量体 I g A 抗体が第 1 の抗原結合部位を含み、前記単量体 I g A 抗体が第 2 の抗原結合部位を含む、少なくとも二重特異性の三量体及び四量体 I g A 抗体が製造される、請求項 1 又は 2 記載の方法。
- [請求項4] 第 3 の抗原結合部位を含む別の単量体 I g A 抗体をさらに混合する、請求項 3 記載の方法。
- [請求項5] 前記二量体 I g A 抗体の 4 つの F a b 領域がそれぞれ第 1 の抗原結合部位を含み、前記第 2 の抗原結合部位を含む単量体 I g A 抗体の 2 つの F a b 領域がそれぞれ第 2 の抗原結合部位を含む、請求項 3 記載の方法。
- [請求項6] 前記二量体 I g A 抗体の 4 つの F a b 領域がそれぞれ第 1 の抗原結合部位を含み、前記第 2 の抗原結合部位を含む単量体 I g A 抗体の 2 つの F a b 領域がそれぞれ第 2 の抗原結合部位を含み、前記別の単量体 I g A 抗体の 2 つの F a b 領域がそれぞれ第 3 の抗原結合部位を含む、請求項 4 記載の方法。
- [請求項7] 前記分泌片が野生型 S C 又は S C 変異体である、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項記載の方法。
- [請求項8] 分子シャペロンタンパク質、ジスルフィド結合イソメラーゼ、酸化型グルタチオン、及び還元型グルタチオンからなる群から選択される少なくとも 1 つの物質をさらに混合することを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項記載の方法。
- [請求項9] 前記二量体 I g A 抗体及び前記単量体 I g A 抗体がそれぞれ別々に培養細胞で作製された組換え I g A 抗体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項記載の方法。
- [請求項10] 製造された三量体 I g A 抗体及び四量体 I g A 抗体を他の I g A 抗

体から分離することをさらに含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

- [請求項11] 製造された三量体 I g A 抗体と四量体 I g A 抗体を分離することをさらに含む、請求項 10 記載の方法。
- [請求項12] 第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の F a b 領域、及び第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の F a b 領域を含む、少なくとも二重特異性の三量体又は四量体 I g A 抗体。
- [請求項13] さらに分泌片を含む、請求項 12 記載の抗体。
- [請求項14] 第 1 の抗原結合部位を含む二量体 I g A 抗体 1 分子と、第 2 の抗原結合部位を含む単量体 I g A 抗体 1 分子又は 2 分子との重合物である、請求項 12 記載の抗体。
- [請求項15] 第 1 の抗原結合部位を含む二量体 I g A 抗体 1 分子と、第 2 の抗原結合部位を含む単量体 I g A 抗体 1 分子又は 2 分子と、分泌片との重合物である、請求項 13 記載の抗体。
- [請求項16] 4 つの第 1 の F a b 領域、及び少なくとも 2 つの第 2 の F a b 領域を含む、請求項 12 ～ 15 のいずれか 1 項記載の抗体。
- [請求項17] 前記分泌片が野生型 S C 又は S C 変異体である、請求項 13、15 及び 16 のいずれか 1 項記載の抗体。
- [請求項18] 請求項 12 ～ 17 のいずれか 1 項記載の抗体を含む医薬組成物。