

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-58633

(P2022-58633A)

(43)公開日 令和4年4月12日(2022.4.12)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 有 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全129頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-4795(P2022-4795)	(71)出願人	510089100
(22)出願日	令和4年1月17日(2022.1.17)		ゼンコア インコーポレイテッド
(62)分割の表示	特願2019-174528(P2019-174528)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
	)の分割		1 0 1 6, モンロピア, ウエスト レモン
原出願日	平成26年3月17日(2014.3.17)		アベニュー 1 1 1
(31)優先権主張番号	61/818,401	(74)代理人	100079108
(32)優先日	平成25年5月1日(2013.5.1)		弁理士 稲葉 良幸
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346
			弁理士 大貫 敏史
(31)優先権主張番号	14/155,334	(74)代理人	100117189
(32)優先日	平成26年1月14日(2014.1.14)		弁理士 江口 昭彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦
(31)優先権主張番号	14/207,489	(72)発明者	ムーア, グレゴリー
(32)優先日	平成26年3月12日(2014.3.12)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘテロ二量体タンパク質

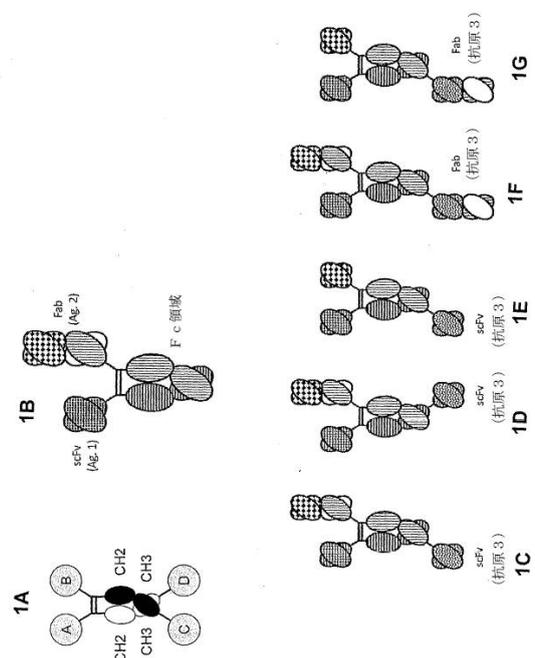
(57)【要約】 (修正有)

【課題】全長抗体様の形態から作製されたものの欠点に対処した、ヘテロ二量体抗体を提供する。

【解決手段】1つの態様において、本発明は、第一の変異Fcドメイン及び第一の抗原結合ドメインを含有する第一の重鎖定常ドメインを含有する第一のモノマー、及び第二の変異Fcドメイン及び第二の抗原結合ドメインを含有する第二の重鎖定常ドメインを含有する第二のモノマー、を含有するヘテロ二量体抗体を開示する。さらなる態様において、ヘテロ二量体抗体は、第一のFcドメイン及び第一の抗原に結合する一本鎖Fv領域(scFv)を含有する重鎖を含有する第一のモノマーを含有し、ここで、scFvは荷電scFvリンカーを含有する。ヘテロ二量体抗体はさらに、第二のFcドメイン及び第一の可変重鎖、及び第一の軽鎖を含有する第一の重鎖を含有する第二のモノマーをさらに含有する。

【選択図】図1-1

図1A-1G



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下を含有するヘテロ二量体抗体：

a) 以下を含有する第一のモノマー：

i) 第一の変異 F c ドメインを含有する第一の重鎖定常ドメイン；及び

i i) 第一の抗原結合ドメイン；並びに

b) 以下を含有する第二のモノマー：

i) 第二の変異 F c ドメインを含有する第二の重鎖定常ドメイン；及び

i i) 第二の抗原結合ドメイン；

ここで、前記第一及び第二の変異 F c ドメインのうちの一つは、図 6 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換（複数含む）を含有する。 10

## 【請求項 2】

前記第一の抗原結合ドメインは、前記第一の重鎖定常ドメインに共有結合された s c F v である、請求項 1 に記載のヘテロ二量体抗体。

## 【請求項 3】

前記ヘテロ二量体抗体が、図 1 B ~ 1 L、及び 2 A ~ 2 M の構造から選択される構造を有する、請求項 1 に記載のヘテロ二量体抗体。

## 【請求項 4】

前記第一及び / 又は第二の F c ドメインが、4 3 4 A、4 3 4 S、4 2 8 L、3 0 8 F、2 5 9 I、4 2 8 L / 4 3 4 S、2 5 9 I / 3 0 8 F、4 3 6 I / 4 2 8 L、4 3 6 I 又は V / 4 3 4 S、4 3 6 V / 4 2 8 L、2 5 2 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E、2 5 9 I / 3 0 8 F / 4 2 8 L、2 3 6 A、2 3 9 D、2 3 9 E、3 3 2 E、3 3 2 D、2 3 9 D / 3 3 2 E、2 6 7 D、2 6 7 E、3 2 8 F、2 6 7 E / 3 2 8 F、2 3 6 A / 3 3 2 E、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 Y、2 3 9 D、3 3 2 E / 3 3 0 L、2 3 6 R、3 2 8 R、2 3 6 R / 3 2 8 R、2 3 6 N / 2 6 7 E、2 4 3 L、2 9 8 A 及び 2 9 9 T からなる群から選択されるアミノ酸置換（複数含む）をさらに含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。 20

## 【請求項 5】

前記第一及び前記第二の変異 F c ドメインのうちの一つが、アミノ酸置換 3 6 4 K / E 3 5 7 Q を含有し、並びに、他の前記第一及び前記第二の変異 F c ドメインが、アミノ酸置換 3 6 8 D / 3 7 0 S を含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。 30

## 【請求項 6】

前記第一及び / 又は第二の F c ドメインが、図 7 に列記されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換（複数含む）をさらに含有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

## 【請求項 7】

前記第一のモノマーが、s c F v に共有結合された重鎖定常ドメインを含有し、及び前記第二のモノマーが、重鎖及び軽鎖を含有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。 40

## 【請求項 8】

前記モノマーのうちの一つが、N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D を含有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の前記第一及び第二のモノマーをコードする核酸を含有する、核酸組成物。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸組成物を含有する宿主細胞。

## 【請求項 11】

前記ヘテロ二量体抗体が産生される条件下で、請求項 K 1 0 に記載の宿主細胞を培養する 50

こと、及び前記ヘテロ二量体抗体を回収すること、を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体を作製する方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体を投与することにより、その必要のある個体を治療する方法。

【請求項 1 3】

以下を含むヘテロ二量体抗体：

a) 以下を含む重鎖を含有する第一のモノマー：

i) 第一の F c ドメイン；及び

i i) 第一の抗原に結合する一本鎖 F v 領域 ( s c F v ) ；

ここで、前記 s c F v は荷電 s c F v リンカーを含有し；及び

b) 以下を含有する第二のモノマー：

I) 以下を含有する第一の重鎖：

1) 第二の F c ドメイン；

2) 第一の可変重鎖；及び

i i) 第一の軽鎖。

【請求項 1 4】

前記荷電 s c F v リンカーが、3 ~ 8 の正電荷を有し、及び図 9 に示されるものからなる群から選択される、請求項 1 3 に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 5】

前記荷電 s c F v リンカーが、3 ~ 8 の負電荷を有し、及び図 9 に示されるものからなる群から選択される、請求項 1 3 に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 6】

前記第一及び第二の F c ドメインが、図 3 に示されるセットからなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 7】

前記第一及び / 又は第二の F c ドメインが、4 3 4 A、4 3 4 S、4 2 8 L、3 0 8 F、2 5 9 I、4 2 8 L / 4 3 4 S、2 5 9 I / 3 0 8 F、4 3 6 I / 4 2 8 L、4 3 6 I 又は V / 4 3 4 S、4 3 6 V / 4 2 8 L、2 5 2 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E、2 5 9 I / 3 0 8 F / 4 2 8 L、2 3 6 A、2 3 9 D、2 3 9 E、3 3 2 E、3 3 2 D、2 3 9 D / 3 3 2 E、2 6 7 D、2 6 7 E、3 2 8 F、2 6 7 E / 3 2 8 F、2 3 6 A / 3 3 2 E、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 Y、2 3 9 D、3 3 2 E / 3 3 0 L、2 3 6 R、3 2 8 R、2 3 6 R / 3 2 8 R、2 3 6 N / 2 6 7 E、2 4 3 L、2 9 8 A 及び 2 9 9 T からなる群から選択されるアミノ酸置換 ( 複数含む ) をさらに含有する、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 8】

前記第一及び / 又は第二の F c ドメインが、図 7 に列記されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換 ( 複数含む ) をさらに含有する、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 9】

以下を含むヘテロ二量体抗体組成物：

a) 以下を含有する第一のモノマー：

i) 以下を含有する第一の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第一の変異 F c ドメイン；及び

B) 第一の抗原に結合する第一の抗原結合ドメイン；及び

i i) 以下を含有する第二の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第二の変異 F c ドメイン；及び

B) 第二の抗原に結合する第二の抗原結合ドメイン；

ここで、前記第一及び第二の変異 F c ドメインは、図 3 に示されるアミノ酸のセットが

10

20

30

40

50

らなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する。

【請求項 20】

以下を含むヘテロ二量体抗体組成物：

a) 以下を含有する第一のモノマー：

i) 以下を含有する第一の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第一の変異 F c ドメイン；及び

B) 第一の抗原に結合する第一の抗原結合ドメイン；及び

ii) 以下を含有する第二の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第二の変異 F c ドメイン；及び

B) C D 19 に結合し、並びに、H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、第二の抗原結合ドメイン。 10

【請求項 21】

以下を含むヘテロ二量体抗体組成物：

a) 以下を含有する第一のモノマー：

i) 以下を含有する第一の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第一の変異 F c ドメイン；及び

B) 配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 (ここで、X a a 1 は N、S、又は H (配列番号 4 3 5))、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 (ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A (配列番号 4 3 6))、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 (ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D (配列番号 4 3 7))、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有する v l C D R 1 (ここで、X a a 1 は G、R、又は K であり、X a a 2 は T、又は S であり、X a a 3 は S、又は G であり、及び X a a 4 は、N、又は H (配列番号 4 3 8))、配列 X a a 1 - T - N - X a a 2 - R - A - X a a 3 を有する v l C D R 2 (ここで、X a a 1 は G、又は D であり、X a a 2 は、K、又は N であり、及び X a a 3 は P、又は S (配列番号 4 3 9)) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 (ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H (配列番号 4 4 0))、を含有する配列を有する抗 C D 3 可変領域を含有する第一の抗原結合ドメイン；及び 20

b) 以下を含有する第二のモノマー：

ii) 以下を含有する第二の重鎖配列：

A) ヒト F c ドメインに対する第二の変異 F c ドメイン；及び

B) H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 抗原結合ドメイン。 30

【請求項 22】

前記第一及び第二の変異 F c ドメインは、図 3 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する、請求項 2 1 に記載のヘテロ二量体抗体組成物。 40

【請求項 23】

H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 可変ドメインを含有する抗体組成物。

【請求項 24】

前記第一及び第二の変異 F c ドメインは、図 3 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する、請求項 2 1 に記載のヘテロ二量体抗体組成物。

【請求項 25】

H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 可変ドメインを含有する抗体組成物。

【請求項 26】

H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 可変ドメインを含有する抗体組成物。

【請求項 27】

H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 可変ドメインを含有する抗体組成物。

【請求項 28】

H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖、及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列、を含有する、抗 C D 1 9 可変ドメインを含有する抗体組成物。

前記抗体がヘテロ二量体抗体である、請求項 Q 1 に記載の抗体。

【請求項 25】

以下を含むヘテロ二量体抗体：

a) 以下を含む重鎖を含有する第一のモノマー：

i) 第一の変異 F c ドメイン；及び

ii) 第一の抗原に結合する一本鎖 F v 領域 ( s c F v ) ；

ここで、前記 s c F v は荷電 s c F v リンカーを含有し；及び

b) 以下を含有する第二のモノマー：

I) 以下を含有する第一の重鎖：

1) 第二の変異 F c ドメイン；

2) 第一の可変重鎖；及び

ii) 第一の軽鎖；

ここで、前記第一及び第二の変異 F c ドメインは、図 7 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換 ( 複数含む ) を含有する。

【請求項 26】

以下を含むヘテロ二量体抗体組成物：

a) 以下を含有する第一のモノマー：

i) 配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 ( ここで、X a a 1 は N、S、又は H ( 配列番号 4 3 5 ) )、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 ( ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A ( 配列番号 4 3 6 ) )、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 ( ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D ( 配列番号 4 3 7 ) )、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有する v l C D R 1 ( ここで、X a a 1 は G、R、又は K であり、X a a 2 は T、又は S であり、X a a 3 は S、又は G であり、及び X a a 4 は、N、又は H ( 配列番号 4 3 8 ) )、配列 X a a 1 - T - N - X a a 2 - R - A - X a a 3 を有する v l C D R 2 ( ここで、X a a 1 は G、又は D であり、X a a 2 は、K、又は N であり、及び X a a 3 は P、又は S ( 配列番号 4 3 9 ) ) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 ( ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H ( 配列番号 4 4 0 ) )、を含有する配列を有する抗 C D 3 可変領域を含有する第一の抗原結合ドメイン；及び

ii) ヒト F c ドメインに対する第一の変異 F c ドメインを含有する第一の重鎖配列；及び

b) 以下を含有する第二のモノマー：

i) 第二の抗原結合ドメイン；及び

ii) ヒトに対する第二の変異 F c ドメインを含有する第二の重鎖配列；

ここで、前記第一及び第二の変異 F c ドメインは異なるアミノ酸配列を有する。

【請求項 27】

前記第一及び第二の変異 F c ドメインが、図 3 に示されるアミノ酸置換のセットからなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する、請求項 26 に記載のヘテロ二量体抗体組成物。

【請求項 28】

前記セットが、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K ; L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K / E 3 5 7 L ; L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q ; T 4 1 1 E / K 3 6 0 E / Q 3 6 2 E 及び D 4 0 1 K ; L 3 6 8 E / K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K ; K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q ; 並びに K 3 7 0 S 及び S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q からなる群から選択される、請求項 C 2 に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

前記抗CD3可変領域が、前記第一の重鎖配列に共有結合された抗CD3scFv配列である、請求項26～28のいずれか1項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項30】

前記抗CD3scFvが、荷電scFvリンカーを含有する、請求項29に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項31】

前記荷電scFvリンカーが、IRPRAIGGSKPRVA(配列番号X)、GKGGSGKGGSGKGGSG(配列番号X)、GGKGGSGKGGSGKGGSG(配列番号X)、GGGKSGGGKSGGGKSG(配列番号X)、GKGGKSGKGGKSGKGGKSG(配列番号X)、(配列番号X)、GGGKSGGGKGGSGKGGSG(配列番号X)、(配列番号X)、GKPGSGKPGSGKPGSG(配列番号X)、GKPGSGKPGSGKPGSGKPGSG(配列番号X)、(配列番号X)、GKGGKSGKGGKSGKGGKSGKGGKSG(配列番号X)、STAGDTHLGGEDFD(配列番号X)、GEGGSGEGGSGEGGSG(配列番号X)、GEGGSGEGGSGEGGSGEGGSG(配列番号X)、GEGGSGEGGSGEGGSGEGGSG(配列番号X)、GEGGSGEGGSGEGGSGEGGSG(配列番号X)及びGEGGSGEGGSGEGGSGEGGSGEGGSG(配列番号X)からなる群から選択される、請求項31に記載のヘテロ二量体抗体。

10

【請求項32】

前記第一のモノマーが以下を含有する請求項26～28のいずれか1項に記載のヘテロ二量体抗体：

20

a) 前記vhCDR1、前記vhCDR2及び前記vhCDR3の配列を含有する重鎖可変ドメインを含有する前記第一の重鎖配列；及び

b) 前記vlCDR1、前記vlCDR2及び前記vlCDR3の配列を含有する軽鎖可変ドメインを含有する第一の軽鎖配列。

【請求項33】

前記第二の抗原結合ドメインがscFvを含有する、請求項26～32のいずれか1項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項34】

前記第二のモノマーが、以下を含有する請求項26～32のいずれか1項に記載のヘテロ二量体抗体。

30

a) 第二の重鎖可変ドメインをさらに含有する前記重鎖配列；及び

b) 軽鎖配列；

ここで、前記重鎖可変ドメイン及び前記軽鎖配列は、前記第二の抗原結合ドメインを形成する。

【請求項35】

前記第一のモノマーのpI及び前記第二のモノマーのpIが、少なくとも0.5log離れている、請求項26～34のいずれか1項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項36】

前記第一及び第二の変異Fcドメインが、図3に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換(複数含む)のセットを含有する、請求項35に記載のヘテロ二量体抗体。

40

【請求項37】

前記変異Fcドメインのうちの1つが、434A、434S、428L、308F、259I、428L/434S、259I/308F、436I/428L、436I、又はV/434S、436V/428L、252Y、252Y/254T/256E、259I/308F/428L、236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D、332E/330L、236R、328R、236R/328R、236N/267E、243L、298A、及び299Tからなる群から選択されるアミノ酸置換(複数含む)をさらに含有する、請求項26～36

50

のいずれか 1 項に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項 38】

配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列を有する抗 C D 3 可変領域を含有する組成物。

【請求項 39】

配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 (ここで、X a a 1 は N、S、又は H (配列番号 435))、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 (ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A (配列番号 436))、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 (ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D (配列番号 437))、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有する v l C D R 1 (ここで、X a a 1 は G、R、又は K であり、X a a 2 は T、又は S であり、X a a 3 は S、又は G であり、及び X a a 4 は、N、又は H (配列番号 438))、配列 X a a 1 - T - N - X a a 2 - R - A - X a a 3 を有する v l C D R 2 (ここで、X a a 1 は G、又は D であり、X a a 2 は、K、又は N であり、及び X a a 3 は P、又は S (配列番号 439)) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 (ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H (配列番号 440))、を含有する配列を有する抗 C D 3 可変領域を含有する組成物。

【請求項 40】

前記抗 C D 3 可変領域が、以下からなる群から選択される配列を有する、請求項 39 に記載の組成物：

- a) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- b) 配列番号 412 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- c) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 414 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- d) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 417 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- e) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 418 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- f) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 421 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- g) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 422 を有する v l C D R 1、配列番号 425 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- h) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列番号 416 を有する v h C D R 3、配列番号 420 を有する v l C D R 1、配列番号 427 を有する v l C D R 2、及び配列番号 430 を有する v l C D R 3、を含有する配列；
- i) 配列番号 411 を有する v h C D R 1、配列番号 413 を有する v h C D R 2、配列



前記抗 C D 3 可変領域が、以下からなる群から選択される可変重鎖領域及び可変軽鎖領域を含有する、請求項 39 又は 40 のいずれか 1 項に記載の組成物：

配列番号 5 及び 6、配列番号 9 及び 10、配列番号 13 及び 14、配列番号 17 及び 18、配列番号 21 及び 22、配列番号 25 及び 26、配列番号 29 及び 30、配列番号 33 及び 34、配列番号 37 及び 38、配列番号 41 及び 42、配列番号 45 及び 46、配列番号 49 及び 50、配列番号 53 及び 54、配列番号 57 及び 58、配列番号 61 及び 62、配列番号 65 及び 66、配列番号 69 及び 70、配列番号 73 及び 74、配列番号 77 及び 78、配列番号 81 及び 82、配列番号 85 及び 86、配列番号 89 及び 90、配列番号 93 及び 94、配列番号 97 及び 98、配列番号 101 及び 102、配列番号 105 及び 106、配列番号 109 及び 110、配列番号 113 及び 114、配列番号 117 及び 118、配列番号 121 及び 122、配列番号 125 及び 126、配列番号 129 及び 130、配列番号 133 及び 134、配列番号 137 及び 138、配列番号 141 及び 142、配列番号 145 及び 146、配列番号 149 及び 150、配列番号 153 及び 154、配列番号 157 及び 158、配列番号 161 及び 162、配列番号 165 及び 166、配列番号 169 及び 170、配列番号 173 及び 174、配列番号 177 及び 178、配列番号 181 及び 182、配列番号 185 及び 186、配列番号 189 及び 190、配列番号 193 及び 194、配列番号 197 及び 198、配列番号 201 及び 202、配列番号 205 及び 206、配列番号 209 及び 210、配列番号 213 及び 214、配列番号 217 及び 218、配列番号 221 及び 222、配列番号 225 及び 226、配列番号 229 及び 230、配列番号 233 及び 234、配列番号 237 及び 238、配列番号 241 及び 242、配列番号 245 及び 246、配列番号 249 及び 250、配列番号 253 及び 254、配列番号 257 及び 258、配列番号 261 及び 262、配列番号 265 及び 266、配列番号 269 及び 270、配列番号 273 及び 274、配列番号 277 及び 278、配列番号 281 及び 282、配列番号 285 及び 286、配列番号 289 及び 290、配列番号 293 及び 294、配列番号 297 及び 298、配列番号 301 及び 302、配列番号 305 及び 306、配列番号 309 及び 310、配列番号 313 及び 314、配列番号 317 及び 318、配列番号 321 及び 322、配列番号 325 及び 326、配列番号 329 及び 330、配列番号 333 及び 334、配列番号 337 及び 338、配列番号 341 及び 342、配列番号 345 及び 346、配列番号 349 及び 350、配列番号 353 及び 354、配列番号 357 及び 358、配列番号 361 及び 362、配列番号 365 及び 366、配列番号 369 及び 370、配列番号 373 及び 374、配列番号 377 及び 378、配列番号 381 及び 382、配列番号 385 及び 386、配列番号 389 及び 390、配列番号 393 及び 394、配列番号 397 及び 398、配列番号 401 及び 402、配列番号 405 及び 406、配列番号 409 及び 410。

10

20

30

40

50

【請求項 44】

前記 s c F v が、荷電 s c F v リンカーを含有する、請求項 42 又は 43 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 45】

荷電 s c F v リンカーが、図 9 に示されるものからなる群から選択される、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記 s c F v が、以下からなる群から選択される配列を有する、請求項 40 に記載の組成物：

配列番号 4、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16、配列番号 20、配列番号 24、配列番号 28、配列番号 32、配列番号 36、配列番号 40、配列番号 44、配列番号 48、配列番号 52、配列番号 56、配列番号 60、配列番号 64、配列番号 68、配列番号 72、配列番号 76、配列番号 80、配列番号 84、配列番号 88、配列番号 92、配列番号 96、配列番号 100、配列番号 104、配列番号 108、配列番号 112、配列番号 116、配列番号 120、配列番号 124、配列番号 128、配列番号 132、配列番号 136、配列番号 140、配列番号 144、配列番号 148、配列番号 152、配列

番号 1 5 6、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 4、配列番号 1 6 8、配列番号 1 7 2、配列  
 番号 1 7 6、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 8、配列番号 1 9 2、配列  
 番号 1 9 6、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 4、配列番号 2 0 8、配列番号 2 1 2、配列  
 番号 2 1 6、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 4、配列番号 2 2 8、配列番号 2 3 2、配列  
 番号 2 3 6、配列番号 2 4 0、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 8、配列番号 2 5 2、配列  
 番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 2、配列  
 番号 2 7 6、配列番号 2 8 0、配列番号 2 8 4、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 2、配列  
 番号 2 9 6、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 4、配列番号 3 0 8、配列番号 3 1 2、配列  
 番号 3 1 6、配列番号 3 2 0、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 2、配列  
 番号 3 3 6、配列番号 3 4 0、配列番号 3 4 4、配列番号 3 4 8、配列番号 3 5 2、配列  
 番号 3 5 6、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 2、配列  
 番号 3 7 6、配列番号 3 8 0、配列番号 3 8 4、配列番号 3 8 8、配列番号 3 9 2、配列  
 番号 3 9 6、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 4、配列番号 4 0 8。

10

【請求項 4 7】

以下からなる群から選択される可変重鎖領域及び可変軽鎖領域を含有する抗 C D 3 可変領  
 域をコードする核酸組成物：

配列番号 5 及び 6、配列番号 9 及び 1 0、配列番号 1 3 及び 1 4、配列番号 1 7 及び 1 8  
 、配列番号 2 1 及び 2 2、配列番号 2 5 及び 2 6、配列番号 2 9 及び 3 0、配列番号 3 3  
 及び 3 4、配列番号 3 7 及び 3 8、配列番号 4 1 及び 4 2、配列番号 4 5 及び 4 6、配列  
 番号 4 9 及び 5 0、配列番号 5 3 及び 5 4、配列番号 5 7 及び 5 8、配列番号 6 1 及び 6  
 2、配列番号 6 5 及び 6 6、配列番号 6 9 及び 7 0、配列番号 7 3 及び 7 4、配列番号 7  
 7 及び 7 8、配列番号 8 1 及び 8 2、配列番号 8 5 及び 8 6、配列番号 8 9 及び 9 0、配  
 列番号 9 3 及び 9 4、配列番号 9 7 及び 9 8、配列番号 1 0 1 及び 1 0 2、配列番号 1 0  
 5 及び 1 0 6、配列番号 1 0 9 及び 1 1 0、配列番号 1 1 3 及び 1 1 4、配列番号 1 1 7  
 及び 1 1 8、配列番号 1 2 1 及び 1 2 2、配列番号 1 2 5 及び 1 2 6、配列番号 1 2 9 及  
 び 1 3 0、配列番号 1 3 3 及び 1 3 4、配列番号 1 3 7 及び 1 3 8、配列番号 1 4 1 及び  
 1 4 2、配列番号 1 4 5 及び 1 4 6、配列番号 1 4 9 及び 1 5 0、配列番号 1 5 3 及び 1  
 5 4、配列番号 1 5 7 及び 1 5 8、配列番号 1 6 1 及び 1 6 2、配列番号 1 6 5 及び 1 6  
 6、配列番号 1 6 9 及び 1 7 0、配列番号 1 7 3 及び 1 7 4、配列番号 1 7 7 及び 1 7 8  
 、配列番号 1 8 1 及び 1 8 2、配列番号 1 8 5 及び 1 8 6、配列番号 1 8 9 及び 1 9 0、  
 配列番号 1 9 3 及び 1 9 4、配列番号 1 9 7 及び 1 9 8、配列番号 2 0 1 及び 2 0 2、配  
 列番号 2 0 5 及び 2 0 6、配列番号 2 0 9 及び 2 1 0、配列番号 2 1 3 及び 2 1 4、配列  
 番号 2 1 7 及び 2 1 8、配列番号 2 2 1 及び 2 2 2、配列番号 2 2 5 及び 2 2 6、配列番  
 号 2 2 9 及び 2 3 0、配列番号 2 3 3 及び 2 3 4、配列番号 2 3 7 及び 2 3 8、配列番号  
 2 4 1 及び 2 4 2、配列番号 2 4 5 及び 2 4 6、配列番号 2 4 9 及び 2 5 0、配列番号 2  
 5 3 及び 2 5 4、配列番号 2 5 7 及び 2 5 8、配列番号 2 6 1 及び 2 6 2、配列番号 2 6  
 5 及び 2 6 6、配列番号 2 6 9 及び 2 7 0、配列番号 2 7 3 及び 2 7 4、配列番号 2 7 7  
 及び 2 7 8、配列番号 2 8 1 及び 2 8 2、配列番号 2 8 5 及び 2 8 6、配列番号 2 8 9 及  
 び 2 9 0、配列番号 2 9 3 及び 2 9 4、配列番号 2 9 7 及び 2 9 8、配列番号 3 0 1 及び  
 3 0 2、配列番号 3 0 5 及び 3 0 6、配列番号 3 0 9 及び 3 1 0、配列番号 3 1 3 及び 3  
 1 4、配列番号 3 1 7 及び 3 1 8、配列番号 3 2 1 及び 3 2 2、配列番号 3 2 5 及び 3 2  
 6、配列番号 3 2 9 及び 3 3 0、配列番号 3 3 3 及び 3 3 4、配列番号 3 3 7 及び 3 3 8  
 、配列番号 3 4 1 及び 3 4 2、配列番号 3 4 5 及び 3 4 6、配列番号 3 4 9 及び 3 5 0、  
 配列番号 3 5 3 及び 3 5 4、配列番号 3 5 7 及び 3 5 8、配列番号 3 6 1 及び 3 6 2、配  
 列番号 3 6 5 及び 3 6 6、配列番号 3 6 9 及び 3 7 0、配列番号 3 7 3 及び 3 7 4、配列  
 番号 3 7 7 及び 3 7 8、配列番号 3 8 1 及び 3 8 2、配列番号 3 8 5 及び 3 8 6、配列番  
 号 3 8 9 及び 3 9 0、配列番号 3 9 3 及び 3 9 4、配列番号 3 9 7 及び 3 9 8、配列番号  
 4 0 1 及び 4 0 2、配列番号 4 0 5 及び 4 0 6、配列番号 4 0 9 及び 4 1 0。

20

30

40

【請求項 4 8】

前記核酸組成物が、変異重鎖領域をコードする第一の核酸、及び可変軽鎖領域をコードす

50

る第二の核酸、を含有する、請求項 4 7 に記載の核酸組成物。

【請求項 4 9】

前記抗 C D 3 可変領域が、s c F v を含有し、及び前記核酸が、以下からなる群から選択される s c F v アミノ酸配列をコードする、請求項 4 7 に記載の核酸組成物：

- 配列番号 4、配列番号 8、配列番号 1 2、配列番号 1 6、配列番号 2 0、配列番号 2 4、
- 配列番号 2 8、配列番号 3 2、配列番号 3 6、配列番号 4 0、配列番号 4 4、配列番号 4 8、配列番号 5 2、配列番号 5 6、配列番号 6 0、配列番号 6 4、配列番号 6 8、配列番号 7 2、配列番号 7 6、配列番号 8 0、配列番号 8 4、配列番号 8 8、配列番号 9 2、配列番号 9 6、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 8、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 6、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 8、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 6、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 8、配列番号 1 5 2、配列番号 1 5 6、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 4、配列番号 1 6 8、配列番号 1 7 2、配列番号 1 7 6、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 8、配列番号 1 9 2、配列番号 1 9 6、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 4、配列番号 2 0 8、配列番号 2 1 2、配列番号 2 1 6、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 4、配列番号 2 2 8、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 6、配列番号 2 4 0、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 8、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 2、配列番号 2 7 6、配列番号 2 8 0、配列番号 2 8 4、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 2、配列番号 2 9 6、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 4、配列番号 3 0 8、配列番号 3 1 2、配列番号 3 1 6、配列番号 3 2 0、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 2、配列番号 3 3 6、配列番号 3 4 0、配列番号 3 4 4、配列番号 3 4 8、配列番号 3 5 2、配列番号 3 5 6、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 2、配列番号 3 7 6、配列番号 3 8 0、配列番号 3 8 4、配列番号 3 8 8、配列番号 3 9 2、配列番号 3 9 6、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 4、配列番号 4 0 8。

10

20

【請求項 5 0】

前記核酸組成物が、前記第一の核酸を含有する第一の発現ベクター、及び前記第二の核酸を含有する第二の発現ベクターを含有する、請求項 4 8 又は 4 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記核酸組成物が、発現ベクターを含有する、請求項 5 0 に記載の組成物。

30

【請求項 5 2】

請求項 4 7 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の核酸組成物を含有する宿主細胞。

【請求項 5 3】

前記組成物が発現される条件下で、請求項 5 2 に記載の宿主細胞を培養することを含有する、抗 C D 3 可変領域を含有する組成物を作製する方法。

【請求項 5 4】

請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物をその必要のある患者に投与することによる、その必要のある患者を治療する方法。

【請求項 5 5】

以下を含有するヘテロ二量体抗体：

40

a ) 以下を含有する第一の重鎖：

i ) 第一の F c ドメイン；及び

i i ) 配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 (ここで、X a a 1 は N、S、又は H (配列番号 4 3 5))、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 (ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A (配列番号 4 3 6))、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 (ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D (配列番号 4 3 7))、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有す

50

る  $v1CDR1$  (ここで、 $Xaa1$  は G、R、又は K であり、 $Xaa2$  は T、又は S であり、 $Xaa3$  は S、又は G であり、及び  $Xaa4$  は、N、又は H (配列番号 438))、配列  $Xaa1 - T - N - Xaa2 - R - A - Xaa3$  を有する  $v1CDR2$  (ここで、 $Xaa1$  は G、又は D であり、 $Xaa2$  は、K、又は N であり、及び  $Xaa3$  は P、又は S (配列番号 439)) 及び配列  $Xaa1 - L - W - Y - S - N - Xaa2 - W - V$  を有する  $v1CDR3$  (ここで、 $Xaa1$  は A、又は L であり、及び  $Xaa2$  は、L、又は H (配列番号 440))、を含有する、CD3 に結合する一本鎖 Fv 領域 (scFv) ; 及び b) 以下を含有する第二の重鎖 :

i) 第二の Fc ドメイン ;

ii) 第一の可変重鎖 ; 及び

ii) 第一の可変軽鎖 ;

10

ここで、前記第一及び第二の Fc ドメインは異なっている。

【請求項 56】

以下を含有するヘテロ二量体抗体を作製する方法 :

a) 以下を含有する第一の重鎖をコードする第一の核酸を提供すること :

i) 以下を含有する第一の重鎖 :

1 第一の Fc ドメイン ; 及び

2 第一の抗原に結合する一本鎖 Fv 領域 (scFv) ;

ここで、前記 scFv は荷電リンカーを含有し ; 並びに、

b) 以下を含有する第二の重鎖をコードする第二の核酸を提供すること :

20

i) 第二の Fc ドメイン ;

ii) 第一の可変重鎖 ; 及び

c) 軽鎖を含有する第三の核酸を提供すること ;

d) 前記第一、第二、及び第三の核酸を、第一、第二及び第三のアミノ酸配列をそれぞれ産生する宿主細胞中で発現させること ;

e) イオン交換カラムに、前記第一、第二及び第三のアミノ酸配列をロードすること ; 及び

f) ヘテロ二量体分画を採取すること。

【請求項 57】

以下を含有するヘテロ二量体タンパク質を含有する組成物 :

30

a) 以下を含有する第一のモノマー :

i) 第一の変異重鎖定常領域 ;

ii) 第一の融合パートナー ; 及び

b) 以下を含有する第二のモノマー :

i) 第二の変異重鎖定常領域 ;

ii) 第二の融合パートナー ;

ここで、前記第一及び第二の変異重鎖定常領域の pI は、少なくとも 0.5 log 離れている。

【請求項 58】

以下を含有するヘテロ二量体タンパク質を含有する組成物 :

40

a) 以下を含有する第一のモノマー :

i) 第一の変異重鎖定常領域 ;

ii) 第一の融合パートナー ; 及び

b) 以下を含有する第二のモノマー :

i) 第二の変異重鎖定常領域 ;

ii) 第二の融合パートナー ;

ここで、前記第一及び第二の定常領域の Fc 領域は、図 3 及び 12 のアミノ酸置換のセットを含有する。

【請求項 59】

前記第一の融合パートナーが、scFv である、請求項 58 に記載の組成物。

50

## 【請求項 60】

前記第一の融合パートナーが、可変重鎖及び軽鎖を含有する、請求項 58 に記載の組成物。

## 【請求項 61】

前記ヘテロ二量体タンパク質が、図 1 B ~ 1 M 並びに図 2 A ~ 2 N、及び 2 P ~ 2 S の構造からなる群から選択される構造を有する、請求項 57 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 62】

前記ヘテロ二量体タンパク質が、図 1 B に記載される構造を有している、請求項 61 に記載の組成物。

10

## 【請求項 63】

前記ヘテロ二量体タンパク質が、図 1 M に記載される構造を有している、請求項 61 に記載の組成物。

## 【請求項 64】

前記第一のモノマーが、第三の融合パートナーを含有する、請求項 1 ~ 63 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 65】

前記第二のモノマーが、第四の融合パートナーを含有する、請求項 64 に記載の組成物。

## 【請求項 66】

前記融合パートナーが、イムノグロブリン成分、ペプチド、サイトカイン、ケモカイン、免疫受容体及び血液因子からなる群から、独立して選択される、請求項 1 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

## 【請求項 67】

前記イムノグロブリン成分が、F a b、V H、V L、s c F v、s c F v 2、d A b からなる群から選択される、請求項 66 に記載の組成物。

## 【請求項 68】

融合パートナーの両方が、イムノグロブリン成分である、請求項 1 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 69】

前記融合パートナーのうちの 1 つが、s c F v である、請求項 1 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

## 【請求項 70】

前記融合パートナーのうちの 1 つが、F a b である、請求項 1 ~ 69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 71】

1 つのモノマーの重鎖のうちの少なくとも 1 つの F c ドメインは、236 A、239 D、239 E、332 E、332 D、239 D / 332 E、267 D、267 E、328 F、267 E / 328 F、236 A / 332 E、239 D / 332 E / 330 Y、239 D、332 E / 330 L、236 R、328 R、236 R / 328 R、243 L、298 A 及び 299 T からなる群から選択されるアミノ酸変異を含有する、請求項 1 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

## 【請求項 72】

各モノマーの F c ドメインが、236 A、239 D、239 E、332 E、332 D、239 D / 332 E、267 D、267 E、328 F、267 E / 328 F、236 A / 332 E、239 D / 332 E / 330 Y、239 D、332 E / 330 L、236 R、328 R、236 R / 328 R、243 L、298 A 及び 299 T からなる群から選択されるアミノ酸変異を含有する鎖を含有する、請求項 1 ~ 71 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 73】

1 つのモノマー重鎖の内の少なくとも 1 つの F c ドメインが、434 A、434 S、42

50

8 L、3 0 8 F、2 5 9 I、4 2 8 L / 4 3 4 S、2 5 9 I / 3 0 8 F、4 3 6 I / 4 2 8 L、4 3 6 I 又は V / 4 3 4 S、4 3 6 V / 4 2 8 L、2 5 2 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E 及び 2 5 9 I / 3 0 8 F / 4 2 8 L からなる群から選択されるアミノ酸変異を含有する、請求項 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 4】

各モノマーのうちの F c ドメインが、4 3 4 A、4 3 4 S、4 2 8 L、3 0 8 F、2 5 9 I、4 2 8 L / 4 3 4 S、2 5 9 I / 3 0 8 F、4 3 6 I / 4 2 8 L、4 3 6 I 又は V / 4 3 4 S、4 3 6 V / 4 2 8 L、2 5 2 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E 及び 2 5 9 I / 3 0 8 F / 4 2 8 L からなる群から選択されるアミノ酸変異を含有する鎖を含有する、請求項 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権

本出願は、2 0 1 4 年 1 月 1 4 日に出願された国際特許出願 P C T / U S 1 4 / 1 1 5 4 9、2 0 1 4 年 1 月 1 4 日に出願された米国特許出願公開 1 4 / 1 5 5 , 3 3 4、2 0 1 4 年 3 月 1 1 日に出願された 1 4 / 2 0 5 , 2 4 8、及び 2 0 1 4 年 3 月 1 2 日に出願された 1 4 / 2 0 7 , 4 8 9 の一部継続出願である。さらに、本出願は、2 0 1 3 年 5 月 1 日に出願された米国特許出願公開 6 1 / 8 1 8 , 5 1 3、2 0 1 3 年 5 月 1 日に出願された 6 1 / 8 1 8 , 3 4 4、2 0 1 3 年 3 月 1 5 日に出願された 6 1 / 7 9 4 , 8 9 6、2 0 1 3 年 5 月 1 日に出願された 6 1 / 8 1 8 , 4 0 1、2 0 1 3 年 1 2 月 9 日に出願された 6 1 / 9 1 3 , 8 7 9、2 0 1 3 年 1 2 月 9 日に出願された 6 1 / 9 1 3 , 8 3 2、2 0 1 4 年 2 月 1 0 日に出願された 6 1 / 9 3 8 , 0 9 5、及び 2 0 1 3 年 1 2 月 9 日に出願された 6 1 / 9 1 3 , 8 7 0 の優先権を主張し、それらすべては、特に、それらに開示された図面及び関連説明文、並びにアミノ酸変異に関して、その全体で参照により本明細書に明示的に援用される。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

抗体ベースの治療剤を用いて、癌及び自己免疫疾患 / 炎症性疾患を含む様々な疾患を治療することに成功している。しかしながら、特に、臨床効果の増強に関し、この種の薬剤に対するさらなる改善が未だ必要とされている。研究されている 1 つの手段としては、1 つのイムノグロブリン分子が 2 つの異なる抗原を共捕捉するように、抗体ベースの薬剤に、追加の新規抗原結合部位を操作することである。そのような 2 つの異なる抗原を捕捉する非天然型又は代替抗体の形式は一般的に二重特異性抗体と呼ばれる。抗体可変領域 ( F v ) はかなりの多様性があるため、事実上、すべての分子を認識する F v を産生することが可能であり、典型的な二重特異性抗体の製造方法は、新たな可変領域の抗体への導入である。

30

【0 0 0 3】

二重特異性の標的化に関し、多くの代替抗体の形式が開発されてきた ( Chames & Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger & Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; Kontermann, mAbs 4(2):182 (2012)。それらすべては参照により本明細書に援用される)。当初、二重特異性抗体は、各々が 1 つのモノクローナル抗体を産生する 2 つの細胞株を融合することにより作製されていた ( Milstein et al., 1983, Nature 305:537-540)。得られたハイブリッドのハイブリドーマ又はクアドローマは二重特異性抗体を産生したが、ほんの少数の群のみであり、所望の抗体を単離するためには大掛かりな精製が必要であった。これを解決する方法が、二重特異性抗体を作製するための抗体断片の使用であった。そのような断片は全長抗体の複雑な四次構造を欠落しているため、可変軽鎖及び重鎖を、1 つの遺伝子構築物に連結することができる。ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、タンデム s c F v、及び F a b 2 二重特異性抗体等、多くの異なる形態の抗体断片が作製された ( Chames & Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9;

40

50

Holliger & Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 23[9]:1126-1136。本明細書に参照により明示的に援用される)。これらの形式は、細菌において高レベル発現することができ、小さなサイズであるため、浸透という有益な利点を有する一方で、*in vivo*では速やかに除去されてしまい、並びに、製造及び安定性に関連した製造上の難点がある。これら欠点の主な原因は、通常、その抗体断片が、その機能的特性(サイズを大きくすること、安定性を高くすること、及び血清半減期を長く維持する(すなわち、新生児Fc受容体FcRn)、又は精製のための結合部位として役に立つ(すなわち、プロテインA及びプロテインG)、様々なFc受容体及びリガンドに対する結合、が挙げられる)に関連した抗体の定常領域を欠いていることにある。

#### 【0004】

さらに最近になって、二重結合を全長抗体様の形式へと操作することにより、断片をベースとした場合の二重特異性抗体の欠点に対処する試みがなされている(Wu et al., 2007, *Nature Biotechnology* 25[11]:1290-1297; USSN12/477,711; Michaelsen et al., 2009, *mAbs* 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo et al., 2000, *Protein Engineering* 13[5]:361-367; USSN09/865,198; Shen et al., 2006, *J Biol Chem* 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, *J Biol Chem* 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; それらすべては参照により本明細書に明示的に援用される)。これらの形式により、抗体断片二重特異性抗体の欠点の一部が克服された(主に、Fc領域を含有することによる)。ただし、これら形態の1つの顕著な難点としては、同種二量体の定常鎖の頂点に新たな抗原結合部位を築くために、新たな抗原への結合が常に二価性になるということである。

#### 【0005】

治療用二重特異性形式の共標的として魅力的な多くの抗原に関し、望ましい結合は、二価性ではなく一価性である。多くの免疫受容体に対し、細胞活性化は、一価性の結合相互作用の架橋により行われる。架橋のメカニズムは多くの場合、抗体/抗原の免疫複合体により調節されているか、又は標的細胞とエフェクター細胞の結合を介して調節されている。たとえば、低いアフィニティのFc受容体(FcR。例えば、FcRIIa、FcRIIb及びFcRIIIa)は、抗体Fc領域に一価性で結合する。一価性の結合は、これらFcRを発現する細胞を活性化しないが、免疫複合体が形成されると、又は細胞と細胞が接触すると、受容体が架橋され、及び細胞表面上にクラスター化され、それにより活性化が導かれる。細胞殺傷の調節に与する受容体に関しては、例えばナチュラルキラー細胞(NK)上のFcRIIIaは、エフェクター細胞がより強く標的細胞を捕捉した際に、受容体の架橋及び細胞の活性化が発生する(Bowles & Weiner, 2005, *J Immunol Methods* 304:88-99。参照により明示的に援用される)。同様に、B細胞上では、阻害性受容体であるFcRIIbが、細胞表面のB細胞受容体(BCR)と共に免疫複合体を形成する際にのみ、B細胞活性化が下方制御され、そのメカニズムは、可溶性IgGとBCRにより認識される同抗原の免疫複合体により調節される(Heyman 2003, *Immunol Lett* 88[2]:157-161; Smith and Clatworthy, 2010, *Nature Reviews Immunology* 10:328-343。参照により明示的に援用される)。他の例としては、T細胞のCD3活性化は、その関連T細胞受容体(TCR)が、非常に強力な細胞と細胞のシナプスにおいて、抗原提示細胞上で抗原を担持するMHCを捕捉する場合にのみ、発生する(Kuhns et al., 2006, *Immunity* 24:133-139)。実際には、抗CD3抗体を用いた非特異的な二価性のCD3の架橋により、サイトカインストームと毒性が誘導される(Perruche et al., 2009, *J Immunol* 183[2]:953-61; Chatenoud & Bluestone, 2007, *Nature Reviews Immunology* 7:622-632。参照により明示的に援用される)。ゆえに、実際の臨床応用のためには、標的細胞殺傷転換に対する、CD3の共捕捉の好ましい様式は一価性の結合であり、それにより、共捕捉された標的が捕捉される場合にのみ、活性化がもたらされることとなる。

#### 【0006】

ゆえに、抗体断片から作製された二重特異性抗体には生物物理的、薬物動態的なハードル

10

20

30

40

50

がある一方で、全長抗体様の形態から作製されたものの欠点は、主要標的抗原が存在しない状況下では、多価性に、抗原を共捕捉してしまうことであり、それによって、非特異的な活性化が発生し、毒性が発生する可能性が生じる。本発明は、異なる標的抗原を多価性に共捕捉することができる新規な二重特異性形態のセットを導入することにより、この問題を解決するものである。さらに、本発明により、抗体を含むヘテロ二量体タンパク質の形成及び精製がより可能となる、新規ヘテロ二量体変異が開示される。

【発明の概要】

【0007】

1つの態様において、本発明により、第一の変異Fcドメイン及び第一の抗原結合ドメインを含有する第一の重鎖定常ドメインを含有する第一のモノマー、及び第二の変異Fcドメイン及び第二の抗原結合ドメインを含有する第二の重鎖定常ドメインを含有する第二のモノマー、を含有するヘテロ二量体抗体が開示される。

10

【0008】

さらなる態様において、ヘテロ二量体抗体は、第一のFcドメイン及び第一の抗原に結合する一本鎖Fv領域(scFv)を含有する重鎖を含有する第一のモノマーを含有し、ここで、当該scFvは、荷電scFvリンカーを含有する。ヘテロ二量体抗体はさらに、第二のFcドメイン及び第一の変重鎖及び第一の軽鎖を含有する第一の重鎖を含有する第二のモノマー、を含有する。さらなる態様において、この荷電リンカーは、3~8の正電荷、又は3~8の負電荷のいずれかを有しており、及び図9に示されるリンカーからなる群から選択される。

20

【0009】

さらなる態様において、本発明により、ヒトFcドメインと比較して、第一の変異Fcドメイン；及び第一の抗原に結合する第一の抗原結合ドメインを含有する第一の重鎖配列；並びに、ヒトFcドメインと比較して第二の変異Fcドメイン；及び第二の抗原と結合する第二の抗原ドメインを含有する第二の重鎖配列、を含有する第一のモノマーを含有し、ここで、当該第一及び第二のFcドメインは、図3に示されるアミノ酸セットからなる群から選択されるアミノ酸置換のセットを含有する、ヘテロ二量体抗体組成が開示される。

【0010】

さらなる態様において、本発明により、ヒトFcドメインと比較して第一の変異Fcドメインを含有する第一の重鎖配列；及び第一の抗原に結合する第一の抗原結合ドメイン；及びヒトFcドメインと比較して第二の変異Fcドメインを含有する第二の重鎖配列；及びCD19に結合する第二の抗原結合ドメイン、を含有する第一のモノマーを含有するヘテロ二量体抗体組成物が開示される。第二の抗原結合ドメインは、H1.227(配列番号X)のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及びL1.198(配列番号X)のアミノ酸配列及び図21に示される1.199(配列番号X)のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖を含有する。

30

【0011】

さらなる態様において、本発明により、ヒトFcドメインと比較して、第一の変異Fcドメイン、配列T-Y-A-M-Xaa1を有するvhCDR1(ここで、Xaa1はN、S、又はH(配列番号435))、配列R-I-R-S-K-Xaa1-N-Xaa2-Y-A-T-Xaa3-Y-Y-A-Xaa4-S-V-K-Gを有するvhCDR2(ここで、Xaa1はY、又はAであり、Xaa2はN、又はSであり、Xaa3はY、又はAであり、及びXaa4はD、又はA(配列番号436))、配列H-G-N-F-G-Xaa1-S-Y-V-S-W-F-Xaa2-Yを有するvhCDR3(ここでXaa1はN、D、又はQであり、及びXaa2はA、又はD(配列番号437))、配列Xaa1-S-S-T-G-A-V-T-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Y-A-Nを有するvlCDR1(ここで、Xaa1はG、R、又はKであり、Xaa2はT、又はSであり、Xaa3はS、又はGであり、及びXaa4は、N、又はH(配列番号438))、配列Xaa1-T-N-Xaa2-R-A-Xaa3を有するvlCDR2(ここで、Xaa1はG、又はDであり、Xaa2は、K、又はNであり、及びXaa3はP、又は

40

50

S (配列番号 439) ) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 (ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H (配列番号 440) ) を含有する配列を有する高 C D 3 可変領域を含有する第一の抗原結合ドメイン、を含有する第一の重鎖配列を含有する第一のモノマーを含有するヘテロ二量体抗体組成物が開示される。ヘテロ二量体抗体はさらに、ヒト F c ドメインと比較して、第二の変異 F c ドメイン；並びに、H 1 . 2 2 7 (配列番号 X) のアミノ酸配列を含有する可変重鎖ドメイン、及び L 1 . 1 9 8 (配列番号 X) のアミノ酸配列及び図 2 1 に示される 1 . 1 9 9 (配列番号 X) のアミノ酸配列からなる群から選択される可変軽鎖を含有する抗 C 1 9 抗原結合ドメインを含有する、第二の重鎖配列を含有する第二のモノマーを含有する。

10

## 【 0 0 1 2 】

さらなる態様において、本発明により、第一の変異 F c ドメインを含有する重鎖；及び第一の抗原に結合する一本鎖 F v 領域 ( s c F v ) を含有する第一のモノマー (ここで、s c F v は、荷電リンカーを含有する)；第二の変異 F c ドメイン及び第一の可変重鎖を含有する第一の重鎖を含有する第二のモノマー (第二のモノマーは、第一の軽鎖も含有する)、を含有するヘテロ二量体抗体が提示され、ここで、第一及び第二の変異 F c ドメインは、図 7 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換 (複数含む) を含有する。

## 【 0 0 1 3 】

さらなる態様において、本発明により、配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 (ここで、X a a 1 は N、S、又は H (配列番号 435) )、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 (ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A (配列番号 436) )、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 (ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D (配列番号 437) )、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有する v l C D R 1 (ここで、X a a 1 は G、R、又は K であり、X a a 2 は T、又は S であり、X a a 3 は S、又は G であり、及び X a a 4 は、N、又は H (配列番号 438) )、配列 X a a 1 - T - N - X a a 2 - R - A - X a a 3 を有する v l C D R 2 (ここで、X a a 1 は G、又は D であり、X a a 2 は、K、又は N であり、及び X a a 3 は P、又は S (配列番号 439) ) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 (ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H (配列番号 440) ) を含有する第一の抗原結合ドメインを含有する第一のモノマーを含有するヘテロ二量体抗体組成物が開示される。第一のモノマーはまた、ヒト F c ドメインに対し、第一の変異 F c ドメインを含有する第一の重鎖配列を含有する。ヘテロ二量体抗体はまた、第二の抗原結合ドメイン；及びヒト F c ドメインに対して第二の変異 F c ドメインを含有する第二の重鎖配列、を含有する第二のモノマーを含有し、ここで、第一及び第二の変異 F c ドメインは、異なるアミノ酸配列を有する。一部の実施態様において、抗 C D 3 可変領域は、配列 T - Y - A - M - X a a 1 を有する v h C D R 1 (ここで、X a a 1 は N、S、又は H (配列番号 435) )、配列 R - I - R - S - K - X a a 1 - N - X a a 2 - Y - A - T - X a a 3 - Y - Y - A - X a a 4 - S - V - K - G を有する v h C D R 2 (ここで、X a a 1 は Y、又は A であり、X a a 2 は N、又は S であり、X a a 3 は Y、又は A であり、及び X a a 4 は D、又は A (配列番号 436) )、配列 H - G - N - F - G - X a a 1 - S - Y - V - S - W - F - X a a 2 - Y を有する v h C D R 3 (ここで X a a 1 は N、D、又は Q であり、及び X a a 2 は A、又は D (配列番号 437) )、配列 X a a 1 - S - S - T - G - A - V - T - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - Y - A - N を有する v l C D R 1 (ここで、X a a 1 は G、R、又は K であり、X a a 2 は T、又は S であり、X a a 3 は S、又は G であり、及び X a a 4 は、N、又は H (配列番号 438) )、配列 X a a 1 - T - N - X a a 2 - R - A -

20

30

40

50

X a a 3 を有する v l C D R 2 (ここで、X a a 1 は G、又は D であり、X a a 2 は、K、又は N であり、及び X a a 3 は P、又は S (配列番号 439)) 及び配列 X a a 1 - L - W - Y - S - N - X a a 2 - W - V を有する v l C D R 3 (ここで、X a a 1 は A、又は L であり、及び X a a 2 は、L、又は H (配列番号 440)) を含有する。

【0014】

本発明のさらなる態様において、第一の変異重鎖定常領域及び第一の融合パートナーを含有する第一のモノマー；並びに、第二の変異重鎖定常領域及び第二の融合パートナーを含有する第二のモノマー、を含有するヘテロ二量体タンパク質を開示し、ここで、第一及び第二の定常領域の F c 領域は、図 3 及び図 12 からのアミノ酸置換のセットを含有する。一部の例において、第一のモノマーは、第三の融合パートナーを含有し、及び任意選択的に、第二のモノマーは、第四の融合パートナーを含有する。融合パートナーは、独立して、イムノグロブリン成分、ペプチド、サイトカイン、ケモカイン、免疫受容体、及び血液因子からなる群から選択される。一部の例において、イムノグロブリン成分は、F a b、V H、V L、s c F v、s c F v 2、d A b からなる群から選択される。

10

【0015】

多くの態様において、第一及び第二の変異 F c ドメインのうちの一つは、図 6、7 及び / 又は 12 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸置換 (複数含む) を含有する。一部の態様において、第一の抗原結合ドメインは、第一の重鎖定常ドメインに共有結合された s c F v である。さらなる態様において、ヘテロ二量体抗体は、図 1 B ~ 1 L、及び 2 A ~ 2 M の構造から選択される構造を有している。さらなる態様において、ヘテロ二量体抗体の第一及び / 又は第二の F c ドメインはさらに、434 A、434 S、428 L、308 F、259 I、428 L / 434 S、259 I / 308 F、436 I / 428 L、436 I 又は V / 434 S、436 V / 428 L、252 Y、252 Y / 254 T / 256 E、259 I / 308 F / 428 L、236 A、239 D、239 E、332 E、332 D、239 D / 332 E、267 D、267 E、328 F、267 E / 328 F、236 A / 332 E、239 D / 332 E / 330 Y、239 D、332 E / 330 L、236 R、328 R、236 R / 328 R、236 N / 267 E、243 L、298 A 及び 299 T からなる群から選択されるアミノ酸置換 (複数含む) を含有する。一部の態様において、第一及び第二の変異 F c ドメインのうちの一つは、364 K / E357 Q のアミノ酸置換を含有し、他方は、368 D / 370 S のアミノ酸置換を含有する。これら抗体はさらに、図 7 にリストアップされるものからなる群から選択されるアミノ酸置換 (複数含む) を含有しても良い。

20

30

【0016】

本発明のさらなる態様において、本発明のヘテロ二量体タンパク質及び抗体を産生する核酸、発現ベクター及び宿主細胞が開示される。

【0017】

本発明のさらなる態様において、本発明のヘテロ二量体タンパク質及び抗体をコードする核酸を含有する宿主細胞を、当該ヘテロ二量体が産生され、及び回収される条件下で培養することによる、本発明のヘテロ二量体タンパク質の製造方法が開示される。

【0018】

本発明のさらなる態様において、第一の抗原に結合する一本鎖 F v 領域 (s c F v) 及び第一の F c ドメインを含有する第一の重鎖を含有する第一の重鎖をコードする第一の核酸を提供すること (ここで、前記 s c F v は、荷電リンカーを含有する)；及び第二の F c ドメイン 第一の可変重鎖を含有する第二の重鎖をコードする第二の核酸を提供すること；及び軽鎖を含有する第三の核酸を提供すること、を含有する、本発明のヘテロ二量体抗体を作製する方法が開示される。当該方法はさらに、第一、第二及び第三のアミノ酸配列を産生するために、それぞれ、宿主細胞中で、第一、第二、及び第三の核酸を発現すること、第一、第二、第三のアミノ酸配列をイオン交換カラムにロードすること；及びヘテロ二量体分画を採取すること、を含む。

40

【0019】

50

さらなる態様において、本発明により、本明細書のヘテロ二量体抗体又はタンパク質を投与することによる、その必要のある個体を治療する方法が開示される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

ヘテロ二量体化の形式及び変異

【図1】1A~1Mは、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質並びにヘテロ二量体抗体を含有する、多くのヘテロ二量体タンパク質形式を示す。図1Aは、4つの可能性のある融合パートナーである、A、B、C及びDを有する二量体Fc領域の基本的コンセプトを示す。A、B、C及びDは任意選択的に、及び独立して、イムノグロブリンドメイン(複数含む)(例えば、Fab、vH、vL、scFv、scFv<sub>2</sub>、scFab、dAb等)、ペプチド(複数含む)、サイトカイン(例えば、IL-2、IL-10、IL-12、GCSF、GM-CSF等)、ケモカイン(複数含む)(例えば、RANTES、CXCL9、CXCL10、CXCL12等)、ホルモン(複数含む)(例えば、FSH、成長ホルモン)、免疫受容体(複数含む)(例えば、CTLA-4、TNFR1、TNFR1I、他のTNFSF、他のTNFRSF等)、及び血液因子(複数含む)(例えば、第VII因子、第VII因子、第IX因子等)から選択される。白色又は黒色のドメインは、本明細書に概要されるヘテロ二量体化変異を用いて操作されているものである。図1Bは、「三重F」形式を示す(場合によって、以下に検討される「栓抜き型」構造とも呼称される)。図1Cは、Fabモノマーに付加された他のscFvを有する「三重F」構造を示す(これは、図1Fと共に、さらにより大きな分子量差を有する)。図1Dは、scFvモノマーに付加された他のscFvを有する「三重F」を示す。図1Eは、「3つのscFv」形式を示す。図1Fは、Fabモノマーに付加された追加のFabを示す。図1Gは、scFvモノマーのうちの1つに接続されたFabを示す。図1H~1Lは、「三重F」形式の「高度な多重特異性」の実施態様のさらなる型を示し、すべて、scFvを含有する1つのモノマーを伴う(及びそれらすべて、ヘテロ二量体の精製に利用することができる分子量差を有している)。図1Hは、2つの異なる抗原に結合する「Fab-Fv」形式を示し、図1Iは、1つの抗原に結合する「Fab-Fv」形式を示す(例えば、抗原1に対する二価性の結合)。図1J及び1Kは、同様の二価性又は一価性の追加の抗原結合を有する「Fv-Fab」形式を示す。図1Lは、第二のscFvに付加されたCH1-CLを有する1つのモノマーを示す。図1Mは、二重scFv形式を示す。一部の  
10  
20  
30

実施態様において、三重F形式は好ましくない。

【図2】2A~2Uは、様々な多重特異性(例えば、ヘテロ二量体化)の形式、及び本発明において用いることができる様々なタイプのヘテロ二量体化変異の組み合わせを示す(これらは場合によって、本明細書において、「ヘテロ二量体スキャホールド」と呼称される)。これらすべての形式は、Fc領域における追加の変異(「欠落」又は「ロックアウト」変異(図7)、FcR(FcRIIb、FcRIIIa等)結合を変えるFc変異、FcRn受容体への結合を変えるFc変異等)(以下に詳述される)を含有しうることにさらに注記されたい。図2Aは、本明細書のすべてのヘテロ二量体化形式に関し、二重scFv-Fc形式が、例えばpl変異、knobs in holes(KIH、本明細書において、立体構造変異又は「ねじれ」変異とも呼称される)、電荷対(立体構造変異のサブセット)、等配電子変異、及びヒトIgG及びIgAのCH3ドメインは互いに結合しないという事実に基づいたSEED体(「鎖交換操作ドメイン(strand-exchange engineered domain)」、Klein et al., mAbs 4:663-663 (2012) and Davis et al, Protein Eng Des Sel 2010 23:195-202を参照のこと)等のヘテロ二量体化変異を含有することができることを示す。図2Bは、再度、様々なヘテロ二量体化変異の選択とともに、二重特異性IgGを示す。図2Cは、2つの異なる可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインを利用する「片腕型」のDVD-Igを示す。図2Dも、「空の腕」よりも、可変重鎖及び軽鎖が反対側の重鎖上にあることを除き、同様である。図2Eは、通常、「mAb-Fv」と呼称される。図2Fは、多重scFv-形式を示し、当業者に認識されているように、及び本明細書に検討される  
40  
50

「A、B、C、D」形式と同様に、任意の数の関連 s c F v (又はその点に関しては、任意の他のリガンド結合又は機能性)であってもよい。ゆえに、図 2 F は、1、2、3又は4つの s c F v を有してもよい(例えば、二重特異性に対しては、s c F v は、「シス」もしくは「トランス」であってもよく、又は分子の1つの「末端」上に両方であってもよい)。図 2 G は、2つの異なる重鎖により形成された F a b を有するヘテロ二量体 F a b F c を示し、1つは、重鎖 F a b 配列を含有し、及び他方は、軽鎖 F a b 配列を含有する。図 2 H は、「片腕型 F a b - F c」を示し、1つの重鎖が F a b を含有する。図 2 I は、「片腕型 s c F v - F c」を示し、ここで、1つの重鎖 F c は、s c F v を含有し、及び他方の重鎖は、「空」である。図 2 J は、s c F v - C H 3 を示し、ここで、重鎖 C H 3 領域のみが用いられ、各々が自身の s c F v を有している。図 2 K は、m A b - s c F v を示し、ここで、分子の一端が、抗原を二価性に捕捉し、重鎖のうちの1つの s c F v を用いて一価性に捕捉する。図 2 L は、両方の重鎖がさらなる s c F v を含有している点を除き、同じ構造を示しており、同じ抗原又は異なる抗原のいずれかに結合することができる。図 2 M は、「C r o s s M a b」構造を示し、2つの異なる軽鎖による多重構造の問題点が、F a b 部分の配列を切り替えることにより対処されている。図 2 N は、s c F v を示し、図 2 O は、本明細書に概要されるリンカーにより連結されている「B i T E」又は s c F v - s c F v であり、図 2 P は D A R T を示し、図 2 Q は T a n d A b を示し、及び図 2 R はダイアボディを示す。図 2 S、図 2 T 及び図 2 U は、本発明に用途が見出されるさらなる代替スキャホールド形式を示す。

10

【図 3】本発明のヘテロ二量体タンパク質における使用に対する、多くの適切なヘテロ二量体化変異(ねじれ/立体構造変異、等配電子変異、p I 変異、K I H 変異等を含む)を示す。本明細書の全てのヘテロ二量体構造に関し、任意選択的に及び独立して、並びに、ヘテロ二量体スキャホールドにおける任意の組み合わせにおいて、これらヘテロ二量体化変異の各セットを組み合わせることができる。モノマー 1 リストの最後の変異は、等配電子 p I 変異であり、通常、対又はセットで用いられることはない。この場合においては、他のモノマーを改変することなく、1つのモノマーを操作して p I を増加又は減少させる。ゆえに、「モノマー 1」のリスト中に示されてはいるが、これらは、「鎖状構造らしさ」を維持しつつ、適切なモノマーに組み込まれることができる。すなわち、重要なことは、立体構造リスト中の「モノマー 1」変異としてリストアップされている変異は、p I リスト中の「モノマー 2」の変異と交差することができるが、モノマー対の「鎖状構造らしさ」はそのままに保たれているということである。すなわち、関連付けられている「モノマー」リストに関わらず、任意のセットを、任意の他のセットと組み合わせることができ(以下に詳述される)、ヘテロ二量体タンパク質精製のために p I 変異が用いられる場合、「p I の鎖状構造らしさ」もまた保存される;例えば、電荷を図らずも変えてしまうねじれ変異がある場合、それらは、正しい鎖上で p I 変異と対形成される; p I の増加をもたらすねじれ変異は、増加 p I 変異を有するモノマーに付加される。これは、荷電 s c F v リンカーの付加に対しても同様であり;その場合、本明細書により詳述されるように、正しく荷電された s c F v リンカーが、正しいモノマーに付加され、p I 差が保持される。さらに、アミノ酸変異の各対(又は1つのモノマーが操作されている場合)は、任意選択的に、及び独立して、任意のヘテロ二量体タンパク質に含まれ、又は除外されることができ、並びに、任意選択的に、及び独立して、組み合わせることができる。

20

30

40

【図 4】A、B 及び C は、本発明における用途が特に見出される、図 3 のヘテロ二量体化変異のサブセットを示す。

【図 5】図 3 のヘテロ二量体化変異のサブセットを示す。

【図 6】アイソタイプ変異抗体定常領域及び等配電子変異抗体定常領域、及びそれら各々の置換のリストを示す。p I  $\_$  ( - ) は、低い p I 変異を示し、一方、p I  $\_$  ( + ) は、高い p I 変異を示す。これらは、任意選択的に、及び独立して、本発明の他のヘテロ二量体化変異を組み合わせることができる。

【図 7】F c R 受容体の一部又はすべてに対する結合を減少させるための、多くの適切な「ロックアウト」(K O) 変異を示す。本明細書の多くの変異(すべてではない)に対

50

して、これら K O 変異は、独立して、及び任意選択的に、図 3 5 に示されるセット内と、及び本明細書に概要される任意のヘテロ二量体化変異（立体構造変異及び p I 変異を含む）の両方と組み合わせることができる。例えば、E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l は、リストの任意の他の一重又は二重変異と組み合わせることができる。さらに、一部の実施態様においては、両方のモノマーが同じ K O 変異を含有することが好ましいが、異なるモノマーに異なる K O 変異を組み合わせることも可能であり、並びに、1 つのモノマーのみが K O 変異（複数含む）を含有することも可能である。「ノックアウト」又は「欠落」変異に関し、U S S N 6 1 / 9 1 3 , 8 7 0 の図面及び説明に関する参照がなされ、それらすべてがその全体において参照において明示的に援用される。

【図 8】多くの抗 C D 3 s c F v 操作ジスルフィドを示す。

【図 9】構成要素として 1 以上の s c F v を用いる、ヘテロ二量体タンパク質の p I の増加又は減少における用途が見出される多くの荷電 s c F v リンカーを示す。1 つの電荷を有する 1 つの s c F v リンカーの先行技術は、Whitlow et al., Protein Engineering 6(8):989-995 (1993) にあり、「Whitlow」として呼称されている。このリンカーは、s c F v における、凝集の低下及びタンパク分解性の安定性を増強するために用いられていたことに注記されたい。

【図 10】A 及び B は、本発明の使用に可能性のあるヘテロ二量体変異（アイソタイプ変異を含む）の追加のリストである。

【図 11】ヘテロ二量体形式、ヘテロ二量体化変異（p I 変異と立体構造変異（電荷対変異を含む）に分けられる）、F c 変異、F c R n 変異及び組み合わせの可能性のある可能性のマトリクスを示す。凡例 A は、適切な F c R n 変異である：4 3 4 A、4 3 4 S、4 2 8 L、3 0 8 F、2 5 9 I、4 2 8 L / 4 3 4 S、2 5 9 I / 3 0 8 F、4 3 6 I / 4 2 8 L、4 3 6 I 又は V / 4 3 4 S、4 3 6 V / 4 2 8 L、2 5 2 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E 及び 2 5 9 I / 3 0 8 F / 4 2 8 L。すなわち、図 1 B の三重 F 形式は、これら F c R n 変異の内の任意のものを、いずれか、又は両方のモノマー配列上に有することができる。明確に述べれば、各重鎖は異なっているため、F c R n 変異（並びに F c 変異）は、1 つ又は両方のモノマーに存在することができる。凡例 B は、適切な F c 変異である：2 3 6 A、2 3 9 D、2 3 9 E、3 3 2 E、3 3 2 D、2 3 9 D / 3 3 2 E、2 6 7 D、2 6 7 E、3 2 8 F、2 6 7 E / 3 2 8 F、2 3 6 A / 3 3 2 E、2 3 9 D / 3 3 2 E / 3 3 0 Y、2 3 9 D、3 3 2 E / 3 3 0 L、2 3 6 R、3 2 8 R、2 3 6 R / 3 2 8 R、2 3 6 N / 2 6 7 E、2 4 3 L、2 9 8 A 及び 2 9 9 T。（追加の適した F c 変異は、U S 2 0 0 6 / 0 0 2 4 2 9 8 の図 4 1 にあり、その図及び説明文は、その全体で参照により本明細書に援用されることに注記されたい）。本明細書の一部の場合において、「ノックアウト」又は「欠落」変異は、例えば図 7 に示されるように用いられ、及びそれらは、F c 変異の定義に含まれる。F c R n 変異に関しては、F c 変異は、いずれかの鎖に存在することができる。凡例の C は、適した p I 変異であり、これらは、簡潔さのために図 3 及び 1 2 から引用されているが、p I 変異に対する「鎖状構造らしさ」が存在することを再度理解されたい。凡例の D は、適した立体構造変異であり（電荷対変異を含む）；これらは、簡潔さのために図 3、及び 1 2 から再度引用されているが、立体構造変異に対する「鎖状構造らしさ」が存在することを再度理解されたい。凡例の E は、以下の可能性のある組み合わせを反映しているものであり、各変異は、独立して、及び任意選択的に、再度、適切な凡例の源から組み合わせられている：1) p I 変異 + F c R n 変異；2) p I 変異 + F c 変異；3) p I 変異 + F c R n 変異 + F c 変異；4) 立体構造変異 + F c R n 変異；5) 立体構造変異 + F c 変異；6) 立体構造変異 + F c R n 変異 + F c 変異；7) p I 変異 + 立体構造変異 + F c R n 変異；8) p I 変異 + 立体構造変異 + F c 変異；9) p I 変異 + 立体構造変異 + F c R n 変異 + F c 変異；及び 10) p I 変異 + 立体構造変異。これらの組み合わせのすべて、及び任意のものは、任意選択的に、いずれか、又は両方のモノマーのノックアウト/欠落変異を含有又は除外することができることに注記されたい。

【図 12】A ~ J は、追加のヘテロ二量体化変異の対を示す。本発明の個別配列

【図13】本発明及び I g G 1 / G 2 融合に用いられる野生型定常領域のアミノ酸配列を示す。

【図14】A ~ Y Y は、安定性 - 最適化されたヒト化抗 C D 3 変異 s c F v、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列のアミノ酸配列を示す。(第一の配列は、精製を容易にするためのヒスチジンタグ化されていることにも注記されたい)。C D R は下線を引いてある。最適化された可変及び最適化された軽鎖(並びに s c F v 鎖)の安定性の増加は、フレームワーク領域並びに C D R に起因するものであってもよいことを理解されたい。ゆえに、それらは別々にナンバリングされているが、可変領域全体の開示には、フレームワーク領域の開示も含まれることを理解されたい。さらに、s c F v リンカーはグレーで示されている。各 s c F v リンカーは、図5に示される荷電 s c F v リンカーと置換されてもよい。すなわち、正又は負のいずれであっても、任意の荷電 s c F v リンカー(図5に示されるものを含む)は、図3A ~ 3Y Y に強調された領域に対し置換されることができる。

10

【図15】A ~ I は、本発明に有用なすべての C D 3 v h C D R 1 ~ 3 及び v l C D R 1 ~ 3 配列に関する情報を示す。コンセンサス C D R の配列は、図の最後に示す。図6は示す。

【図16】荷電リンカーが付加された X E N P 1 2 9 1 2 ( C D 3 s c F v + ジスルフィド)である、X E N P 1 3 7 9 0 の配列を示す。

【図17】A、B 及び C。A は、2つの異なる三重 F の実施態様を示す。B 及び C は、図17Aの三重 F 実施態様の配列を示す。

【図18】本発明の好ましい実施態様の配列を示す。可変領域は下線を引いてあり、荷電 s c F v リンカーはグレーである。

20

【図19】A 及び B。安定性 - 最適化されたヒト化抗 C D 1 9 変異 s c F v に対する T m 及び T m における変化。アミノ酸のナンバリングは K a b a t のナンバリングである。図19Aは、D S F (示差走査蛍光光度法)により、0.2 mg / m l の濃度で測定された安定性 - 最適化されたヒト化抗 C D 1 9 変異 s c F v のものであり、図19Bは0.4 mg / m l で行われたものである。

【図20】A ~ K。安定性 - 最適化されたヒト化抗 C D 1 9 変異 s c F v、可変重鎖及び可変軽鎖配列のアミノ酸配列である。(第一の配列は、精製を容易にするためのヒスチジンタグ化されていることにも注記されたい)。最適化された可変及び最適化された軽鎖(並びに s c F v 鎖)の安定性の増加は、フレームワーク領域並びに C D R に起因するものであってもよいことを理解されたい。ゆえに、それらは別々にナンバリングされているが、可変領域全体の開示には、フレームワーク領域の開示も含まれることを理解されたい。

30

【図21】安定化された抗 C D 1 9 F v 領域を示す。

【図22】A 及び B は、二重 s c F v 構築物を示す(例えば、図1Mに示されている)

【図23】A 及び B は、「栓抜き型」構築物を示す(例えば、図1Bに示されている)

【図24】A ~ K は、等配電子ヘテロ二量体化変異を含む、本発明の追加の配列を示す。

#### データマテリアル

【図25】安定化抗 C D 1 9 可変領域 - 標識抗 C D 1 9 I g G 1 (1 μ g / m l) との競合結合。

【図26】二重 s c F v - F c 形式、抗 C D 3 / 抗 C D 1 9 対と、同じ s c F v を使用しているが、F c 領域は無い、「B i T E」形式の特徴解析及び比較を示す。示されるように、二重 s c F v - F c は、B i T E 形式よりも効果は少ないが、F c 領域の付加により、マウスにおいて10倍まで半減期が延長される。

40

【図27】R T C C テストにおける、カニクイザル抗原と各々交差反応する s c F v 部分を示す。すなわち、形式間の有効性の差(二重 s c F v - F c と B i T E)は、カニクイザルへと持ち越される。

【図28】半減期の差も、2つの形式間でカニクイザルへと持ち込まれることを示す。二重 s c F v - F c は、示されるように3つの異なる濃度で用いられた。

【図29】サルにおける薬力学的予測を示す(E C 5 0 よりも高い血清濃度期間は、B i T E よりも二重 s c F v - F c のほうが長い(2 ~ 3日に対して、2 ~ 3週))。

50

【図30】二重 s c F v - F c 二重特異性形式を用いた場合の、広範で延長された B 細胞殺傷を示す。この形式によって P K が延長されることにより、14日まで、B細胞枯渇が延長された。

【図31】抗 C D 3 / 抗 C D 1 9 s c F v - F c 部分の安定性操作を示す。希少アミノ酸を特定及び置換すること、独特な接触残基を有するアミノ酸を特定及び置換すること、リンカーを操作し、及び V L - V H 方向へと転換することにより、大幅な安定性の増加が得られた。

【図32】安定化の結果としてマウスにおける P K が改善され、それにより、抗 C D 1 9 の安定化に関し、マウスにおける半減期が二倍となったことを示す。

【図33】「三重 F」又は「栓抜き型」（又は一部の図において、F a b - s c F v - F c と呼称される）の産生及び精製を示す。 10

【図34】標的抗原に対する一価性の結合のみで、ピコモルの細胞毒性を示す抗 C D 1 9 / 抗 C D 3 三重 F 形式の特徴を示す。

【図35】二重 s c F v - F c のうちの1つの s c F v を F a b と交換することから得られた、マウスにおける P K の改善を示す。抗 C D 1 9 s c F v を F a b と交換することにより、B L / 6 マウスにおける半減期が3日から6日へと2倍になる。

【図36】三重 F 形式に対する「プラグアンドプレイ ( p l u g a n d p l a y ) プラットフォーム」に関するスキームを示す。任意の存在する m A b 由来の F a b は、抗 C D 3 s c F v - F c 二重特異性形式と組み合わせることができる。

【図37】A 及び B は、三重 F 形式と、存在する抗体の「プラグアンドプレイ」の組み合わせの特徴を示す。41A は、抗 C D 3 8 F a b と抗 C D 3 s c F v が三重 F 形式へ、及び図41B は H e r 2 / C D 3 の組み合わせを示す。 20

【図38】本発明の変異を用いた、ヘテロ二量体化への著しい「ねじれ」を示す。F c 変異を有していない同じ分子と比較し、1つのモノマーが L 3 6 8 E / K 3 7 0 T を有し、他方が S 3 6 4 K を有するものを用いて、95%を超えるヘテロ二量体化が達成された。

【図39】B i T E 形式と比較した、二重 s c F v 形式を用いたカニクイザルのリンパ節及び脾臓における B 細胞の枯渇を示す。

【図40】等配電子 p I 置換を含有するベバシズマブ、F c のみ、及び抗 C D 1 9 x C D 3 ヘテロ二量体のリストである。予測される各タンパク質種の p I 値を示している。

【図41】等配電子操作定常領域を含有するベバシズマブのヘテロ二量体種の精製を示す、カチオン交換クロマトグラフィーである。 30

【図42】等配電子操作定常領域を含有する F c のみの変異のヘテロ二量体種の精製を示すカチオン交換クロマトグラフィーである。

【図43】等配電子操作定常領域を含有する抗 C D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体のヘテロ二量体種の精製を示すカチオン交換クロマトグラフィーである。また、プロテイン A 精製物質並びに単離ヘテロ二量体二重特異性抗体の I E F ゲルを示す。

【図44】等配電子 p I 置換を含有する F c のみの変異体及びベバシズマブのリスト、並びに D S F から得られた T m 値。

【図45】正荷電リンカー及び負荷電リンカーを含有する抗 C D 3 及び抗 C D 1 9 s c F v のリストである。D S F の T m 値もまた示す。 40

【図46】正荷電リンカーを有する精製 s c F v の S E C クロマトグラムの例である。

【図47】P B M C 由来の C D 4 + T 細胞 ( 左 ) に結合する、又は C D 2 0 + 細胞に結合する、正荷電リンカーを含有する抗 C D 3 s c F v の直接的結合 ( 非特異性結合をチェックするため ; 右 ) 。

【図48】P B M C ( 左 ) 又は 2 9 3 E 細胞 ( 右 ) 由来の C D 2 0 + 細胞に結合する正荷電リンカーを含有する抗 C D 3 s c F v の直接的結合。

【図49】C D 1 9 及び C D 3 を標的とする F a b - s c F v - F c 形式の二重特異性抗体である、X E N P 1 3 1 2 4 のカチオン交換精製の例である。抗 C D 3 s c F v は、精製を可能とするための正荷電リンカー ( G K P G S ) 4 を含有している。

【図50】様々な濃度でインキュベートされた、C D 1 9 及び C D 3 を標的とする精製 F 50

a b - s c F v - F c 形式の二重特異性抗体の S E C クロマトグラム の例である。X E N P 1 3 1 2 1 ( 左 ) は標準的な ( G G G G S ) 4 リンカーを含有し、一方で、X E N P 1 3 1 2 4 ( 右 ) は、( G K P G S ) 4 荷電リンカーを含有している。荷電リンカーは、存在する高分子量凝集体の量を減少させるという予想外の特性を有している。

【図 5 1】異なる s c F v リンカーを含有する F a b - s c F v - F c 形式の二重特異性 C D 1 9 x C D 3 抗体及び P B M C を用いた R T C C アッセイである。リンカーは、低い活性を有する高荷電リンカー ( G K G K S ) 3 を除き、R T C C 活性に対しほとんど影響は無い。

【図 5 2】A ~ O は、荷電 s c F v リンカーを含有する本発明の配列並びに対応する対照を示す。その他の材料

【図 5 3】20 アミノ酸の文献上の p I である。列記された p I は、遊離アミノ酸として算出されたものであり、タンパク質の場合において実際の任意の側鎖の p I は異なっていること、及びそれゆえに、このリストは p I の傾向を示すために用いられたものであり、本発明の目的に対し、絶対的な数値ではないことに注記されたい。

【図 5 4】A、B 及び C。I g G 1 ~ 4 のアイソタイプ置換から生成されるすべての可能性のある p I 低下変異のリストである。変異重鎖が I g G 1 - W T 重鎖を用いてトランスフェクトされた場合に存在するヘテロ二量体種と 2 つの同種二量体種の間、3 つの予測種に対する p I 値、並びに、平均デルタ p I を示している。

【図 5 5】I g G 1 ~ 4 のアイソタイプ置換から生成されるすべての可能性のある p I 増加変異のリストである。変異重鎖が I g G 1 - W T 重鎖を用いてトランスフェクトされた場合に存在するヘテロ二量体種と 2 つの同種二量体種の間、3 つの予測種に対する p I 値、並びに、平均デルタ p I を示している。

【図 5 6】C K おおび C 定常軽鎖のアミノ酸配列を示す。高い p I ( K、R 及び H ) 又は低い p I ( D 及び E ) に寄与する残基は太字で強調されている。p I を低下させるための好ましい修飾の位置は、グレーで示している。1 以上の軽鎖を含有するスキャホールドに関しては、これら変化を用いて、1 又は両方のモノマーの p I を改変することができ、並びに、独立して及び任意選択的にすべての重鎖変異と組み合わせることができる。

【図 5 7】A ~ E は、多くのジスルフィド構築物の配列を示す；1 番目の配列は、精製を容易にするための H i s ( 6 ) タグを含有する s c F v 構築物であり、2 番目の配列はタグを有していない s c F v 構築物であり、3 番目の配列は、可変重鎖のみであり、4 番目の配列は、可変軽鎖のみである。C D R は下線を引いてある。

【発明を実施するための形態】

【0021】

W O / 2 0 1 3 / 0 5 5 8 0 9 の図 6 6 ~ 8 0 は、配列及び関連する説明文であり、本明細書に具体的に参照により援用される。U S S N 1 3 / 6 4 8 , 9 5 1 の図 2 ~ 1 1 1 及びそれらの説明分は、参照により本明細書に具体的に援用される。

【0022】

I . ヘテロ二量体タンパク質の概要

本発明は、2 以上の抗原又はリガンドに結合することができる ( 例えば、多特異的結合が可能な ) ヘテロ二量体タンパク質をもたらす新規構築物を目的としている。ヘテロ二量体タンパク質構築物は、抗体重鎖の 2 つの F c ドメインが自己アセンブリを行う性質 ( 例えば、2 つの「モノマー」が「ダイマー」へとアセンブリする ) に基づいている。ヘテロ二量体タンパク質は、以下に詳述される、各モノマーのアミノ酸配列を改変することにより作製される。ゆえに、本発明は概して、数種の方法で抗原を共捕捉することができる抗体を含有するヘテロ二量体タンパク質の作製を目的とするものであり、ヘテロ二量体の形成を促進する、及び / 又は同種二量体よりもヘテロ二量体の精製を容易とするための、各鎖で異なる定常領域におけるアミノ酸変異に依っている。以下に詳述されるように、ヘテロ二量体タンパク質は、抗体変異体であってもよく、又は F c 融合タンパク質に基づいてもよい。概して、ヘテロ二量体抗体に本発明の焦点があるが、当業者に明らかであり、以下に詳述されるように、本発明は、ヘテロ二量体タンパク質にも等しく適用される。

10

20

30

40

50

## 【0023】

ゆえに、本発明により、二重特異性抗体（又は以下に検討されるように、三重特異性もしくは四重特異性抗体もまた作製される）を開示するものである。抗体技術に関し現在ある課題は、2つ（又はそれ以上）の異なる抗原に同時に結合し、それにより、通常は異なる抗原を近接させることが可能となり、その結果として、新たな機能性及び新たな療法が可能となる、「二重特異性（及び/又は多重特異性）」の抗体に関する必要性である。一般的に、これらの抗体は、重鎖及び軽鎖に対する遺伝子の各々を宿主細胞へと導入することにより作製される。これにより、通常、所望されるヘテロ二量体（A - B）、並びに2つの同種二量体（A - A及びB - B）が形成される。しかしながら、多重特異性抗体形成の主な障害は、同種二量体抗体からヘテロ二量体抗体を精製すること、及び/又は同種二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成を多くさせることの困難性にある。

10

## 【0024】

本発明のヘテロ二量体を形成するために用いることができる多くのメカニズムが存在する。さらに、当業者に認識されているように、これらメカニズムを組み合わせ、ヘテロ二量体化を確保することができる。ゆえに、ヘテロ二量体の産生をもたらすアミノ酸変異を、「ヘテロ二量体化変異」と呼称する。以下に検討されるように、ヘテロ二量体化変異には、立体構造変異（例えば、以下に開示される「ノブとホール（knobs and holes）」又は「ねじれ」変異、及び「電荷対」変異）、並びに、ヘテロ二量体からの同種二量体の精製を可能にする「pI変異」が挙げられる。

## 【0025】

1つのメカニズムは、当分野において一般的に「ノブとホール（knobs and holes）（KIH）」と呼称され、又は一部の場においては、ヘテロ二量体の形成を多くし、同種二量体形成を少なくする立体構造的影響を与えるアミノ酸操作を指す、本明細書において、「ねじれ」変異の呼称もまた任意選択的に用いることができる；これは、一部の場においては、「ノブとホール（knobs and holes）」と呼称される（US SN 61/596, 846、及びUS SN 12/875, 0015、Ridgway et al., Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270:26; 米国特許第8, 216, 805号、US 2012/0149876（それらはすべて、参照により本明細書にその全体で援用される））に開示される）。図面は、「ノブとホール（knobs and holes）」のアミノ酸置換を含有する、多くの「モノマーA - モノマーB」の対を特定している。さらに、Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998)に開示されるように、これら「ノブとホール（knobs and holes）」の変異は、ジスルフィド結合と組み合わせ、構造をヘテロ二量体へとねじれさせることができる。

20

30

## 【0026】

ヘテロ二量体形成の作製に使用することができる追加のメカニズムは、一部の場においては、「静電的ステアリング」又は「電荷対」と呼称されるものである（Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010)（参照によりその全体が本明細書に援用される））に開示される）。これは、一部の場においては、本明細書において「電荷対」と呼称される。この実施態様においては、静電学を用いて、構造をヘテロ二量体形成へとねじれさせる。当分野において公知であるが、これらはまた、pIに対する効果を有してもよく、ゆえに精製に対しても効果があり、一部の場においては、pI変異ともみなされることがある。しかしながら、これらはヘテロ二量体化を推し進めるために作製されたものであり、精製のためのツールとして用いられたものではないため、それらは、「立体構造変異」として分類されている。これらには、限定されないが、D221R/P228R/K409Rと対形成したD221E/P228E/L368E（例えば、これらは、モノマー対応セットである）及びC220R/E224R/P228R/K409Rと対形成したC220E/P228E/368E及び図に他の示されるものが挙げられる。

40

## 【0027】

本発明の一部の実施態様において、pI変異を用いて、1又は両方のモノマーのpIを改

50

変し、それによって、A - A、A - B 及び B - B の二量体タンパク質の等電性の精製が可能となる。

【0028】

本発明において、ヘテロ二量体タンパク質の精製を容易にすることができるいくつかの基本的なメカニズムが存在する；1つはpI変異の使用に依っているものであり、例えば、各モノマーは異なるpIを有し、それによって、A - A、A - B 及び B - B の二量体タンパク質の等電性の精製が可能となる。あるいは、例えば「三重F」の形式等の一部のスキヤホールドの形式により、サイズに基づいた分離も可能となる。構造を、同種二量体よりもヘテロ二量体に「ねじれ」させることも可能である（以下に一般的に概説）。ゆえに、立体構造ヘテロ二量体変異と、pI又は電荷対変異の組み合わせは、本発明において、特定の用途が見出される。さらに、以下にさらに概説するように、例えば三重F形式等のscFv（複数含む）を利用するスキヤホールドは、荷電されたscFvリンカー（正又は負のいずれか）を含有することができ、それにより、精製目的のためのさらなるpIの強化をもたらされる。当業者には公知であるが、一部の三重Fの形式は、荷電されたscFvリンカーに有用であり、さらなるpIの調節は無いが、本発明は、荷電scFvリンカーを有するねじれ変異（及びFc、FcRn及びKO変異の組み合わせ）の使用も同様に提示するものである。

10

【0029】

ヘテロ二量体タンパク質の生成を可能とするための分離メカニズムとしてpIを利用する本発明において、アミノ酸変異を、モノマーポリペプチドの1つ又は両方に導入してもよく；すなわち、モノマーのうちの1つ（本明細書において、単純に「モノマーA」と呼称される）のpIは、モノマーBとは別に操作されてもよく、又はモノマーAとBの両方が変更されてもよい（モノマーAのpIが増加し、モノマーBのpIが減少する）。以下にさらに概説されるように、モノマーのいずれか、又は両方のpIの変化は、荷電残基の除去又は追加によりなされてもよく（例えば、中性のアミノ酸が、正荷電アミノ酸残基又は負荷電アミノ酸残基により置換される（例えば、グリシンがグルタミン酸へ）、正又は負の荷電残基を反対の荷電へと変更することによりなされてもよく（アスパラギン酸をリシンへ）、又は荷電残基を中性残基へと変更することによりなされてもよい（例えば、荷電の消失については、リシンをセリンへ）。多くのこれらの変異を、図に示す。

20

【0030】

したがって、本発明の本実施態様において、モノマーの内の少なくとも1つのpIにおいて十分な変化をもたらされ、それにより、ヘテロ二量体が同種二量体から分離される。当業者に公知であり、以下にさらに検討されることであるが、これは、「野生型」の重鎖定常領域及びそのpIが増加又は減少するよう操作された可変領域（wtA - + B、又はwtA - - B）、又は1つの領域を増加させ、他の領域を減少させるために操作された可変領域（A + - B -、又はA - B +）を用いることにより為すことができる。

30

【0031】

ゆえに、概して、本発明の一部の実施態様の構成要素は、アミノ酸置換（「pI変異」又は「pI置換」）をモノマーのうちの1つ又は両方へと組み込むことによる、「pIヘテロ二量体」（タンパク質が抗体である場合、それらは「pI抗体」と呼称される）を形成するための二量体タンパク質のモノマーのうちの少なくとも1つ（もし両方でなければ）の等電点（pI）を改変することを目的とした抗体の定常領域におけるアミノ酸変異である。本明細書において示されるように、2つの同種二量体からのヘテロ二量体の分離は、もし2つのモノマーのpIがわずかに0.1pH単位（0.2、0.2、0.4又は0.5以上であれば、本発明において用いられる）で異なっていれば、為すことができる。

40

【0032】

当業者に認識されているように、分離を成功させるための各モノマー又は両方のモノマーに含有されるpI変異の数は、対象のscFv及びFabの開始pIに部分的には依っている。すなわち、いずれのモノマーを操作すべきか、又はその「方向」（例えば、より正か、より負か）を決定するために、2つの標的抗原のFv配列を算出し、それらから決

50

定を行われる。当分野で公知であるように、異なる F v は、異なる開始 p I を有しており、それを本発明では活用する。概して、本明細書に記述されるように、p I は、各モノマーの総 p I 差が、少なくとも約  $0.1 \log(0.2 \sim 0.5)$  が好ましい) となるよう操作される。

#### 【0033】

さらに、当業者に認識され、本明細書に記述されるように、ヘテロ二量体は、サイズに基づいて同種二量体から分離されることもできる。例えば、図 1 及び 2 に示されるように、2 つの s c F v を有するヘテロ二量体は、「三重 F」形式及び二重特異性 m A b により分離されることができる。これはさらに、追加の抗原結合部位が活用されている、より多価の場合において活用することができる。例えば、追加的に示されているように、1 つのモノマーは 2 つの F a b 断片を有し、及び他方は 1 つの s c F v を有し、それによりサイズが異なり、ゆえに、分子量が異なっている。

10

#### 【0034】

さらに、当分野で認識され、本明細書に記述されるように、本明細書に概要される形式を拡張し、三重特異的抗体及び四重特異的抗体を同様に作製することができる。この実施態様において、それらバリエーションの一部が図 1 A に示されており、一部の抗原は二価性に結合されることが可能であることが認識されるであろう(例えば、1 つの抗原に対する 2 つの抗原結合部位、例えば、A 及び B は、典型的な二価結合の一部であり、並びに、C 及び D は、任意選択的に存在してもよく、並びに、任意選択的に同一又は異なってもよい)。認識されるように、F a b 及び s c F v の任意の組み合わせを用いて、所望される結果及び組み合わせを得てもよい。

20

#### 【0035】

p I 変異を用いてヘテロ二量体化を行う場合において、重鎖(複数含む)の定常領域(複数含む)を用いることによる、抗体を含む多特異的タンパク質を設計及び精製するための、よりモジュール的な方法が提示される。ゆえに、一部の実施態様において、ヘテロ二量体化変異(ねじれ及び精製ヘテロ二量体化変異を含む)は可変領域内には含まれておらず、そのように、各個々の抗体が操作されなければならない。さらに、一部の実施態様において、p I 変異からもたらされる免疫原性の可能性は、異なる I g G アイソタイプ由来の p I 変異を導入することにより減少され、それによって、p I は、明らかな免疫原性が導入されることなく、変化する。ゆえに、解決すべき追加の課題は、ヒト配列が多く含まれている低 p I の定常ドメインの解明であり、例えば、任意の特定の位置での非ヒト残基の最小化又は忌避である。

30

#### 【0036】

p I 操作で得られる別の利点は、血清半減期の延長と、F c R n 結合の増加である。すなわち、U S S N 13 / 194 , 904 (その全体で参照により援用される) に記述されるように、抗体定常ドメイン(抗体及び F c 融合物に存在するものを含む)の p I を低下させることにより、i n v i v o の血清滞留を延長することができる。血清半減期を増加させるためのこれら p I 変異により、精製のための p I 変化もまた促進される。

#### 【0037】

さらに、ヘテロ二量体化変異の p I 変異は、二重特異性抗体の分析及びクオリティ制御プロセスに関し、さらなる利益をもたらすこと(特に、C D 3 抗体の場合において、同種二量体が存在する場合に、除外、最小化及び区別のいずれかの能力が顕著である)に注記されたい。同様に、ヘテロ二量体タンパク質産生の再現性を確実に検証する能力が重要である。

40

#### 【0038】

変異重鎖定常ドメインのすべて又は一部に加え、1 つ又は両方のモノマーは、ヘテロ二量体が多価性タンパク質を形成するよう、1 又は 2 の融合パートナーを含有してもよい。図(特に図 1 A) に示されているように、融合パートナーは、A、B、C 及び D として示され、全ての組み合わせが可能である。概して、A、B、C 及び D は、ヘテロ二量体が、追加のタンパク質と相互作用する能力において、少なくとも二重特異性又は二価性であるよ

50

う選択される。

【0039】

当業者に認識され、及び以下に検討されるように、本発明のヘテロ二量体融合タンパク質は、広範な構造をとることができる（図1及び2に概要される）。一部の図は、「1つの末端」構造を示しており、分子の1つの「腕」に1つのタイプの特異性があり、他方の「腕」に異なる特異性がある。他の図においては、「2つの末端」構造を示しており、分子の「上」に少なくとも1つのタイプの特異性があり、及び分子の「下」には1以上の異なる特異性がある。さらに、これら2つの構造を組み合わせることができ、特定の組み合わせに基づいた、三重又は四重の特異性がある。ゆえに、本発明により「多重特異性」結合タンパク質（多重特異性抗体を含む）が開示される。ゆえに、本発明は、少なくとも第一及び第二の抗原を共捕捉する新規なイムノグロブリン組成物を目的としている。本発明の第一及び第二の抗原は、抗原1及び抗原2とそれぞれ呼称される。

10

【0040】

本発明に特に有用な1つのヘテロ二量体スキャホールドは、「三重F」又は「栓抜き型」のスキャホールド形式である。この実施態様において、抗体の1つの重鎖は、一本鎖Fc（以下、「scFv」と定義される）を含有し、及び他の重鎖は「標準的な」Fab形式である（可変重鎖及び軽鎖を含有する）。この構造は場合によって、本明細書において、「三重F」形式（scFv-Fab-Fc）又は栓抜きによく似た外見から、「栓抜き型」形式と呼称される（図1Bを参照のこと）。2つの鎖は、ヘテロ二量体抗体の形成を促進する定常領域（例えば、Fcドメイン及び/又はヒンジ領域）におけるアミノ酸変異を用いることにより、共に結合されている（以下に詳述される）。

20

【0041】

本発明の「三重F」形式に関し、いくつか、異なる利点が存在する。当分野で公知であるように、2つのscFv構築物に依る抗体アナログは多くの場合、安定性と凝集の問題を抱えているが、その問題は、「標準的な」重鎖及び軽鎖の対を付加することにより、本発明において軽減することができる。さらに、2つの重鎖及び2つの軽鎖に依る形式とは対照的に、重鎖及び軽鎖の不正確な対形成による問題もない（例えば、重鎖1と軽鎖2の対形成等）。

【0042】

変異重鎖定常ドメインのすべて、又は一部に加え、モノマーのうちの1つ又は両方が1又は2の融合パートナーを含有してもよく、それにより、ヘテロ二量体は多価性のタンパク質を形成する。USN13/648, 951の図64（参照により、付随する説明書きとともに本明細書に援用される）に概要があるように、融合パートナーはA、B、C及びDとして表され、すべての組み合わせが可能である。概して、A、B、C及びDは、ヘテロ二量体が少なくとも二重特異性、又は追加のタンパク質と相互作用する性質において二価性であるように選択される。本発明の「三重F」形式の文脈において、通常、A及びBは、scFv及びFvであり（認識されるように、いずれかモノマーがscFvを含有し、他方がFv/Fabを含有してもよい）、次いで、任意選択的に、1又は2の追加の融合パートナーである。

30

【0043】

さらに、本明細書に概要されるように、追加の機能性を付加するために追加のアミノ酸変異を本発明の二重特異性抗体に導入してもよい。例えば、ADCC又はCDCの増強を促進するためにFc領域内のアミノ酸変化を（1つのモノマー又は両方のモノマーのいずれかに）追加してもよく（例えば、Fc受容体に対する結合を改変）、追加の毒素及び薬物（例えば、ADCのための）の産生を可能とするために、又は産生量を増加させるために追加してもよく、並びに、FcRnに対する結合を増加させるため及び/又は得られた分子の血清半減期を増加させるために追加してもよい。本明細書にさらに詳述され、及び当業者に認識されているように、本明細書に概要されるいずれかの変異及び全ての変異は、任意選択的に、及び独立して、他の変異と組み合わせられてもよい。

40

【0044】

50

同様に、機能性変異の他のカテゴリーは、「Fc 欠落変異」又は「Fc ノックアウト (Fc KO 又は KO) 変異」である。これらの実施態様においては、一部の治療応用を目的とし、Fc ドメインの、1 以上又はすべてのFc 受容体 (例えば、Fc R1、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIa 等) に対する通常の結合を減少させ、又は除去し、追加作用メカニズムを回避することが望ましい。すなわち、例えば多くの実施態様において、特にCD3 及び他の腫瘍抗原 (例えば、CD19、her2/neu 等) に一価性に結合する二重特異性抗体の使用において、ADCC 活性を排除又は有意に減少させるために、Fc RIIIa 結合を除去することが通常望ましい。

#### 【0045】

##### 定義

本用途をより完全に理解するために、いくつかの定義を以下に説明する。そのような定義は、文法的に均等であるものを含有することが意図される。

#### 【0046】

本明細書において、「欠落」とは、活性の減少又は除去を意味する。ゆえに、例えば、「Fc R 結合の欠落」とは、Fc 領域のアミノ酸変異が、特定の変異を含有していないFc 領域と比較して、50%の開始結合未満を有することを意味し、好ましくは70~80~90~95~98%未満の活性消失であり、通常、Biacore アッセイにおいて検出可能な結合レベルを下回る活性である。Fc R 結合の欠落に特に有用なものを図7に示す。

#### 【0047】

本明細書において、「ADCC」又は「抗体依存性細胞介在性細胞障害」とは、細胞介在性の反応を意味し、ここで、Fc Rを発現する非特異的細胞障害正細胞は、標的細胞上に結合された抗体を認識し、次いで、当該標的細胞の溶解をもたらすものである。ADCCは、Fc RIIIaへの結合と関連しており、Fc RIIIaへの結合の増加により、ADCC活性の増加をもたらされる。

#### 【0048】

本明細書において、「ADCP」又は抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシスとは、細胞介在性反応を意味し、ここで、Fc Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞は、標的細胞上に結合された抗体を認識し、次いで、標的細胞のファゴサイトーシスをもたらすものである。

#### 【0049】

本明細書において、「修飾」とは、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入、及び/又は欠失を意味し、又はタンパク質に化学的に連結された部分への改変を意味する。例えば、修飾は、タンパク質に付着した改変炭水化物又は改変PEG構造であってもよい。本明細書において、「アミノ酸置換」とは、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入、及び/又は欠失を意味する。明確性のために、他で定義されない限り、アミノ酸修飾は常に、DNAによりコードされるアミノ酸 (例えば、DNA及びRNAにコドンをもつ20のアミノ酸) に対するものである。

#### 【0050】

本明細書において、「アミノ酸置換」又は「置換」とは、元のポリペプチド配列中の特定の位置で、異なるアミノ酸とアミノ酸を置換することを意味する。特に、一部の実施態様において、置換は、当該生物体内で、又は任意の生物内のいずれかで自然発生しない特定の位置の非天然型のアミノ酸に対するものである。例えば、置換E272Yとは、変異ポリペプチドを指し、Fc変異の場合においては、272位のグルタミン酸がチロシンで置換されている。明確性のために、核酸コード配列が変更されているが、開始アミノ酸 (例えば、宿主生物体の発現レベルを上げるための、CGG (アルギニンをコードする) からCGA (まだアルギニンをコードする) への交換) は変更しないよう操作されているタンパク質は、「アミノ酸置換」ではない。すなわち、同じタンパク質をコードする新しい遺伝子の創出であるにもかかわらず、もし当該タンパク質が開始される特定の位置で同じアミノ酸を有している場合、それはアミノ酸置換ではない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 1 】

本明細書において、「アミノ酸挿入」又は「挿入」とは、元のポリペプチド配列の特定の位置にアミノ酸配列を追加することを意味する。例えば、- 2 3 3 E 又は 2 3 3 E とは、2 3 3 位の後、2 3 4 位の前にグルタミン酸を挿入することを意味する。さらに、- 2 3 3 A E D 又は A 2 3 3 A D E とは、2 3 3 位の後、2 3 4 位の前に A l a A s p G l u を挿入することを意味する。

## 【 0 0 5 2 】

本明細書において、「アミノ酸欠失」又は「欠失」とは、元のポリペプチド配列の特定の位置でアミノ酸を除去することを意味する。例えば、E 2 3 3 - 又は E 2 3 3 # 又は E 2 3 3 ( ) とは、2 3 3 位でグルタミン酸を欠失することを意味する。さらに、E D A 2 3 3 - 又は E D A 2 3 3 # とは、2 3 3 位で始まる G l u A s p A l a の配列が欠失することを意味する。

## 【 0 0 5 3 】

本明細書において、「変異タンパク質」又は「タンパク質変異体」又は「変異体」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾を理由として元のタンパク質とは異なるタンパク質を意味する。タンパク質変異体とは、それ自身のタンパク質、当該タンパク質を含有する組成物、又はそれをコードするアミノ酸配列を指してもよい。好ましくは、タンパク質変異体は、元のタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を有している（例えば、元のものと比較して約1～約70のアミノ酸修飾、及び好ましくは約1～約5のアミノ酸修飾）。以下に記述されるように、一部の実施態様において、元のポリペプチド（例えばFc等の元ポリペプチド）は、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 由来のFc領域等のヒト野生型配列であるが、変異を有するヒト配列もまた、「元のポリペプチド」として機能してもよい（例えば、図13のI g G 1 / 2 のハイブリッド）。本明細書において、タンパク質変異配列は、好ましくは、元のタンパク質の配列と少なくとも約80%の同一性を有し、及び最も好ましくは少なくとも約90%の同一性、よりさらに好ましくは少なくとも約95～98～99%の同一性を有している。変異タンパク質は、それ自身の変異タンパク質、当該タンパク質変異体を含有する組成物、又はそれをコードするDNA配列を指してもよい。したがって、本明細書において、「抗体変異体」又は「変異抗体」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾を理由として元の抗体と異なる抗体を意味し、本明細書において、「I g G 変異体」、又は「変異I g G」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾を理由として元のI g G と異なる（再度、多くの場合において、ヒトI g G 配列と異なる）抗体を意味し、及び本明細書において、「イムノグロブリン変異体」又は「変異イムノグロブリン」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾を理由として元のイムノグロブリン配列とは異なるイムノグロブリン配列を意味する。本明細書において、「Fc変異体」又は「Fc変異」とは、Fcドメインにアミノ酸修飾を含有するタンパク質を意味する。本発明のFc変異体は、それらを構成するアミノ酸修飾に従い定義される。例えば、N 4 3 4 S 又は 4 3 4 S は、元のFcポリペプチドと比較して、4 3 4 位にセリン置換を有するFc変異体を意味する（ナンバリングはE U インデックスに従っている）。同様に、M 4 2 8 L / N 4 3 4 S は、元のFcポリペプチドと比較して、M 4 2 8 L 及び N 4 3 4 S の置換を有するFc変異体を定義するものである。WTアミノ酸のアイデンティティは、明確にされていなくてもよく、その場合、前述の変異体は、4 2 8 L / 4 3 4 S と呼称される。置換が行われる順序は任意のものであり、すなわち、例えば、4 2 8 L / 4 3 4 S は、M 4 2 8 L / N 4 3 4 S などと同じFc変異体であることを注記されたい。抗体に関し、本発明において検討される全ての位置に対し、他で明記されない限り、アミノ酸の位置のナンバリングは、E U インデックスに従っている。E U インデックス又はK a b a t にあるようなE U インデックス又はE U ナンバリングスキームとは、E U 抗体のナンバリングを指す（Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85。参照により全体で本明細書に援用される）。修飾は、追加、欠失又は置換であってもよい。置換は、天然型アミノ酸を含有してもよく、一部の場合においては、合成アミノ酸を含有してもよい。例としては、米国特許第6,586,207号；WO98/48032；

10

20

30

40

50

WO 03 / 073238 ; US 2004 - 0214988 A1 ; WO 05 / 35727 A2 ; WO 05 / 74524 A2 ; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024;及びL. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10 (すべて、参照により全体で援用される)が挙げられる。

#### 【0054】

本明細書において、「タンパク質」とは、少なくとも2つの共有結合されたアミノ酸を意味し、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド及びペプチドを含有する。ペプチジル基は、天然型アミノ酸とペプチド結合を含有してもよく、又は合成ペプチド模倣構造(すなわち、例えばペプトイド等の「アナログ」(Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992)を参照のこと。参照により全体で援用される))を含有してもよい。アミノ酸は、当業者に認識されているように、天然型又は合成(例えば、DNAによりコードされていないアミノ酸ではない)のいずれかであってもよい。例えば、ホモ-フェニルアラニン、シトルリン、オルニチン及びノルロイシンは、本発明の目的に合致する合成アミノ酸と見なされ、D-及びL-(R又はS)構成のアミノ酸の両方を利用してよい。本発明の変異体は、例えば、Schultzらにより開発された技術(限定されないが、Cropp & Schultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3、及びChin et al., 2003, Science 301(5635):964-7に記述される方法が挙げられる。すべて参照により全体で援用される)等を用いて組み込まれた合成アミノ酸の使用を含む修飾を含有してもよい。さらに、ポリペプチドは、1以上の側鎖又は末端の合成誘導体化、グリコシル化、PEG化、円順列、環化、他の分子へのリンカー、タンパク質又はタンパク質ドメインへの融合、及びペプチドタグ又は標識の付加を含有してもよい。

10

20

#### 【0055】

本明細書において、「残基」とは、タンパク質中の位置及びその関連アミノ酸のアイデンティティを意味する。例えば、アスパラギン297(Asn297又はN297とも呼称される)は、ヒト抗体IgG1中の297位の残基である。

#### 【0056】

本明細書において、「Fab」又は「Fab領域」とは、VH、CH1、VL及びCLイムノグロブリンドメインを含有するポリペプチドを意味する。Fabは、分離したこの領域を指してもよく、又は全長抗体、抗体断片もしくはFab融合タンパク質に関連してこの領域を指してもよい。本明細書において、「Fv」又は「Fv断片」又は「Fv領域」とは、1つの抗体のVL及びVHドメインを含有するポリペプチドを意味する。

30

#### 【0057】

本明細書において、「IgGサブクラス修飾」又は「アイソタイプ修飾」とは、1つのIgGアイソタイプを、異なる、位置合わせされたIgGアイソタイプ中の対応するアミノ酸へと転換するアミノ酸修飾を意味する。例えば、IgG1はEU位置で296位にチロシンを含有し、IgG2はフェニルアラニンを含有するため、IgG2におけるF296Y置換は、IgGサブクラス修飾と見なされる。

40

#### 【0058】

本明細書において、「非天然型修飾」とは、アイソタイプ型ではないアミノ酸修飾を意味する。例えば、434位にセリンを含有したIgGは存在しないため、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4(又はそれらのハイブリッド)における434S置換は、非天然型修飾と見なされる。

#### 【0059】

本明細書において、「アミノ酸」及び「アミノ酸アイデンティティ」とは、DNA及びRNAによりコードされる20のアミノ酸のうちの1つを意味する。

#### 【0060】

本明細書において、「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域とFc受容体又はリガン

50

ドとの相互作用から生じる生化学的事象を意味する。エフェクター機能としては、限定されないが、A D C C、A D C P及びC D Cが挙げられる。

【0061】

本明細書において、「I g G F cリガンド」とは、I g G抗体のF c領域へ結合し、F c / F cリガンド複合体を形成する任意の生物体由来の分子、好ましくはポリペプチドを意味する。F cリガンドとしては、限定されないが、F c R I、F c R I I、F c R I I I、F c R n、C 1 q、C 3、マンナン結合型レクチン、マンノース受容体、ブドウ球菌プロテインA、連鎖球菌プロテインG、及びウイルス性F c Rが挙げられる。F cリガンドはまた、F c Rと相同なF c受容体のファミリーであるF c受容体ホモログ (F c R H) を含有する (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:12 10  
3-136、参照により全体で援用される)。F cリガンドは、F cに結合する未発見の分子を含有してもよい。特定のI g G F cリガンドは、F c R n及びF c受容体である。本明細書において、「F cリガンド」は、抗体のF c領域に結合し、F c / F cリガンド複合体を形成する任意の生物体由来の分子、好ましくはポリペプチドを意味する。

【0062】

本明細書において、「F c受容体」、「F c R」、又は「F cガンマR」とは、I g G抗体F c領域に結合するタンパク質ファミリーの任意の1つを意味し、F c R遺伝子によりコードされる。ヒトにおいては、このファミリーには限定されないが、F c R I (C D 6 4) (F c R I a、F c R I b、及びF c R I cのアイソフォームを含む) ; F c R I I (C D 3 2) (F c R I I a (H 1 3 1及びR 1 3 1のアロタイプを 20  
含む)、F c R I I b (F c R I I b 0 1及びF c R I I b - 2を含む) 及びF c R I I cのアイソフォームを含む) ; 及びF c R I I I (C D 1 6) (F c R I I I a (V 1 5 8及びF 1 5 8のアロタイプを含む) 及びF c R I I I b (F c R I I b - N A 1 及びF c R I I b - N A 2のアロタイプを含む) のアイソフォームを含む) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65、参照により全体で援用される)、並びに、任意の未開発のヒトF c R又はF c Rアイソフォームもしくはアロタイプが挙げられる。F c Rは、任意の生物体 (限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、及びサルが挙げられる) 由来であってもよい。マウスのF cとしては、限定されないが、F c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)、F c R I I I (C D 1 6)、及びF c R I I I - 2 (C D 1 6 - 2)、並びに、任意の未発見のマウスF c 30  
R又はF c Rアイソフォームもしくはアロタイプが挙げられる。

【0063】

本明細書において、「F c R n」又は「新生児型F c受容体」とは、I g G抗体のF c領域に結合するタンパク質を意味し、F c R n遺伝子により少なくとも部分的にコードされる。F c R nは、任意の生物体 (限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、及びサルが挙げられる) 由来であってもよい。当分野に公知であるが、機能性F c R nタンパク質は、2つのポリペプチド (多くの場合、重鎖及び軽鎖と称される) から構成される。軽鎖はベータ - 2 - マイクログロブリンであり、重鎖は、F c R n遺伝子によりコードされる。本明細書において他で注記されない限り、F c R n又はF c R nタンパク質とは、F c R n重鎖とベータ - 2 - マイクログロブリンの複合体を指す。F c R n受容体への 40  
結合を増強させるため、及び一部の場合においては、血清半減期を延長させるために用いられる様々なF c R n変異体は、図83の図の説明に示されている。

【0064】

本明細書において、「元のポリペプチド」とは、開始ポリペプチドを意味し、次いで、それは変異体を作製するために修飾される。元のポリペプチドは天然型ポリペプチドであってもよく、又は天然型ポリペプチドの変異体もしくは操作されたものであってもよい。元のポリペプチドとは、それ自身のポリペプチド、元のポリペプチドを含有する組成物、又はそれをコードするアミノ酸配列を指してもよい。したがって、本明細書において、「元のイムノグロブリン」とは、変異体を作製するために修飾される非修飾のイムノグロブリンポリペプチドを意味し、及び本明細書において、「元の抗体」とは、変異抗体を作製す 50

るために修飾される非修飾の抗体を意味する。なお、「元の抗体」とは、公知の市販された、組換え生産された抗体（以下に概要する）を含有する。

【0065】

本明細書において、「Fc融合タンパク質」又は「イムノアドヘシン」とは、通常、異なるタンパク質（例えば本明細書に記述される標的タンパク質への結合部分）に、（任意選択的に、本明細書に記述されるリンカー部分を介して）連結されているFc領域を含有するタンパク質を意味する。一部の場合において、ヘテロ二量体タンパク質の1つのモノマーは、抗体重鎖を含有し（scFvを含有するか、又はさらに軽鎖を含有するかのいずれか）、及び他のモノマーは、変異Fcドメイン及びリガンドを含有するFc融合物である。一部の実施態様において、これら「半抗体-半融合タンパク質」は、「融合体（Fusion bodies）」とも呼称される。

10

【0066】

本明細書において、「位置」とは、タンパク質の配列中の位置を意味する。位置は、連続的に番号づけられたものであってもよく、又は確立された形式（例えば、抗体のナンバリングに関しては、EUインデックス等）に従うものであってもよい。

【0067】

本明細書において、「標的抗原」とは、所与の抗体の可変領域により特異的に結合される分子を意味する。標的抗原はタンパク質、糖質、脂質、又は他の化学的化合物であってもよい。多くの適切な標的抗原を以下に記述する。

【0068】

本発明のヘテロ二量体タンパク質のモノマーとの関連において、「鎖状構造らしさ」とは、「合致する」DNAの2つの鎖と同じように、ヘテロ二量体を形成するための「合致する」能力を保持するようにヘテロ二量体化変異が各モノマーに組み込まれていることを意味する。例えば、もし一部のpI変異がモノマーAに操作されて組み込まれ（例えば、pIをより高くするために）、次いで、同様に用いることができる「電荷対」である立体構造変異が、そのpI変異に干渉しない場合、例えば、pIをより高くするその電荷変異は、両方の機能性を保持するよう、同じ「鎖」又は「モノマー」に置かれる。

20

【0069】

本明細書において、「標的細胞」とは、標的抗原を発現している細胞を意味する。

【0070】

本明細書において、「可変領域」とは、V<sub>kappa</sub>、V<sub>lambda</sub>、及び/又はVH遺伝子（それぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、及び重鎖イムノグロブリン遺伝子座を構成する）のいずれかにより実質的にコードされているIgドメインを1つ以上含有するイムノグロブリンの領域を意味する。

30

【0071】

本明細書において、「野生型」又は「WT」とは、自然界に存在するアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を意味し、対立遺伝子変異を含んでいる。WTタンパク質は、意図的に修飾されていないアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を有している。

【0072】

本発明の抗体は通常、単離されていても、又は組換え体であってもよい。本明細書に開示される様々なポリペプチドを記述するために用いられた場合、「単離された」とは、それが発現された細胞又は細胞培養物から特定され、並びに、分離及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1回の精製工程により調製される。「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体から実質的に離れている抗体を指す。

40

【0073】

特定の抗原又はエピトープへの「特異的結合」又は「特異的に結合する」又は特定の抗原に対し「特異的である」とは、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、対照分子（通常、結合活性を有していない類似の構造の分子である）の結合と比較して、分子の結合を測定することにより測定することができる。

50

例えば、特異的結合は、標的と類似した対照分子との競合により測定することができる。

【0074】

特定の抗原又はエピトープに対する特異的結合は、例えば、少なくとも約10<sup>-4</sup>M、少なくとも約10<sup>-5</sup>M、少なくとも約10<sup>-6</sup>M、少なくとも約10<sup>-7</sup>M、少なくとも約10<sup>-8</sup>M、少なくとも約10<sup>-9</sup>M、あるいは、少なくとも約10<sup>-10</sup>M、少なくとも約10<sup>-11</sup>M、少なくとも約10<sup>-12</sup>Mがそれ以上の、抗原又はエピトープに対するKDを有する抗体により示されてもよく、ここで、KDとは、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指す。典型的には、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原又はエピトープに関し、対照分子に対して、20~、50~、100~、500~、1000~、5,000~、10,000倍かそれ以上大きなKDを有する。

10

【0075】

また、特定の抗原又はエピトープに対する特異的結合は、例えば、対照と比較して、エピトープに対し、20~、50~、100~、500~、1000~、5,000~、10,000倍かそれ以上大きな抗原又はエピトープに対するKA又はKaを有する抗体により示されてもよく、ここで、KA又はKaとは、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指す。

【0076】

ヘテロ二量体タンパク質

本発明は、多重特異性、特に二重特異性結合タンパク質、特に、多重特異性抗体の生成を目的とする。本発明は概して、ヘテロ二量体タンパク質を産生するための産生細胞中で自己アセンブリを行うことができる操作Fcドメイン又は変異Fcドメインの使用及びそのようなヘテロ二量体タンパク質を作製及び精製する方法である。

20

【0077】

抗体

本発明は、多重特異性抗体（通常、治療用抗体）の生成に関する。以下に検討されるように、「抗体」という用語が通常用いられている。本発明に用途が見出される抗体は、本明細書に記述される多くの形式をとることができ、以下に記述される抗体並びに抗体誘導体、断片及び模倣物が挙げられる。概して、「抗体」という用語には、定常ドメイン（限定されないが、CH1、CH2、CH3及びCLが挙げられる）を少なくとも1つ含有する任意のポリペプチドが含まれる。

30

【0078】

従来の抗体構造の単位は通常、テトラマーを含有する。各テトラマーは通常、2つの同一なポリペプチド鎖の対から構成され、各対は、1つの「軽い」鎖（通常、約25kDaの分子量を有する）及び1つの「重い」鎖（通常、約50~70kDaの分子量を有する）を有している。ヒトの軽鎖は、軽鎖及び重鎖として分類される。本発明は、いくつかのサブクラス（限定されないが、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が挙げられる）を有するIgGクラスを目的としている。ゆえに、本明細書において、「アイソタイプ」とは、その定常領域の化学的及び抗原的特徴により定義されるイムノグロブリンの任意のサブクラスを意味する。治療抗体はまた、アイソタイプ及び/又はサブクラスのハイブリッドを含有しうることを理解されたい。例えば、US公開2009/0163699（参照により援用される）に示されるように、本発明は、IgG1/G2ハイブリッドのpI操作を含むものである。

40

【0079】

各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含有しており、通常、当分野において、及び本明細書において、「Fvドメイン」又は「Fv領域」と呼称される。可変領域において、3つのループが、重鎖及び軽鎖のVドメインの其々に対して集合し、抗原結合部位を形成している。各ループは、相補性決定領域（以下、CDRと呼称される）と呼称されており、アミノ酸配列の変異が最も顕著である。「可変」とは、可変領域のあるセグメントが、抗体間で、配列にかなりの違いがあるという事実を指す。可変領域内の可変性は、等しく分布していない。むしろ、V領域は、

50

各々が 9 ~ 15 アミノ酸以上の長さである「超可変領域」と呼ばれる、かなり可変性が高い短い領域により分離される、15 ~ 30 アミノ酸のフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる比較的普遍的な連続配列からなる。

【0080】

VH と VL のそれぞれは、3 つの超可変領域 (「相補性決定領域」、「CDR」) と、4 つの FR から構成され、以下の順番で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置されている：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。

【0081】

超可変領域は通常、軽鎖可変領域における、アミノ酸残基約 24 ~ 34 (LCDR1 ; 「L」は軽鎖を示す)、50 ~ 56 (LCDR2) 及び 89 ~ 97 (LCDR3) のアミノ酸残基、及び重鎖可変領域における、約 31 ~ 35 B (HCDR1 ; 「H」は重鎖を示す)、50 ~ 65 (HCDR2)、及び 95 ~ 102 (HCDR3) のアミノ酸残基を包含し ; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)、及び / 又は超可変ループを形成する残基を包含する (例えば、軽鎖可変領域における、26 - 32 残基 (LCDR1)、50 - 52 残基 (LCDR2) 及び 91 - 96 残基 (LCDR3)、並びに、重鎖可変領域における、26 - 32 残基 (HCDR1)、53 - 55 残基 (HCDR2) 及び 96 - 101 残基 (HCDR3)) ; Chotia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917。本発明の具体的な CDR は以下に記述する。

10

20

【0082】

本明細書を通じて、可変ドメイン中の残基 (おおよそ、軽鎖可変領域の 1 ~ 107 残基、及び重鎖可変領域の 1 ~ 113 残基) について言及する際は、Kabat のナンバリングシステムが、及び Fc 領域に対しては EU ナンバリングシステムが通常用いられている (例えば上記の Kabat et al., (1991))。

【0083】

CDR は、抗原結合の形成、又はより具体的には、抗体のエピトープ結合部位に寄与している。「エピトープ」とは、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域中の特定の抗原結合部位と相互作用する決定基を指す。エピトープは、例えばアミノ酸又は糖の側鎖等の分子の集団であり、通常、特異的な構造的特徴並びに電荷的特徴を有している。1 つの抗原が、2 以上のエピトープを有していてもよい。

30

【0084】

エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基 (エピトープの主要抗原成分とも呼称される) を含有してもよく、及び結合に直接は関与しない他のアミノ酸残基 (例えば、特異的な抗原結合ペプチドにより効率的にブロックされるアミノ酸残基等。つまり、当該アミノ酸残基は、特異的な抗原結合ペプチドのフットプリント (footprint) 内にある) を含有してもよい。

【0085】

エピトープは、立体構造又は線状のいずれであってもよい。立体構造的なエピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並べられたアミノ酸により産生される。線状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接したアミノ酸残基により産生されるものである。立体構造的及び非立体構造的なエピトープは、変性溶媒の存在下でも結合する場合は前者、結合が失われる場合には後者という具合に識別されてもよい。

40

【0086】

エピトープは通常、ユニークな空間的構造中に、少なくとも 3、より普遍的には、少なくとも 5 又は 8 ~ 10 のアミノ酸を含有する。同じエピトープを認識する抗体は、例えば「ピンニング (binning)」等の、標的抗原に対する他の抗体の結合を阻害する抗体の活性を示すシンプルな免疫アッセイにおいて立証することができる。

【0087】

各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を規定する。K

50

a b a tらは、重鎖及び軽鎖の可変領域の多くの主要配列を収集した。配列の保存の程度に基づき、個々の主要配列をC D R及びフレームワークへと分類し、そのリストを作製した (SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., 参照により全体で援用される)。

【0088】

イムノグロブリンのI g Gサブクラスにおいて、重鎖にはいくつかのイムノグロブリンドメインが存在する。本明細書において、「イムノグロブリン(I g)ドメイン」とは、明白に異なる三次元構造を有するイムノグロブリンの領域を意味する。本発明において対象となるのは、重鎖ドメインであり、定常重鎖(C H)ドメイン及びヒンジドメインが含まれる。I g G抗体に関する記述において、I g Gアイソタイプのそれぞれは、3つのC H領域を有している。したがって、I g Gに関し、「C H」ドメインとは以下である：「C H 1」とは、K a b a tのE Uインデックスに従い、1 1 8 ~ 2 2 0位を指す。「C H 2」とは、K a b a tのE Uインデックスに従い、2 3 7 ~ 3 4 0位を指し、及び「C H 1」とは、K a b a tのE Uインデックスに従い、3 4 1 ~ 4 4 7位を指す。本明細書において示され、以下に記述されるように、p I変異は、C H領域のうち1以上にあってもよく、並びに、以下に検討されるヒンジ領域に合ってもよい。

10

【0089】

本明細書に開示される配列は、C H 1領域(1 1 8位)に始まり、可変領域は、記述されるものを除き、含まれていないことに注記されたい。例えば、配列番号2の第一のアミノ酸は、配列表において「1」位として指定されているが、C H 1領域の1 1 8位に相当する(E Uナンバリングに従う)。

20

【0090】

重鎖の他のタイプのI gドメインは、ヒンジ領域である。本明細書において、「ヒンジ」又は「ヒンジ領域」又は「抗体ヒンジ領域」又は「イムノグロブリンヒンジ領域」とは、抗体の第一定常ドメインと第二定常ドメインの間にあるアミノ酸を含有する可塑性のポリペプチドを意味する。構造的に、I g G C H 1ドメインは、E Uの2 2 0位に終わり、及びI g G C H 2ドメインは、E Uの2 3 7位残基で始まる。ゆえに、本明細書において、I g Gに対する抗体のヒンジは、2 2 1位(I g G 1においてはD 2 2 1) ~ 2 3 6(I g G 1においてはG 2 3 6)を含むと規定される(ナンバリングはK a b a tらのE Uインデックスに従っている)。一部の実施態様においては、例えばF c領域に関する文脈において、より低いヒンジが含有されており、「低ヒンジ」とは通常、2 2 6又は2 3 0位を指す。本明細書に記述されるように、p I変異は、ヒンジ領域に同様に作製されてもよい。

30

【0091】

軽鎖は通常、可変軽鎖ドメイン(軽鎖C D Rを含有し、可変重鎖ドメインと共にF v領域を形成する)及び定常軽鎖領域(多くの場合、C L又はC と呼称される)の2つのドメインを含有する。

【0092】

追加の置換に対する対象の他の領域としては、以下に概要されるように、F c領域がある。本明細書において、「F c」又は「F c領域」又は「F cドメイン」とは、第一の定常領域イムノグロブリンドメイン(及び一部の場合においてはヒンジの一部)を除外した抗体の定常領域を含有するポリペプチドを意味する。ゆえに、F cとは、I g A、I g D及びI g Gの最後の2つの定常領域イムノグロブリンドメイン、I g E及びI g Mの最後の3つの定常領域イムノグロブリンドメイン、及びこれらのドメインのN末端にある可塑性ヒンジを指す。I g A及びI g Mに対しては、F cは、J鎖を含有してもよい。I g Gに対しては、F cドメインは、イムノグロブリンドメインC<sub>2</sub>及びC<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>及びC<sub>3</sub>)、及びC<sub>1</sub>(C<sub>1</sub>)及びC<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>)の間の低ヒンジ領域を含有する。F c領域の境界は変化しうるが、ヒトI g G重鎖F c領域は通常、C 2 2 6又はP 2 3 0残基からそのカルボキシル末端までを含有すると定義づけられている(ナンバリングはK a b a tのE Uインデックスに従っている)。一部の実施態様において、以下にさらに完全

40

50

に記述するように、アミノ酸修飾をFc領域に施し、例えば、1以上のFc R受容体又はFcRn受容体に対する結合を変化させている。

【0093】

したがって、本発明の一部の実施態様において、ヘテロ二量体抗体を形成するために自己アセンブリを行う、2つの異なる重鎖変異Fcドメインを使用するヘテロ二量体抗体が開示される。

【0094】

一部の実施態様において、抗体は全長である。本明細書において、「全長抗体」とは、抗体の天然の生物学的形態を構成する構造を意味し、可変領域及び定常領域を含有し、特にFcドメインにおいて、ヘテロ二量体の形成、又は同種二量体からのヘテロ二量体の精製のいずれかを可能とするための、本明細書に概要される1以上の修飾を含有している。全長ヘテロ二量体抗体は、異なるFcドメインを有し、及び2つの軽鎖又は通常の軽鎖のいずれかを有する2つの重鎖である。

【0095】

あるいは、抗体は、様々な構造（図に概要が示されている。限定されないが、抗体断片、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（場合により、本明細書において「抗体模倣物」と呼称される）、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合物（場合により、「抗体結合物」と呼称される）及びそれぞれの各断片が挙げられる）を含有してもよい。

【0096】

1つの実施態様において、抗体は、例えばpI操作等の、ヘテロ二量体を産生するための操作を行うことができる定常ドメインを少なくとも1つ含有する限りにおいては、抗体断片である。用いることができる他の抗体断片としては、pI操作された本発明のCH1、CH2、CH3、ヒンジ及びCLドメインのうち1以上を含有する断片が挙げられる。例えば、Fc融合物は、他のタンパク質に融合されたFc領域（CH2及びCH3、任意選択的にヒンジ領域を伴う）の融合物である。多くのFc融合物が当分野に公知であり、本発明のヘテロ二量体化変異の付加により改善することができる。この場合において、抗体融合物は、CH1；CH1、CH2及びCH3；CH2；CH3；CH2及びCH3；CH1及びCH3を含有して作製することができ、本明細書に記述されるヘテロ二量体化変異の任意の組み合わせを利用し、それらのうちのいずれか、又はすべては、任意選択的にヒンジ領域と共に作製することができる。

【0097】

s c F vの実施態様

本発明の一部の実施態様において、1つのモノマーはFcドメインに連結されたs c F vを含有する重鎖を含有し、及び他のモノマーは、Fcドメインに連結されたF a bを含有する重鎖を含有し、例えば、「典型的な」重鎖及び軽鎖がある。本明細書において用いられる「F a b」又は「F a b領域」とは、VH、CH1、VL、及びCLイムノグロブリンドメインを含有するポリペプチドを意味する。F a bは、分離されたこの領域を指し、又は全長抗体、抗体断片もしくはF a b融合タンパク質に関する文脈におけるこの領域を指す。本明細書において、「F v」又は「F v断片」又は「F v領域」とは、1つの抗体のVL及びVHドメインを含有するポリペプチドを意味する。

【0098】

本明細書のヘテロ二量体抗体の実施態様のいくつかは、リンカーを用いて共有結合され、抗原結合ドメインを形成する可変重鎖及び可変軽鎖を含有する1以上のs c F vドメインの使用に依っている。本発明の一部の実施態様においては、「標準的な」リンカー（通常は、当分野に公知のセリン及びグリシンのリンカー）が用いられている。

【0099】

本発明はさらに、第一及び第二のモノマー間のpIにおける分離を促進するための荷電s c F vリンカーを開示する。すなわち、荷電s c F vリンカー（正電荷又は負電荷のいずれか（又は異なるモノマー上でs c F vを使用するスキャホールドの場合においては、両

10

20

30

40

50

方))を組み込むことにより、荷電リンカーを含有するモノマーは、Fcドメインにおいてさらなる変化を受けることなくpIを変化させることが可能になる。これらの荷電リンカーは、標準的なリンカーを含有する任意のscFvへと置換されてもよい。当業者に認識されているように、荷電scFvリンカーは、所望されるpIの変化に従い、正しい「鎖」又はモノマー上で用いられる。例えば、本明細書に検討されるように、三重F形式のヘテロ二量体抗体を作製するため、所望される抗原結合ドメインの各々に対するFv領域の元々のpIを算出し、scFvを作製するために1つが選択され、並びに、pIに依存して、正リンカー又は負リンカーのいずれかが選択される。

#### 【0100】

さらに、抗CD3scFv領域の場合においては、さらなる安定性をもたらすためにジスルフィド結合を可変重鎖及び可変軽鎖に組み込んでもよい。抗CD3scFvに関して適切なジスルフィド結合の配列は、図8に示す。

#### 【0101】

#### キメラ抗体及びヒト化抗体

一部の実施態様において、抗体は、異なる種由来の混合物であってもよい(例えば、キメラ抗体及び/又はヒト化抗体)。概して、「キメラ抗体」及び「ヒト化抗体」の両方は、2以上の種由来の領域を混合させた抗体を指す。例えば、「キメラ抗体」は伝統的に、マウス(又は一部の場においてはラット)由来の可変領域(複数含む)と、ヒト由来の定常領域(複数含む)を含有する。「ヒト化抗体」とは通常、ヒト抗体に存在する配列と、可変ドメインのフレームワーク領域を交換した非ヒト抗体を指す。一般的に、ヒト化抗体において、CDRを除く全抗体は、ヒト由来のポリヌクレオチドによりコードされるか、又はそのCDRを除き、その抗体と同一である。CDRは、その一部又はすべてが非ヒト生物に起源を有する核酸によりコードされており、ヒト抗体可変領域のシートフレームワークへと移植され、抗体を産生し、その特異性は、移植されたCDRにより決定される。そのような抗体の作製は、例えば、WO92/11018、Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536(すべて、参照により全体で援用される)に記述されている。最初に移植された構築物において失われたアフィニティを復活させるために、対応するドナー残基に対する選択されたアクセプターのフレームワーク残基の「復帰突然変異(back mutation)」がしばしば必要とされる(US5530101; US5585089; US5693761; US5693762; US6180370; US5859205; US5821337; US6054297; US6407213、すべて、参照により全体で援用される)。またヒト化抗体は、好ましくは、イムノグロブリン定常領域(通常は、ヒトイムノグロブリンのもの)の一部を少なくとも含有し、及びそれにより、ヒトFc領域を通常は含有する。ヒト化抗体はまた、遺伝子操作された免疫システムを有するマウスを用いて作製されてもよい。Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654、参照により全体で援用される。ヒト化、及び非ヒト抗体に再形成するための様々な技術及び方法が当分野に公知である(Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA)及びその中に引用される参照文献を参照のこと。すべて参照により全体で援用される)。ヒト化の方法としては、限定されないが、Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160:1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8に記述される方法が挙げられる(すべて参照により全体で援用される)。ヒト化、又は非ヒト抗体可変領域の免疫原性を減少させる他の方法としては、例えばRoguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973(参照により全体で援用される)に記述される再現方法

10

20

30

40

50

が挙げられる。1つの実施態様において、当分野で公知であるように、元の抗体は、アフィニティが成熟されている。構造を基にした方法を、ヒト化及びアフィニティ成熟のために用いてもよい（例えば、US N 11/004,590に記述されている）。選択ベースの方法を用いて、抗体可変領域をヒト化及び/又はアフィニティ成熟してもよく、限定されないが、Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759（すべて参照により全体で援用される）に記述される方法がある。他のヒト化の方法は、CDRの部分のみを移植するものであり、限定されないが、US N 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084に記述される方法（すべて参照により全体で援用される）が挙げられる。

#### 【0102】

##### ヘテロ二量体重鎖定常領域

したがって、本発明により、変異重鎖定常領域、及び特にFcドメインを第一のドメインとして含有するモノマーの使用に基づいたヘテロ二量体タンパク質が開示される。本明細書において、「モノマー」とは、ヘテロ二量体タンパク質の半分を意味する。従来の抗体は、実際には四量体（2つの重鎖と2つの軽鎖）であることに注記されたい。本発明の文脈において、重鎖と軽鎖の1つの対（もし該当する場合、例えばもしモノマーがFabを含有する場合）は、「モノマー」とみなされる。同様に、scFvを含有する重鎖領域はモノマーとみなされる。Fv領域が1つの融合パートナー（例えば、重鎖及び軽鎖可変ドメイン）であり、及び抗体ではないタンパク質が他の融合パートナーである場合には、それぞれの「半分」は、モノマーとみなされる。本質的に、定常領域のすべて（例えば、Ch1-ヒンジ-CH2-CH3）、Fc領域（CH2-CH3）又はただCH3ドメインのみであろうと、各モノマーはヘテロ二量体化操作を行うための十分な重鎖定常領域を含有している。

#### 【0103】

変異重鎖定常領域は、全長構築物、CH1-ヒンジ-CH2-CH3、又はその一部（例えば、CH2-CH3又はCH3のみ）を含む、重鎖定常領域のすべて、又は一部を含有してもよい。さらに、各モノマーの重鎖領域は、同じ主鎖（CH1-ヒンジ-CH2-CH3、又はCH2-CH3）であっても、異なってもよい。N末端切断及びC末端切断及び富化もまた、定義の中に含まれ；例えば、一部のpI変異は、重鎖ドメインのC末端への荷電アミノ酸の付加を含む。

#### 【0104】

ゆえに、概して、本発明の「三重F」構築物の1つのモノマーはscFv領域-ヒンジ-Fcドメインであり、他方はVH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3+関連軽鎖であり、ヘテロ二量体化変異（立体構造変異、アイソタイプ変異、電荷ステアリング、並びにpI変異、Fc及びFcRn変異、欠落変異を含む）、及びこれら領域に含有される追加の抗原結合ドメイン（任意のリンカーと共に）を伴う。

#### 【0105】

本明細書に概要されるヘテロ二量体化変異（例えば、立体構造変異及びpI変異）に加え、重鎖領域はまた、追加のアミノ酸置換（以下に検討されるFcR及びFcRn結合を改変するための変化を含む）を含有してもよい。

#### 【0106】

加えて、一部のモノマーは、変異重鎖定常領域とその融合パートナーの間にリンカーを用いてもよい。「栓抜き型」のscFv部分に対しては、当分野に公知の標準的なリンカー、又は本明細書に開示される荷電scFvリンカーを用いることができる。追加の融合パートナーを作製する場合には（例えば、図1及び2）、従来のペプチドリンカー（グリシン及びセリンの可塑性リンカー、又は図9の荷電リンカーが挙げられる）を用い

てもよい。一部の場において、モノマー成分としての使用のためのリンカーは、ADC構築物に対し以下に定義されるものとは異なり、及び多くの実施態様においては、開裂可能なリンカー（例えば、プロテアーゼ感受性のもの）ではないが、開裂可能なリンカーも、一部の実施態様においては用途が見出されうる。

#### 【0107】

ヘテロ二量体化変異には多くの異なるタイプの変異が含まれ、限定されないが、立体構造変異（電荷変異が挙げられる）及びpI変異が挙げられ、任意選択的及び独立して、任意の他の変異と組み合わせることができる。これらの実施態様において、「モノマーA」と「モノマーB」を合致させることが重要である；すなわち、もしヘテロ二量体タンパク質が立体構造変異及びpI変異の両方に依っている場合、これらは的確に互いのモノマーに合致している必要がある：例えば、作用する立体構造変異のセット（モノマーAの1セット、モノマーBの1セット）は、pIを変化させうる立体構造変異が適切なモノマー上に配置されるよう、pIの「鎖状構造らしさ」を考慮しながら、所望される機能を得るために各モノマー上の変異が設計されるよう、pI変異セット（モノマーAの1セット、モノマーBの1セット）と組み合わせられる。

10

#### 【0108】

本明細書に概要されるヘテロ二量体化変異（例えば、限定されないが、図3及び12に示される変異が挙げられる）は、任意選択的に、及び独立して、任意の他のモノマー上で、及び任意の他の変異と組み合わせることができることに注記されたい。すなわち、ヘテロ二量体化にとって重要なことは、変異の「セット」が存在し、1つのモノマーに対する1つのセットは、他のモノマーに対する1つのセットでもあるということである。これらが形式1から1へと組み合わせられるか（例えば、モノマー1のリストは両立することができる）、又は交換されるか（モノマー1のpI変異とモノマー2の立体構造変異を交換）は重要ではない。しかしながら、本明細書に注記されるように、上述の組み合わせが形成された際、「鎖状構造らしさ」は保存されていなければならない。さらに、追加のFc変異に対して（例えば、FcR結合、FcRn結合等に対して）は、いずれかモノマー、又は両方のモノマーが、列記される変異のいずれかを独立して、及び任意選択的に含有することができる。一部の場において、両方のモノマーが、追加の変異を有しており、及び一部においては、1つのモノマーのみが追加の変異を有しており、又はそれらは組み合わせられてもよい。

20

30

#### 【0109】

##### ヘテロ二量体化変異

本発明により、ヘテロ二量体の形成及び/又は同種二量体からのヘテロ二量体の精製が可能となるヘテロ二量体化変異を利用した、様々な形式のヘテロ二量体抗体を含有するヘテロ二量体タンパク質が開示される。

#### 【0110】

##### 立体構造変異

一部の実施態様において、ヘテロ二量体の形成は、立体構造変異の追加により促進することができる。すなわち、各重鎖のアミノ酸を変えることにより、異なる重鎖が関連し、同じFcアミノ酸配列を有する同種二量体の形成よりも、ヘテロ二量体構造の形成のほうが多くなる可能性がある。適切な立体構造変異は図3並びに図12A、12B、12C、12D、12F及び12Gに示されている。

40

#### 【0111】

1つのメカニズムは通常、当分野において「ノブとホール（knobs and holes）」と呼称されており、同種二量体形成に不利に働き、ヘテロ二量体形成に有利に働くよう、立体的影響を与えるアミノ酸操作を指し、これもまた任意選択的に用いることができる；これは、場合により、「ノブとホール（knobs and holes）」と呼称され、US SN 61/596,846、Ridgway et al., Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270:26; 米国特許第8,216,805号に記述されている（すべて参照により全体で本明細書に援用される）。

50

図において、「ノブとホール (knobs and holes)」に依存する多くの「モノマー A - モノマー B」の対を特定している。さらに、Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998)に記述されるように、これら「ノブとホール (knobs and holes)」変異は、ジスルフィド結合と組み合わせ、構造をヘテロ二量体化へとねじれさせてもよい。

【0112】

ヘテロ二量体形成の作製に使用することができる追加のメカニズムは、一部の場において、「静電的ステアリング」と呼称されるものである (Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010) (参照によりその全体が本明細書に援用される)に開示される)。これは、場合によって、本明細書において「電荷対」と呼称される。この実施態様においては、静電学を用いて、構造をヘテロ二量体形成へとねじれさせる。当分野において公知であるが、これらはまた、pIに対する効果を有してもよく、ゆえに精製に対しても効果があり、一部の場においては、pI変異ともみなされることがある。しかしながら、これらはヘテロ二量体化を推し進めるために作製されたものであり、精製のためのツールとして用いられるものではなかったため、それらは、「立体構造変異」として分類されている。これらには、限定されないが、例えばD221R/P228R/K409Rと対形成したD221E/P228E/L368E (例えば、これらは、「モノマー対応セット」である)及びC220R/E224R/P228R/K409Rと対形成したC220E/P228E/368Eが挙げられる。

10

【0113】

他の変異と組み合わせることができる追加のモノマー A 及びモノマー B 変異は、任意選択的及び独立して、任意の量で、例えば本明細書に概要されるpI変異又はUS2012/0149876の図37 (その図及びその説明箇所及び配列番号は、参照により本明細書に明示的に援用される)に示される他の立体構造変異等がある。

20

【0114】

一部の実施態様において、本明細書に概要される立体構造変異は、任意選択的に、及び独立して、任意のpI変異 (又は例えばFc変異、FcRn変異等の他の変異)とともに1つのモノマー又は両方のモノマーへと組み込まれることができ、並びに、任意選択的に及び独立して、本発明のタンパク質に含有され、又は除外されることができる。

【0115】

ヘテロ二量体に対するpI (等電点) 変異

概して、当業者に認識されているように、pI変異には2つの一般的なカテゴリーが存在する：タンパク質のpIを増加させるもの (塩基性変化)、及びタンパク質のpIを増加させるもの (酸性変化) である。本明細書に開示されるように、これら変異のすべての組み合わせを行うことができる：1つのモノマーは野生型、又は野生型と有意に異なるpIを示さない変異であってもよく、及び他方は、より塩基性又はより酸性であってもよい。あるいは、各モノマーが変更され、1つのより塩基性に、及び1つがより酸性となる。

30

【0116】

pI変異の好ましい組み合わせを、図3及び12Eに示す。

【0117】

重鎖のpI変化

多くのpI変異を、図54及び55に示す。本明細書に概要され、図面に示されるように、これら変化は、IgG1と比較して示されているが、全てのアイソタイプ並びにアイソタイプハイブリッドもこのように改変することができる。

40

【0118】

重鎖定常ドメインがIgG2~4由来である場合において、R133E及びR133Qを用いてもよい。

【0119】

抗体ヘテロ二量体軽鎖の変異

抗体をベースにしたヘテロ二量体の場合、例えば、モノマーの内の少なくとも1つが重鎖

50

ドメインに加えて軽鎖を含有する場合、p I 変異を当該軽鎖に行ってもよい。軽鎖の p I を低下させるためのアミノ酸置換としては、限定されないが、K 1 2 6 E、K 1 2 6 Q、K 1 4 5 E、K 1 4 5 Q、N 1 5 2 D、S 1 5 6 E、K 1 6 9 E、S 2 0 2 E、K 2 0 7 E、及び軽鎖の C 末端へのペプチド D E D E の付加が挙げられる。定常 軽鎖に基づいたこのカテゴリーにおける変化は、R 1 0 8 Q、Q 1 2 4 E、K 1 2 6 Q、N 1 3 8 D、K 1 4 5 T、及び Q 1 9 9 E で 1 以上の置換を含有する。さらに、軽鎖の p I の増加が行われてもよい。

【 0 1 2 0 】

#### アイソタイプ変異

さらに、本発明の多くの実施態様は、1つの I g G アイソタイプから他のタイプへと、特定の位置で p I アミノ酸を「導入すること」に依っており、それにより、望ましくない免疫原性が変異体に導入される可能性が減少又は排除される。これらの多くを図 1 0 A 及び 1 0 B に示す。すなわち、I g G 1 は、様々な理由（高いエフェクター機能を含む）により、治療抗体として普遍的なアイソタイプである。しかしながら、I g G 1 の重鎖定常領域は、I g G 2 よりも高い p I（7 . 3 1 に対して、8 . 1 0）を有している。特定の位置で I g G 1 主鎖に I g G 2 の残基を導入することにより、得られたモノマーの p I は低下し（又は増加し）、さらに、血清半減期が延長される。例えば、I g G 1 は、1 3 7 位でグリシン（p I 5 . 9 7）を有しており、I g G 2 は、グルタミン酸（p I 3 . 2 2）を有している；グルタミン酸の導入により、結果として得られるタンパク質の p I は影響を受ける。以下に記述されるように、通常、変異抗体の p I に有意な影響を与えるためには、多くのアミノ酸置換が必要とされる。しかしながら、以下に検討されるように、I g G 2 分子に等しい変化をもたらすことにより、血清半減期を増加することができる。

【 0 1 2 1 】

他の実施態様において、得られるタンパク質全体の電荷状態を減少させる（例えば、高い p I のアミノ酸を低い p I のアミノ酸へと変えることにより）、又は安定性を目的とした構造の調節を可能とさせる等ために、非アイソタイプのアミノ酸変化が行われる（以下に詳述される）。

【 0 1 2 2 】

さらに、重鎖及び軽鎖の定常ドメインの両方を p I 操作することにより、ヘテロ二量体の各モノマーにおいて有意な変化が見られる。本明細書において検討されるように、2つのモノマーの p I を少なくとも 0 . 5 まで変えることにより、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動、又は他の等電点を感知できる方法による分離が可能となる。

【 0 1 2 3 】

#### p I の算出

各モノマーの p I は、変異重鎖定常ドメイン及び総モノマー（変異重鎖定常ドメイン及び融合パートナーを含む）の p I に依存しうる。ゆえに、一部の実施態様において、p I における変化は、図 5 3 のチャートを用いて、変異重鎖定常ドメインに基づいて算出される。本明細書に検討されるように、どのモノマーが操作されるべきかは、通常、F v の本来の p I 及びスキャホールド領域により決定される。あるいは、各モノマーの p I が比較されてもよい。

【 0 1 2 4 】

#### ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質

ヘテロ二量体抗体に加え、本発明により、変異 F c 領域及び第一の融合パートナー及び第二の融合パートナーを含有する（また、変異 F c 領域及び第二の融合パートナーを含有してもよい）第一のモノマーを含有するヘテロ二量体タンパク質が開示される。変異 F c 領域は、本明細書にあるように抗体に対して操作され、ゆえに、異なっており、及び概して、第一の融合パートナー及び第二の融合パートナーも同様に異なっている。一部の例において、1つのモノマーが抗体ベースであり（例えば、標準的な重鎖及び軽鎖を含有するか、又は s c F v を有する F c ドメインを含有するかのいずれか）、他方が F c 融合タンパク質である場合、得られたヘテロ二量体タンパク質は「融合体」と呼ばれる。

10

20

30

40

50

## 【0125】

FcRnのin vivo結合の改善にも寄与するpI変異

pI変異がモノマーのpIを減少させる場合、in vivoの血清滞留を改善するという利点加わりうる。

## 【0126】

まだ検証中ではあるが、エンドソーム内でpH6でFcRnに結合することによりFcが隔離されるため、Fc領域は、in vivo半減期を延長させると考えられている(Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today, 18(12): 592-598、参照により全体で援用される)。次いで、エンドソーム分画は、Fcを細胞表面へとリサイクルする。分画が細胞外領域(pHは約7.4で高い)へと開いた時点で、Fcは血液中へ放出される。マウスにおいて、Dall'Acquaらが、pH6及びpH7.4でのFcRn結合を増強したFc変異体が、血清濃度を実際に減少させ、野生型Fcと同じ程度の半減期を有したことを示している(Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180、参照により全体で援用される)。pH7.4でのFcRnに対するFcのアフィニティを増加させることにより、Fcの血液中への放出が阻害されると考えられている。それゆえ、Fcのin vivo半減期を増加させるFc変異は、高いpHでFcを放出させながら、低いpHでFcRn結合を理想的に増強する。アミノ酸のヒスチジンは、6.0~7.4のpH範囲でのその電荷状態を変化させる。それゆえ、Fc/FcRn複合体において、His残基が重要な位置に存在することは、驚くべきことではない。

## 【0127】

近年、低い等電点を有する可変領域を伴う抗体は、血清半減期が長いということが推測されている(Igawa et al., 2010 PEDS, 23(5): 385-392、参照により全体が援用される)。しかしながら、そのメカニズムはまだ解明されていない。さらに、可変領域は抗体ごとに異なっている。pIが減少し、半減期が延長された定常領域変異体は、本明細書に開示される、抗体の薬物動態学的特性を改善するための、よりモジュール的な方法を提示するものである。

## 【0128】

本実施態様並びに、精製最適化のための用途が見出されるpI変異は、図20に開示されている。

## 【0129】

ヘテロ二量体変異の組み合わせ

当業者に認識されているように、列挙されるヘテロ二量体化変異のすべては、その「鎖状構造らしさ」又は「モノマー分離」が保持されている限り、任意選択的に、及び独立して、いずれかの方法で組み合わせることができる。さらに、これら変異のすべては、任意のヘテロ二量体形式へと組み合わせることができる。

## 【0130】

pI変異の場合において、図に実施態様から見出される特定の用途が示されているが、精製を容易にするための2つのモノマー間のpI差の改変に関する基本的なルールに従い、他の組み合わせを作製してもよい。

## 【0131】

本発明の核酸

本発明はさらに、本発明のヘテロ二量体タンパク質をコードする核酸組成物を開示する。当業者に認識されているように、核酸組成物は、ヘテロ二量体タンパク質の形式及びスキューホールドに依存する。ゆえに、例えば、当該形式が3つのアミノ酸配列を必要とする場合、例えば、三重F形式に対して(例えば、第一のアミノ酸モノマーがFcドメイン及びscFvを含有し、第二のアミノ酸モノマーが重鎖及び軽鎖を含有する)、3つの核酸配列を、発現のために1以上の発現ベクターに組み込んでもよい。同様に、一部の形式(例えば、図1Mに開示されるような二重scFv形式)では、2つの核酸のみが必要とされる(再度、それらは1又は2の発現ベクターへと挿入されることができる)。

## 【0132】

### 標的抗原

本発明のヘテロ二量体タンパク質は、事実上、全ての抗原を標的としうる。「三重F」形式は、特に2（以上）の異なる抗原を標的とする場合に有益である。（本明細書に概要されるように、この標的化は、形式によって、一価性及び二価性の結合のいずれの組み合わせであってもよい）。ゆえに、本明細書において、イムノグロブリンは、好ましくは2つの標的抗原を共捕捉するが、一部の場合においては、3又は4の抗原が、一価性に捕捉されてもよい。各モノマーの特異性は、以下のリストから選択されてもよい。本明細書に開示される三重Fイムノグロブリンが、異なる抗原を標的化する場合に特に有益である一方、一部の場合においては、1つの抗原のみを標的とすることが有益である場合もある。すなわち、各モノマーが、同じ抗原に対する特異性を有してもよい。

10

#### 【0133】

本明細書のヘテロ二量体タンパク質の特定の適当な応用としては、各標的抗原を一価性に捕捉することが有益又は重要である共標的対である。そのような抗原は、例えば、免疫複合体の形成で活性化される免疫受容体であってもよい。多くの免疫受容体の細胞活性化は、通常、抗体/抗原免疫複合体により、又はエフェクター細胞の標的細胞捕捉を介して得られる架橋によってのみ発生する。一部の免疫受容体について、例えば、T細胞上のCD3シグナル伝達受容体の例に関しては、共捕捉された標的の捕捉でのみ発生する活性化が重要であり、臨床状況で非特異的架橋が発生すると、サイトカインストームや毒性が発現しうる。治療的には、本明細書のイムノグロブリンを用いてそのような抗原を多価性ではなく一価性に捕捉することにより、主要標的抗原の微小環境中の架橋に対してのみ応答し、そのような活性化が発生する。2つの異なる抗原を、異なる価数で標的とする能力は、新規であり、本発明の有用性でもある。治療的に有益であり、一価性の共捕捉が必要とされる標的抗原の例としては、限定されないが、例えばCD3、FcR、トールライク受容体（TLR）（例えば、TLR4及びTLR9）、サイトカイン、ケモカイン、サイトカイン受容体及びケモカイン受容体等の免疫活性化受容体など挙げられる。多くの実施態様において、抗原結合部位のうちの1つがCD3に結合し、一部の実施態様においては、それはscFv含有モノマーである。

20

#### 【0134】

事実上、すべての抗原が、本明細書のイムノグロブリンの標的となり得、限定されないが、以下の標的抗原のリストにあるタンパク質、サブユニット、ドメイン、モチーフ、及び/又はエピトープが挙げられ、それらは、例えば、サイトカイン等の可溶性因子及び膜結合因子（膜貫通型受容体（17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIAALK-2、アクチビンRIBALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、-1-抗トリプシン、-V/-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン（Artemin）、抗-Id、ASPARTIC、心房ナトリウム利尿性因子、av/b3インテグリン、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2、BMP-2a、BMP-3、Osteogenin、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vgr-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMPs、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC

30

40

50

、補体因子3 (C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8  
 、カルシトニン、cAMP、癌胎児抗原(CEA)、癌関連抗原、カテプシンA、カテプ  
 シンB、カテプシンC/DPP1、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプ  
 シンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、  
 CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL1  
 4、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL  
 20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、C  
 CL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8  
 、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、  
 CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD 10  
 3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD  
 11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、  
 CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29  
 、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67 proteins)、CD34  
 、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD  
 52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、C  
 D80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD  
 140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACA  
 M5、CFTR、cGMP、CINC、ポツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8  
 -1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、 20  
 CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3C  
 R1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CX  
 CL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL  
 12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR  
 1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫  
 瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壊促進因子、des(1-  
 3)-IGF-I(脳IGF-1)、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、  
 Dpp、DPP1V/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A  
 2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、  
 エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpC 30  
 AM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、第I  
 Ia因子、第VII因子、第VIIc因子、第IX因子、線維芽細胞活性化タンパク質  
 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FG  
 F-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、Fibrin、FL、FLI  
 P、Flt-3、Flt-4、濾胞刺激ホルモン、フラクタルキン、FZD1、FZD2  
 、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD1  
 0、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-  
 1、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14、CDMP-1)、GDF-  
 6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GD  
 F-8(ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDN 40  
 F、GFAP、GFRa-1、GFR-1、GFR-2、GFR-3、GITR、  
 グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIa(GPIIb/IIa)、G  
 M-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン(NP-  
 cap又はNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベローブ糖タ  
 ンパク質、HCMV) gHエンベローブ糖タンパク質、HCMV UL、造血増殖因子(  
 HGF)、HepB gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu(Erb  
 B-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、ヘルペス単純ウイル  
 ス(HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量メラノ  
 ーマ関連抗原(HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp120  
 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk 50

、ヒト心筋ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン (INF) - 、INF - 、INF - 、インヒピン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様成長因子1、インテグリン 2、インテグリン 3、インテグリン 4、インテグリン 4 / 1、インテグリン 4 / 7、インテグリン 5 ( V)、インテグリン 5 / 1、インテグリン 5 / 3、インテグリン 6、インテグリン 1、インテグリン 2、インターフェロン 、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、角化細胞増殖因子 (KGF)、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP (TGF- 1)、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、ルイスY抗原、ルイスY関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺サーファクタント、黄体形成ホルモン、リンホトキシン 受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARCA、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1 - 、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン (Muc1)、MUC18、MueLLerianインヒビチン物質、Mug、MusK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cadherin、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリリシン、ニューロトロフィン-3、-4、又は6、ニュールツリン、神経増殖因子 (NGF)、NGFR、NGF - 、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP)、PLGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロリラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、レニン、呼吸系発疹ウイルス (RSV) F、RSV Fgp、Ret、リウマチ性因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘍関連糖タンパク質72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体 (例えば、T細胞受容体 / )、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、精巣PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF - 、TGF - 、TGF - Pan S p e c i f i c、TGF - RI (ALK-5)、TGF - RII、TGF - RIIb、TGF - RIII、TGF - 1、TGF - 2、TGF - 3、TGF - 4、TGF - 5、トロンピン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF - 、TNF - 、TNF - 2、TNFc、TNF-R1、TNF-RII、TNF

R S F 1 0 A ( T R A I L R 1 A p o - 2 , D R 4 ) , T N F R S F 1 0 B ( T R A I L R 2 D R 5 , K I L L E R , T R I C K - 2 A , T R I C K - B ) , T N F R S F 1 0 C ( T R A I L R 3 D c R 1 , L I T , T R I D ) , T N F R S F 1 0 D ( T R A I L R 4 D c R 2 , T R U N D D ) , T N F R S F 1 1 A ( R A N K O D F R , T R A N C E R ) , T N F R S F 1 1 B ( O P G O C I F , T R 1 ) , T N F R S F 1 2 ( T W E A K R F N 1 4 ) , T N F R S F 1 3 B ( T A C I ) , T N F R S F 1 3 C ( B A F F R ) , T N F R S F 1 4 ( H V E M A T A R , H v e A , L I G H T R , T R 2 ) , T N F R S F 1 6 ( N G F R p 7 5 N T R ) , T N F R S F 1 7 ( B C M A ) , T N F R S F 1 8 ( G I T R A I T R ) , T N F R S F 1 9 ( T R O Y T A J , T R A D E ) , T N F R S F 1 9 L ( R E L T ) , T N F R S F 1 A ( T N F R I C D 1 2 0 a , p 5 5 - 6 0 ) , T N F R S F 1 B ( T N F R I I C D 1 2 0 b , p 7 5 - 8 0 ) , T N F R S F 2 6 ( T N F R H 3 ) , T N F R S F 3 ( L T b R T N F R I I I , T N F C R ) , T N F R S F 4 ( O X 4 0 A C T 3 5 , T X G P 1 R ) , T N F R S F 5 ( C D 4 0 p 5 0 ) , T N F R S F 6 ( F a s A p o - 1 , A P T 1 , C D 9 5 ) , T N F R S F 6 B ( D c R 3 M 6 8 , T R 6 ) , T N F R S F 7 ( C D 2 7 ) , T N F R S F 8 ( C D 3 0 ) , T N F R S F 9 ( 4 - 1 B B C D 1 3 7 , I L A ) , T N F R S F 2 1 ( D R 6 ) , T N F R S F 2 2 ( D c T R A I L R 2 T N F R H 2 ) , T N F R S T 2 3 ( D c T R A I L R 1 T N F R H 1 ) , T N F R S F 2 5 ( D R 3 A p o - 3 , L A R D , T R - 3 , T R A M P , W S L - 1 ) , T N F S F 1 0 ( T R A I L A p o - 2 リガンド、T L 2 ) , T N F S F 1 1 ( T R A N C E / R A N K リガンド O D F , O P G リガンド ) , T N F S F 1 2 ( T W E A K A p o - 3 リガンド、D R 3 リガンド ) , T N F S F 1 3 ( A P R I L T A L L 2 ) , T N F S F 1 3 B ( B A F F B L Y S , T A L L 1 , T H A N K , T N F S F 2 0 ) , T N F S F 1 4 ( L I G H T H V E M リガンド、L T g ) , T N F S F 1 5 ( T L 1 A / V E G I ) , T N F S F 1 8 ( G I T R リガンド A I T R リガンド、T L 6 ) , T N F S F 1 A ( T N F - a コネクチン、D I F , T N F S F 2 ) , T N F S F 1 B ( T N F - b L T a , T N F S F 1 ) , T N F S F 3 ( L T b T N F C , p 3 3 ) , T N F S F 4 ( O X 4 0 リガンド g p 3 4 , T X G P 1 ) , T N F S F 5 ( C D 4 0 リガンド C D 1 5 4 , g p 3 9 , H I G M 1 , I M D 3 , T R A P ) , T N F S F 6 ( F a s リガンド A p o - 1 リガンド、A P T 1 リガンド ) , T N F S F 7 ( C D 2 7 リガンド C D 7 0 ) , T N F S F 8 ( C D 3 0 リガンド C D 1 5 3 ) , T N F S F 9 ( 4 - 1 B B リガンド C D 1 3 7 リガンド ) , T P - 1 , t - P A , T p o , T R A I L , T R A I L R , T R A I L - R 1 , T R A I L - R 2 , T R A N C E , t r a n s f e r r i n g 受容体、T R F , T r k , T R O P - 2 , T S G , T S L P、腫瘍関連抗原 C A 1 2 5、腫瘍関連抗原発現ルイス Y 関連糖質、T W E A K、T X B 2、U n g、u P A R、u P A R - 1、ウロキナーゼ、V C A M、V C A M - 1、V E C A D、V E - カドヘリン、V E - カドヘリン 2、V E F G R - 1 ( f l t - 1 )、V E G F、V E G F R、V E G F R - 3 ( f l t - 4 )、V E G I、V I M、ウイルス性抗原、V L A、V L A - 1、V L A - 4、V N R インテグリン、v o n W i l l e b r a n d s 因子、W I F - 1、W N T 1、W N T 2、W N T 2 B / 1 3、W N T 3、W N T 3 A、W N T 4、W N T 5 A、W N T 5 B、W N T 6、W N T 7 A、W N T 7 B、W N T 8 A、W N T 8 B、W N T 9 A、W N T 9 B、W N T 1 0 A、W N T 1 0 B、W N T 1 1、W N T 1 6、X C L 1、X C L 2、X C R 1、X C R 1、X E D A R、X I A P、X P D が挙げられる )、並びにホルモン及び増殖因子に対する受容体、が挙げられる ) の両方が挙げられる。本発明の二重特異性又は三重特異性抗体を形成するために、これら抗原に対する任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

【 0 1 3 5 】

本発明のイムノグロブリンにより特異的に標的とされうる抗原の例としては、限定されないが、以下が挙げられる：C D 2 0、C D 1 9、H e r 2、E G F R、E p C A M、C D

3、Fc R I I I a ( C D 1 6 )、Fc R I I a ( C D 3 2 a )、Fc R I I b ( C D 3 2 b )、Fc R I ( C D 6 4 )、トールライク受容体 ( T L R ) ( 例 えば、T L R 4 及 び T L R 9 )、サイトカイン ( 例 えば、I L - 2、I L - 5、I L - 1 3、I L - 1 2、I L - 2 3、及 び T N F )、サイトカイン受容体 ( 例 えば、I L - 2 R )、ケモカイン、ケモカイン受容体、増殖因子 ( 例 えば、V E G F 及 び H G F )。本発明の多重特異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

【 0 1 3 6 】

二重特異性抗体の特に好ましい組み合わせは、C D 3 に対する抗原結合ドメイン及び C D 1 9 に対する抗原結合ドメイン；C D 3 に対する抗原結合ドメイン及び C D 3 3 に対する抗原結合ドメイン；C D 3 に対する抗原結合ドメイン及び C D 3 8 に対する抗原結合ドメイン、である。再度、多くの実施態様において、C D 3 結合ドメインは、図に例示的な配列が示されている、s c F v であり、及び / 又は概要される C D 3 C D R である。

【 0 1 3 7 】

適切な標的抗原及び共標的の選択は、所望される治療アプリケーションによる。抗体治療に特に適していることが証明されている標的の一部は、シグナル伝達機能を有するものである。他の治療用抗体は、受容体とその関連リガンドの間の結合を阻害することによって、受容体のシグナル伝達を妨害することにより、その効果を発揮する。治療用抗体の他の作用メカニズムは、受容体の下方制御をもたらすものである。他の抗体は、その標的抗原を介したシグナル伝達により、作用しない。共標的の選択は、治療される症状の病態の根底にある詳細な生態に依存する。

【 0 1 3 8 】

モノクローナル抗体療法は、癌に対する重要な治療モダリティとして統合されている ( W e i n e r e t a l . , 2 0 1 0 , N a t u r e R e v i e w s I m m u n o l o g y 1 0 : 3 1 7 - 3 2 7 ; R e i c h e r t e t a l . , 2 0 0 5 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 3 [ 9 ] : 1 0 7 3 - 1 0 7 8 、参照により本明細書に明示的に援用される)。抗癌治療に関しては、1つの抗原(抗原1)を標的とすることが望ましく、抗原1の発現は癌性細胞に限定されている一方で、何らかの免疫学的殺傷活性を調節する第二の抗原(抗原2)を共標的化する。他の治療に対しては、2つの抗原を共標的化することが有益であり得、例えば、腫瘍の増殖に何らかの役割を果たすことが知られている2つの血管新生因子、又は2つの増殖因子等を共標的化する。腫瘍に関する、共標的の例としては、限定されないが、H G F 及び V E G F、I G F - 1 R 及び V E G F、H e r 2 及び V E G F、C D 1 9 及び C D 3、C D 2 0 及び C D 3、H e r 2 及び C D 3、C D 1 9 及び F c R I I I a、C D 2 0 及び F c R I I I a、H e r 2 及び F c R I I I a が挙げられる。本発明のイムノグロブリンは、V E G F 及びホスファチジルセリン；V E G F 及び E r b B 3；V E G F 及び P L G F；V E G F 及び R O B O 4；V E G F 及び B S G 2；V E G F 及び C D C P 1；V E G F 及び A N P E P；V E G F 及び c - M E T；H E R - 2 及び E R B 3；H E R - 2 及び B S G 2；H E R - 2 及び C D C P 1；H E R - 2 及び A N P E P；E G F R 及び C D 6 4；E G F R 及び B S G 2；E G F R 及び C D C P 1；E G F R 及び A N P E P；I G F 1 R 及び P D G F R；I G F 1 R 及び V E G F；I G F 1 R 及び C D 2 0；C D 2 0 及び C D 7 4；C D 2 0 及び C D 3 0；C D 2 0 及び D R 4；C D 2 0 及び V E G F R 2；C D 2 0 及び C D 5 2；C D 2 0 及び C D 4；H G F 及び c - M E T；H G F 及び N R P 1；H G F 及びホスファチジルセリン；E r b B 3 及び I G F 1 R；E r b B 3 及び I G F 1, 2；c - M e t 及び H e r - 2；c - M e t 及び N R P 1；c - M e t 及び I G F 1 R；I G F 1, 2 及び P D G F R；I G F 1, 2 及び C D 2 0；I G F 1, 2 及び I G F 1 R；I G F 2 及び E G F R；I G F 2 及び H E R 2；I G F 2 及び C D 2 0；I G F 2 及び V E G F；I G F 2 及び I G F 1 R；I G F 1 及び I G F 2；P D G F R a 及び V E G F R 2；P D G F R a 及び P L G F；P D G F R a 及び V E G F；P D G F R a 及び c - M e t；P D G F R a 及び E G F R；P D G F R b 及び V E G F R 2；P D G F R b 及び c - M e t；P D G F R b 及び E G

10

20

30

40

50

FR ; RON 及び c - Met ; RON 及び M T S P 1 ; RON 及び M S P ; RON 及び C D C P 1 ; V G F R 1 及び P L G F ; V G F R 1 及び RON ; V G F R 1 及び E G F R ; V E G F R 2 及び P L G F ; V E G F R 2 及び N R P 1 ; V E G F R 2 及び RON ; V E G F R 2 及び D L L 4 ; V E G F R 2 及び E G F R ; V E G F R 2 及び R O B O 4 ; V E G F R 2 及び C D 5 5 ; L P A 及び S 1 P ; E P H B 2 及び RON ; C T L A 4 及び V E G F ; C D 3 及び E P C A M ; C D 4 0 及び I L 6 ; C D 4 0 及び I G F ; C D 4 0 及び C D 5 6 ; C D 4 0 及び C D 7 0 ; C D 4 0 及び V E G F R 1 ; C D 4 0 及び D R 5 ; C D 4 0 及び D R 4 ; C D 4 0 及び A P R I L ; C D 4 0 及び B C M A ; C D 4 0 及び R A N K L ; C D 2 8 及び M A P G ; C D 8 0 及び C D 4 0 ; C D 8 0 及び C D 3 0 ; C D 8 0 及び C D 3 3 ; C D 8 0 及び C D 7 4 ; C D 8 0 及び C D 2 ; C D 8 0 及び C D 3 ; C D 8 0 及び C D 1 9 ; C D 8 0 及び C D 4 ; C D 8 0 及び C D 5 2 ; C D 8 0 及び V E G F ; C D 8 0 及び D R 5 ; C D 8 0 及び V E G F R 2 ; C D 2 2 及び C D 2 0 ; C D 2 2 及び C D 8 0 ; C D 2 2 及び C D 4 0 ; C D 2 2 及び C D 2 3 ; C D 2 2 及び C D 3 3 ; C D 2 2 及び C D 7 4 ; C D 2 2 及び C D 1 9 ; C D 2 2 及び D R 5 ; C D 2 2 及び D R 4 ; C D 2 2 及び V E G F ; C D 2 2 及び C D 5 2 ; C D 3 0 及び C D 2 0 ; C D 3 0 及び C D 2 2 ; C D 3 0 及び C D 2 3 ; C D 3 0 及び C D 4 0 ; C D 3 0 及び V E G F ; C D 3 0 及び C D 7 4 ; C D 3 0 及び C D 1 9 ; C D 3 0 及び D R 5 ; C D 3 0 及び D R 4 ; C D 3 0 及び V E G F R 2 ; C D 3 0 及び C D 5 2 ; C D 3 0 及び C D 4 ; C D 1 3 8 及び R A N K L ; C D 3 3 及び F T L 3 ; C D 3 3 及び V E G F ; C D 3 3 及び V E G F R 2 ; C D 3 3 及び C D 4 4 ; C D 3 3 及び D R 4 ; C D 3 3 及び D R 5 ; D R 4 及び C D 1 3 7 ; D R 4 及び I G F 1 , 2 ; D R 4 及び I G F 1 R ; D R 4 及び D R 5 ; D R 5 及び C D 4 0 ; D R 5 及び C D 1 3 7 ; D R 5 及び C D 2 0 ; D R 5 及び E G F R ; D R 5 及び I G F 1 , 2 ; D R 5 及び I G F R、D R 5 及び H E R - 2、並びに、E G F R 及び D L L 4 に結合することができる。他の標的の組み合わせとしては、E G F / e f b - 2 / e r b - 3 ファミリーのうちの 1 以上の因子が挙げられる。

【 0 1 3 9 】

本明細書のイムノグロブリンが結合しうる癌性疾患に關与する他の標的 ( 1 以上 ) としては、限定されないが、C D 5 2、C D 2 0、C D 1 9、C D 3、C D 4、C D 8、B M P 6、I L 1 2 A、I L 1 A、I L 1 B、1 L 2、I L 2 4、I N H A、T N F、T N F S F 1 0、B M P 6、E G F、F G F 1、F G F 1 0、F G F 1 1、F G F 1 2、F G F 1 3、F G F 1 4、F G F 1 6、F G F 1 7、F G F 1 8、F G F 1 9、F G F 2、F G F 2 0、F G F 2 1、F G F 2 2、F G F 2 3、F G F 3、F G F 4、F G F 5、F G F 6、F G F 7、F G F 8、F G F 9、G R P、I G F 1、I G F 2、I L 1 2 A、I L 1 A、I L 1 B、1 L 2、I N H A、T G F A、T G F B 1、T G F B 2、T G F B 3、V E G F、C D K 2、F G F 1 0、F G F 1 8、F G F 2、F G F 4、F G F 7、I G F 1 R、I L 2、B C L 2、C D 1 6 4、C D K N 1 A、C D K N 1 B、C D K N 1 C、C D K N 2 A、C D K N 2 B、C D K N 2 C、C D K N 3、G N R H 1、I G F B P 6、I L 1 A、I L 1 B、O D Z 1、P A W R、P L G、T G F B 1 I 1、A R、B R C A 1、C D K 3、C D K 4、C D K 5、C D K 6、C D K 7、C D K 9、E 2 F 1、E G F R、E N O 1、E R B B 2、E S R 1、E S R 2、I G F B P 3、I G F B P 6、I L 2、I N S L 4、M Y C、N O X 5、N R 6 A 1、P A P、P C N A、P R K C Q、P R K D 1、P R L、T P 5 3、F G F 2 2、F G F 2 3、F G F 9、I G F B P 3、I L 2、I N H A、K L K 6、T P 5 3、C H G B、G N R H 1、I G F 1、I G F 2、I N H A、I N S L 3、I N S L 4、P R L、K L K 6、S H B G、N R 1 D 1、N R 1 H 3、N R 1 I 3、N R 2 F 6、N R 4 A 3、E S R 1、E S R 2、N R 0 B 1、N R 0 B 2、N R 1 D 2、N R 1 H 2、N R 1 H 4、N R 1 1 2、N R 2 C 1、N R 2 C 2、N R 2 E 1、N R 2 E 3、N R 2 F 1、N R 2 F 2、N R 3 C 1、N R 3 C 2、N R 4 A 1、N R 4 A 2、N R 5 A 1、N R 5 A 2、N R 6  $\mu$  1、P G R、R A R B、F G F 1、F G F 2、F G F 6、K L K 3、K R T 1、A P O C 1、B R C A 1、C H G A、C H G B、C L U、C O L 1 A 1、C O L 6 A 1、E G F、E R B B 2、E R K 8、F G F 1、F G F 1 0、F G F



O B O 4、C D 8 0、C D 2 2、C D 4 0、C D 2 3、C D 2 8、C D 8 0、C D 5 5、  
 C D 3 8、C D 7 0、C D 7 4、C D 3 0、C D 1 3 8、C D 5 6、C D 3 3、C D 2、  
 C D 1 3 7、D R 4、D R 5、R A N K L、V E G F R 2、P D G F R、V E G F R 1、  
 M T S P 1、M S P、E P H B 2、E P H A 1、E P H A 2、E p C A M、P G E 2、N  
 K G 2 D、L P A、S I P、A P R I L、B C M A、M A P G、F L T 3、P D G F R  
 a l p h a、P D G F R b e t a、R O R 1、P S M A、P S C A、S C D 1、及びC  
 D 5 9 からなる群から選択されるものが挙げられる。本発明の二重特異性抗体又は三重特  
 異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製すること  
 ができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による  
 多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

10

## 【 0 1 4 0 】

モノクローナル抗体療法は、自己免疫性疾患及び炎症性疾患の治療にとって、重要な治療  
 モダリティとなっている (Chan & Carter, 2010, Nature Reviews Immunology  
 10:301-316; Reichert et al., 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1073-10  
 78、参照により本明細書に明示的に援用される)。多くのタンパク質が、一般的な自己  
 免疫応答及び炎症性応答に関与しており、ゆえに、本発明のイムノグロブリンの標的とな  
 りうる。自己免疫及び炎症の標的としては、限定されないが、C 5、C C L 1 ( I - 3 0  
 9)、C C L 1 1 (エオタキシン)、C C L 1 3 (m c p - 4)、C C L 1 5 (M I P -  
 1 d)、C C L 1 6 (H C C - 4)、C C L 1 7 (T A R C)、C C L 1 8 (P A R C)  
 、C C L 1 9、C C L 2 (m c p - 1)、C C L 2 0 (M I P - 3 a)、C C L 2 1 (M  
 I P - 2)、C C L 2 3 (M P I F - 1)、C C L 2 4 (M P I F - 2 / エオタキシン -  
 2)、C C L 2 5 (T E C K)、C C L 2 6、C C L 3 (M I P - 1 a)、C C L 4 (M  
 I P - 1 b)、C C L 5 (R A N T E S)、C C L 7 (m c p - 3)、C C L 8 (m c p  
 - 2)、C X C L 1、C X C L 1 0 (I P - 1 0)、C X C L 1 1 (1 - T A C / I P -  
 9)、C X C L 1 2 (S D F 1)、C X C L 1 3、C X C L 1 4、C X C L 2、C X C L  
 3、C X C L 5 (E N A - 7 8 / L I X)、C X C L 6 (G C P - 2)、C X C L 9、I  
 L 1 3、I L 8、C C L 1 3 (m c p - 4)、C C R 1、C C R 2、C C R 3、C C R 4  
 、C C R 5、C C R 6、C C R 7、C C R 8、C C R 9、C X 3 C R 1、I L 8 R A、X  
 C R 1 (C C X C R 1)、I F N A 2、I L 1 0、I L 1 3、I L 1 7 C、I L 1 A、I  
 L 1 B、I L 1 F 1 0、I L 1 F 5、I L 1 F 6、I L 1 F 7、I L 1 F 8、I L 1 F 9  
 、I L 2 2、I L 5、I L 8、I L 9、L T A、L T B、M I F、S C Y E 1 (内皮単球  
 活性化サイトカイン)、S P P 1、T N F、T N F S F 5、I F N A 2、I L 1 0 R A、  
 I L 1 0 R B、I L 1 3、I L 1 3 R A 1、I L 5 R A、I L 9、I L 9 R、A B C F 1  
 、B C L 6、C 3、C 4 A、C E B P B、C R P、I C E B E R G、I L 1 R 1、I L 1  
 R N、I L 8 R B、L T B 4 R、T O L L I P、F A D D、I R A K 1、I R A K 2、M  
 Y D 8 8、N C K 2、T N F A I P 3、T R A D D、T R A F 1、T R A F 2、T R A F  
 3、T R A F 4、T R A F 5、T R A F 6、A C V R 1、A C V R 1 B、A C V R 2、A  
 C V R 2 B、A C V R L 1、C D 2 8、C D 3 E、C D 3 G、C D 3 Z、C D 6 9、C D  
 8 0、C D 8 6、C N R 1、C T L A 4、C Y S L T R 1、F C E R 1 A、F C E R 2、  
 F C G R 3 A、G P R 4 4、H A V C R 2、O P R D 1、P 2 R X 7、T L R 2、T L R  
 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、B L  
 R 1、C C L 1、C C L 2、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 7、C C L 8、C C  
 L 1 1、C C L 1 3、C C L 1 5、C C L 1 6、C C L 1 7、C C L 1 8、C C L 1 9、  
 C C L 2 0、C C L 2 1、C C L 2 2、C C L 2 3、C C L 2 4、C C L 2 5、C C R 1  
 、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 5、C C R 6、C C R 7、C C R 8、C C R 9  
 、C X 3 C L 1、C X 3 C R 1、C X C L 1、C X C L 2、C X C L 3、C X C L 5、C  
 X C L 6、C X C L 1 0、C X C L 1 1、C X C L 1 2、C X C L 1 3、C X C R 4、G  
 P R 2、S C Y E 1、S D F 2、X C L 1、X C L 2、X C R 1、A M H、A M H R 2、  
 B M P R 1 A、B M P R 1 B、B M P R 2、C 1 9 o r f 1 0 (I L 2 7 w)、C E R 1  
 、C S F 1、C S F 2、C S F 3、D K F Z p 4 5 1 J 0 1 1 8、F G F 2、G F I 1、

20

30

40

50

IFNA1、IFNB1、IFNG、IGF1、IL1A、IL1B、IL1R1、IL1R2、IL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL4、IL4R、IL5、IL5RA、IL6、IL6R、IL6ST、IL7、IL8、IL8RA、IL8RB、IL9、IL9R、IL10、IL10RA、IL10RB、IL11、IL12RA、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA1、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17R、IL18、IL18R1、IL19、IL20、KITLG、LEP、LTA、LTB、LTB4R、LTB4R2、LTBR、MIF、NPPB、PDGFB、TBX21、TDGF1、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2、及びRNF110(ZNF144)が挙げられる。本発明の二重特異性抗体又は三重特異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

【0141】

自己免疫性疾患及び炎症性疾患の共標的の例としては、限定されないが、IL-1及びTNFalpha、IL-6及びTNFalpha、IL-6及びIL-1、IGE及びIL-13、IL-1及びIL-13、IL-4及びIL-13、IL-5及びIL-13、IL-9及びIL-13、CD19及びFcRIIb、及びCD79及びFcRIIbが挙げられる。

【0142】

炎症性疾患の治療のための以下の標的に対する特異性を有する、本発明のイムノグロブリンが予期される：TNF及びIL-17A；TNF及びRANKL；TNF及びVEGF；TNF及びSOST；TNF及びDKK；TNF及びV3；TNF及びNGF；TNF及びIL-23p19；TNF及びIL-6；TNF及びSOST；TNF及びIL-6R；TNF及びCD-20；IGE及びIL-13；IL-13及びIL23p19；IGE及びIL-4；IGE及びIL-9；IGE及びIL-9；IGE及びIL-13；IL-13及びIL-9；IL-13及びIL-4；IL-13及びIL-9；IL-13及びIL-9；IL-13及びIL-4；IL-13及びIL-23p19；IL-13及びIL-9；IL-6R及びVEGF；IL-6R及びIL-17A；IL-6R及びRANKL；IL-17A及びIL-1；IL-1及びRANKL；IL-1及びVEGF；RANKL及びCD-20；IL-1及びIL-1；IL-1及びIL-1。

【0143】

本明細書に開示されるイムノグロブリンが結合することができ、及び喘息治療に有用でありうる標的の対は、決定されてもよい。1つの実施態様において、そのような標的としては、限定されないが、IL-13及びIL-1が挙げられる(IL-1は、喘息の炎症性応答に關与しているため)；IL-13並びに、炎症に關与するサイトカイン及びケモカイン(例えば、IL-13及びIL-9；IL-13及びIL-4；IL-13及びIL-5；IL-13及びIL-25；IL-13及びTARC；IL-13及びMDC；IL-13及びMIF；IL-13及びTGF-；IL-13及びLHRアゴニスト；IL-13及びCL25；IL-13及びSPRR2a；IL-13及びSPRR2b；並びに、IL-13及びADAM8)。本明細書のイムノグロブリンは、CSF1(MCSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、ヒスタミン及びヒスタミン受容体、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、KITLG、PDGFB、IL2RA、IL4R、IL5RA、IL8RA

、 I L 8 R B、 I L 1 2 R B 1、 I L 1 2 R B 2、 I L 1 3 R A 1、 I L 1 3 R A 2、 I L 1 8 R 1、 T S L P、 C C L i、 C C L 2、 C C L 3、 C C L 4、 C C L 5、 C C L 7、 C C L 8、 C C L 1 3、 C C L 1 7、 C C L 1 8、 C C L 1 9、 C C L 2 0、 C C L 2 2、 C C L 2 4、 C X 3 C L 1、 C X C L 1、 C X C L 2、 C X C L 3、 X C L i、 C C R 2、 C C R 3、 C C R 4、 C C R 5、 C C R 6、 C C R 7、 C C R 8、 C X 3 C R 1、 G P R 2、 X C R 1、 F O S、 G A T A 3、 J A K 1、 J A K 3、 S T A T 6、 T B X 2 1、 T G F B 1、 T N F、 T N F S F 6、 Y Y 1、 C Y S L T R 1、 F C E R 1 A、 F C E R 2、 L T B 4 R、 T B 4 R 2、 L T B R、 及びキチナーゼからなる群から選択される、喘息に關与する標的の1以上に対する特異性を有してもよい。本発明の二重特異性抗体又は三重特異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

10

## 【0144】

リウマチ性関節炎（RA）に關与する標的対が、本発明により共捕捉されてもよく、限定されないが、TNF及びIL-18；TNF及びIL-12；TNF及びIL-23；TNF及びIL-1beta；TNF及びMIF；TNF及びIL-17；並びに、TNF及びIL-15が挙げられる。

## 【0145】

本明細書のイムノグロブリンによって全身性エリテマトーデスを治療するために標的となりうる抗原は、限定されないが、CD-20、CD-22、CD-19、CD28、CD4、CD80、HLA-DRA、IL10、IL2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INHA、INHBA、KLF6、TNFRSF7、CD28、CD38、CD69、CD80、CD83、CD86、DPP4、FCER2、IL2RA、TNFRSF8、TNFSF7、CD24、CD37、CD40、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CR2、ILIR2、ITGA2、ITGA3、MS4A1、ST6GALI、CDIC、CHSTIO、HLA-A、HLA-DRA、及びNT5E；CTLA4、B7.1、B7.2、BlyS、BAFF、C5、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-、及びTNF-が挙げられる。本発明の二重特異性抗体又は三重特異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

20

30

## 【0146】

本明細書のイムノグロブリンは、多発性硬化症（MS）の治療のための抗原を標的としてもよく、限定されないが、IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFNgamma、GM-CSF、FGF、C5、CD52、及びCCR2が挙げられる。実施態様には、MSの治療のための、抗IL-12及びTWEAKの共捕捉が含まれる。

40

## 【0147】

本発明の1つの態様は、敗血症に關与する標的の1つ以上に結合することができるイムノグロブリンに関するものであり、1つの実施態様においては、2つの標的であり、TNF、IL-1、MIF、IL-6、IL-8、IL-18、IL-12、IL-23、FasL、LPS、Toll様受容体、TLR-4、組織因子、MIP-2、ADORA2A、CASP1、CASP4、IL-10、IL-1B、NF-B1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、CCR3、ILIRN、MIF、NF-B1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、midkine、IRAK1、NF-B2、S

50

ERPINA 1、SERPINE 1、及び TREM 1 からなる群から選択される。本発明の二重特異性抗体又は三重特異性抗体を形成するために、これら抗原の任意の組み合わせに対する抗体を作製することができる；すなわち、これら抗原の各々は、任意選択的に、及び独立して、本発明による多重特異性抗体から排除、又は含有されてもよい。

【0148】

一部の例において、本明細書のイムノグロブリンは、感染性疾患の治療のための抗原を目的としてもよい。

【0149】

#### 抗原結合ドメイン

当業者に認識されているように、抗原結合ドメインには2つの基本的なタイプがあり、抗体の抗原結合ドメインと似たもの（例えば、6つのCDRのセットを含有する）、及びリガンド又は受容体であるもの（例えば、CDRを用いることなく標的に結合する）がある。

【0150】

#### 改変抗体

上述の修飾に加え、他の修飾を施してもよい。例えば、VHとVLドメインを連結するジスルフィド結合の組み込みにより分子を安定化させてもよい（Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245、参照により本明細書に全体で援用される）。さらに、以下に概要されるように、様々な共有結合修飾を抗体に施すことができる。

【0151】

抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲に含まれ、及び通常は（常にではない）、翻訳後に行われるものである。例えば、抗体の特定のアミノ酸残基と、有機誘導体化剤（選択された側鎖、又はN末端残基もしくはC末端残基と反応させることができる）とを反応させることにより、分子内にいくつかのタイプの抗体の共有結合修飾が導入される。

【0152】

システニル残基は、最も普遍的な、例えばクロロ酢酸又はクロロアセトアミド等のハロアセテート（及び相当するアミン）と反応する残基であり、カルボキシメチル誘導体又はカルボキシアミドメチル誘導体を生成する。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 $\alpha$ -プロモ- $\beta$ （5-イミドゾイル）プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロ安息香酸水銀、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール、又はクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール等との反応により誘導体化されてもよい。

【0153】

さらに、システインでの修飾は、抗体-薬剤結合物（ADC）応用において特に有用である（以下に詳述）。一部の実施態様において、抗体の定常領域は、特定の「チオール反応性」である1以上のシステインを含有するように操作することができ、それにより、薬剤部分の配置がより特異的及び制御可能となる。例えば、米国特許第7,521,541号（本明細書に参照によりその全体で援用される）を参照のこと。

【0154】

ヒスチジル残基は、pH 5.5~7.0での、ジエチルピロカーボネートとの反応により誘導体化される（この剤は、ヒスチジル側鎖に対し比較的特異性であるため）。パラプロモフェナシルプロミドもまた、有用である；反応は、pH 6.0で、0.1Mのカコジル酸ナトリウム中で行われるのが好ましい。

【0155】

リシニル残基及びアミノ末端残基は、コハク酸又は他の無水カルボン酸と反応する。これらの試薬による誘導体化は、リシン残基の電荷を戻すのに有効である。 $\alpha$ -アミノ含有残基の誘導体化に適切な他の試薬としては、例えば、メチルピコリンイミデート等のイミドエステル；リン酸ピリドキサール；ピリドキサール；クロロほう化水素；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソウレア；2,4-ペンタンジオン；及びグリオキシル酸

10

20

30

40

50

とのトランスアミナーゼ触媒反応が挙げられる。

【0156】

アルギニル残基は、1又は数種の標準的な試薬、とりわけ、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、及びニンヒドリンとの反応により修飾される。アルギニン残基の誘導体化には、グアニジン官能基の高いpKaのために、その反応がアルカリ条件下で行われる必要がある。さらに、これら試薬は、リシン基、並びにアルギニンイプシロン-アミノ基と反応しうる。

【0157】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム又はテトラニトロメタンとの反応により、チロシル残基へとスペクトル標識を導入することに特に関心を持ちながら、行われてもよい。最も普遍的には、N-アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンを用いて、それぞれ、O-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体が形成される。チロシル残基は、125I又は131Iを用いてヨウ素化され、放射性免疫アッセイにおける使用のための標識タンパク質が調製される(上述のクロルアミンT法が適切である)。

10

【0158】

カルボキシル側鎖(アスパルチル又はグルタミル)は、カルボジイミド( $R'-N=C=N-R'$ )との反応により選択的に修飾され、ここで、R及びR'は、任意選択的に、アルキル基(例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミド、又は1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミド等)と異なっている。さらに、アスパルチル残基及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応により、アスパラギニル残基及びグルタミニル残基へと転換される。

20

【0159】

二機能性剤の誘導体化は、以下に記述される方法に加え、様々な方法における使用のための、抗体の水不溶性支持体マトリクス又は表面への架橋に有用である。普遍的に用いられる架橋剤としては、例えば、1-bis(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(例えば、4-アジドサリチル酸を伴うエステル)、同種二機能性イミドエステル(ジスクシンイミジルエステル(例えば、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等)が挙げられる)、及び二機能性マレイミド(例えば、bis-N-マレイミド-1,8-オクタン、が挙げられる。例えば、メチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート等の誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化中間体を産生する。あるいは、反応性の水-不溶性のマトリクス(例えば、シノモルグソゲン(cynomologusen)プロミド活性化炭水化物)及び反応性基質(米国特許第3,969,287号;第3,691,016号;第4,195,128号;第4,247,642号;第4,229,537号;及び第4,330,440号に記述される。すべて参照により全体で援用される)が、タンパク質の固定に用いられる。

30

【0160】

グルタミニル残基及びアスパラギニル残基は多くの場合、それぞれ対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基へと脱アミド化される。あるいは、これら残基は、弱酸性の条件下で脱アミド化される。これら残基のいずれの形式も、本発明の範囲内にある。

40

【0161】

他の修飾としては、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル残基又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]、参照により全体で援用される)、N末端アミンのアセチル化及びC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0162】

さらに、当業者に認識されているように、標識(蛍光、酵素、磁性、放射性標識等を含む

50

)はすべて、抗体(並びに、本発明の他の組成物)に付加されてもよい。

【0163】

グリコシル化

他のタイプの共有結合修飾は、グリコシル化における改変である。他の実施態様において、本明細書に開示される抗体は、1以上の操作された糖型を含有するよう修飾されてもよい。本明細書において、「操作された糖型」とは、抗体に共有結合された糖質組成物を意味し、ここで、前記糖質組成物は、元の抗体から化学的に異なっている。操作された糖型は、様々な目的に対し有用であり得、その目的としては、限定されないが、エフェクター機能の増強又は減少が挙げられる。操作された糖型のこのましい形態は、脱フコシル化であり、脱フコシル化は、ADC機能の増加に相関していることが示されており、FcRIIIa受容体に対するより強い結合を介すると推測されている。この文脈において、「脱フコシル化」とは、宿主細胞中で産生された抗体の大部分が、実質的にフコースを欠いていることを意味し、産生された抗体の90~95~98%が、抗体の糖質部分(通常、Fc領域のN297に付着している)の成分として、検知可能な量のフコースを有していない。既定の機能上、脱フコシル化された抗体は、通常、FcRIIIaに対し、少なくとも50%がそれ以上のアフィニティを示す。

10

【0164】

操作された糖型は、当分野公知の様々な方法により生成されてもよい(Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinokawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6,602,684; US SN 10/277,370; US SN 10/113,929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/29246 A1; PCT WO 02/31140 A1; PCT WO 02/30954 A1。すべて参照により全体で援用される);(ポテリジェント(登録商標)技術[Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMab(登録商標)グリコシル化操作技術[Glycart Biotechnology AG, Zurich, Switzerland])。これら技術の多くが、例えば、操作された、様々な生物体又は細胞株におけるIgGの発現による(例えば、Lecl-13CHO細胞又はラットハイブリドーマYB2/0細胞)、又はグリコシル化経路に関与する酵素を制御することによる(例えば、FUT8[1,6-フコシルトランスフェラーゼ]及び/又は1-4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII[GnIII])、又はIgGが発現された後に糖質(複数含む)を修飾することによる、Fc領域に共有結合されたオリゴ糖のフコシル化及び/又は二等分化のレベルの制御に基づいている。例えば、「糖操作抗体」又は製造の間のフコシル化を阻害する、修飾単糖を付加することによる、Seattle Genetics機能の「SEA技術」(例えば、20090317869を参照のこと(参照により、その全体で本明細書に援用される))。操作された糖型とは、通常、普通ではない糖質又はオリゴ糖を指し、ゆえに、抗体は、操作された糖型を含有してもよい。

20

30

【0165】

あるいは、操作された糖型とは、普通ではない糖質又はオリゴ糖を含有するIgG変異体を指してもよい。当分野に公知のように、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列(例えば、以下に検討される特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在の有無)、又はタンパク質が産生される宿主細胞もしくは生物体の両方に依っている。特定の発現システムを、以下に検討する。

40

【0166】

ポリペプチドのグリコシル化は通常、N結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖に糖質部分が付着することを指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニン(ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への糖質部分の酵素付着に対する認識配列である。ゆえに、ポリペプチド中のこれらトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が創出される。O結合型グリコシル化とは、糖類であ

50

る N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの 1 つが、ヒドロキシアミノ酸（最も普遍的なのはセリン又はスレオニンだが、5 - ヒドロキシプロリン又は 5 - ヒドロキシセリンもまた用いてもよい）に付着することを指す。

【0167】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、上述のトリペプチド配列のうちの 1 以上を含有するよう、アミノ酸配列を改変することにより簡便に行うことができる（N - 結合型グリコシル化部位に対しては）。改変はまた、開始配列に、1 以上のセリン又はスレオニン残基を付加、又は置換することにより行ってもよい（O - 結合型グリコシル化部位に対しては）。簡便にするために、抗体のアミノ酸配列は、所望のアミノ酸へと翻訳されるコドンが作製されるよう、DNA レベルでの変更を介して改変することが好ましく、特に、標的ポリペプチドをコードする DNA にあらかじめ選択された塩基で、変異誘導を行うことにより、改変することが好ましい。

10

【0168】

抗体上の糖質部分の数を増加させる他の手段は、タンパク質にグリコシドを酵素的にカップリング、又は化学的にカップリングする方法である。これらの手順は、N 結合型グリコシル化及び O 結合型グリコシル化に対するグリコシル化の能力を有する宿主細胞中でのタンパク質の酸性が必要とされない場合において、有利である。用いるカップリングの様式に基づいて、糖類（複数含む）は、（a）アルギニン及びヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離スルフヒドリル基（例えば、システインのもの）、（d）遊離ヒドロキシル基（例えば、セリン、スレオニン、又はヒドロキシプロリンのもの）、（e）芳香族残基（例えば、フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンのもの）、又は（f）グルタミンのアミド基、に付着されてもよい。これらの方法は、WO 87 / 05330、及び Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 に記述されている（両方とも参照により全体で援用される）。

20

【0169】

開始抗体上に存在する糖部分の除去（例えば、翻訳後に）は、化学的又は酵素的に行われてもよい。化学的な脱グリコシル化には、タンパク質が、トリフルオロメタンスルホン酸化合物又は均等な化合物に曝露される必要がある。この処置により、結合糖（N - アセチルガラクトサミン又は N - アセチルガラクトサミン）以外のほとんどの糖、又は全ての糖が切断される一方、ポリペプチドは生のままに保たれる。化学的な脱グリコシル化は、Ha kimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52、及び Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131 に記述されている（両方とも参照により全体で援用される）。ポリペプチド上の糖部分の酵素開裂は、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼを使用することにより行うことができる（Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350 に記述される。参照により全体で援用される）。潜在的なグリコシル化部位でのグリコシル化は、ツニカマイシン化合物の使用により阻害されうる（Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105 に記述される。参照により全体で援用される）。ツニカマイシンは、タンパク質 - N - グリコシド結合の形成を阻害する。

30

【0170】

他のタイプの抗体の共有結合修飾には、抗体を、例えば、2005 - 2006 PEG カタログ（Nektar Therapeutics）（Nektar のウェブサイトから入手可能）、米国特許第 4,640,835 号；第 4,496,689 号；第 4,301,144 号；第 4,670,417 号；第 4,791,192 号、又は第 4,179,337 号（すべて、参照により全体で援用される）に記述される方法で、様々な非タンパク質性のポリマー（限定されないが、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール又はポリオキシアルキレン等の様々なポリオールが挙げられる）に結合することが含まれる。さらに、当分野で公知であるように、抗体内の様々な位置でアミノ酸置換を行い、例えば PEG 等のポリマーの付加を容易にしてもよい。例えば、米国特許公開 2005 / 0114037 A 1 を参照のこと（参照により全体で援用される）。

40

50

## 【0171】

機能性追加のための追加のFc変異

pIアミノ酸変異に加え、様々な理由のために行うことができる、多くの有用なFcアミノ酸修飾が存在する（限定されないが、1以上のFc R受容体への結合の改変、FcRn受容体への結合の改変等）。

## 【0172】

したがって、本発明のタンパク質は、pI変異及び立体構造変異を含む、本明細書に概要されるヘテロ二量体化変異を含むアミノ酸修飾を含有することができる。変異の各セットは、独立して、及び任意選択的に、任意の特定のヘテロ二量体タンパク質に含有又は除外されることができる。

## 【0173】

Fc R変異

したがって、1以上のFc R受容体に対する結合を改変するために行うことができる、有用なFc置換が数多く存在する。結合の増加、並びに結合の低下をもたらす置換が、有用でありうる。例えば、FcRIIIaに対する結合の増加は、通常、ADCCの増加（抗体依存性細胞介在性細胞毒性；細胞が介在する反応であり、Fc Rを発現する非特異的細胞毒性細胞が、標的細胞上に結合された抗体を認識し、次いで、標的細胞の溶解をもたらす）をもたらす。同様に、FcRIIIb（阻害性受容体）に対する結合の低下は、一部の環境下において同様に有益でありうる。本発明における用途が見出されるアミノ酸置換としては、USN11/124, 620（特に、図41）、11/174, 287、11/396, 495、11/538, 406（それらすべて、特に、その中に開示されている変異に対して、参照により明示的に全体で援用される）にリストアップされているものが挙げられる。用途が見出される特定の変異としては、限定されないが、236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D、332E/330L、243A、243L、264A、264V及び299Tが挙げられる。

## 【0174】

さらに、これらは、FcRn受容体に対する結合の増加、及び結成は安源基の延長に用途が見出される追加のFc置換であってもよく（USN12/341, 769に具体的に開示される。参照によりその全体で本明細書に援用される）、434S、434A、428L、308F、259I、428L/434S、259I/308F、436I/428L、436I又はV/434S、436V/428L、及び259I/308F/428L限定されないが、が挙げられる。

## 【0175】

リンカー

本発明は、任意選択的に、例えばさらなる抗原結合部位を追加する場合において、必要に応じてリンカーを備えるものであり、例えば図2に示されるものがあり、ここで、分子の「他の末端」は、追加の抗原結合成分を含有している。さらに、以下に概要されるように、リンカーは、任意選択的に、抗体薬剤結合物（ADC）システムにおいても用いられる。中心mAb-Fv構築物の成分の連結に用いられる場合、リンカーは通常、ペプチド結合により連結される2以上のアミノ酸残基を含有するポリペプチドであり、本発明の1以上の成分を連結するために用いられる。そのようなリンカーポリペプチドは当分野に公知である（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照のこと）。様々なリンカーが、本明細書の一部の実施態様における用途が見出される。当業者に認識されているように、本発明において、少なくとも3つの異なるリンカーのタイプが存在する。

## 【0176】

本明細書において、「リンカー」とは、「リンカー配列」、「スペーサー」、「テザリン

10

20

30

40

50

グ配列」、又はそれらの文法的均等物のことを指す。同種、又はヘテロ二機能性リンカーも当分野に公知である（1994 Pierce Chemical Company のカタログの、架橋剤に関する技術セクション、155 - 200 ページを参照のこと。参照により全体で援用される）。多くの戦略を用いて、分子を共有結合させてもよい。これらとしては、限定されないが、タンパク質又はタンパク質ドメインの N 末端及び C 末端間のポリペプチド結合、ジスルフィド結合を介した結合、及び化学的架橋剤を介した結合が挙げられる。本実施態様の 1 つの態様において、リンカーは、組み換え技術又はペプチド合成により作製されたペプチド結合である。リンカーペプチドは、主に、以下のアミノ酸残基を含有してもよい：Gly、Ser、Ala、又は Thr。リンカーペプチドは、所望の活性が保持されるよう、お互いに対して正しい構造をとるようなやり方で、2 つの分子を連結させるために適切な長さを有していなければならない。1 つの実施態様において、リンカーは、約 1 ~ 50 アミノ酸の長さ、好ましくは約 1 ~ 30 アミノ酸の長さである。1 つの実施態様において、1 ~ 20 のアミノ酸の長さのリンカーが用いられてもよい。有用なリンカーとしては、グリシン - セリンのポリマー（例えば、(GS)<sub>n</sub>、(SGGS)<sub>n</sub>、(GGGS)<sub>n</sub>、及び (GGS)<sub>n</sub> が挙げられ、ここで、n は、少なくとも 1 つの整数である）、グリシン - アラニンのポリマー、アラニン - セリンのポリマー、及び他の可塑性のリンカーが挙げられる。あるいは、様々な非タンパク質性のポリマー（限定されないが、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーが挙げられる）がリンカーとしての用途が見出される。

10

20

#### 【0177】

他のリンカー配列としては、任意の長さの CL/CH1 ドメイン（全残基の CL/CH1 を除く）の任意の配列が挙げられ；例えば、CL/CH1 ドメインの最初の 5 ~ 12 のアミノ酸残基が挙げられる。リンカーは、イムノグロブリン軽鎖（例えば、C<sub>1</sub> 又は C<sub>2</sub>）由来であってもよい。リンカーは、任意のアイソタイプ（例えば、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、及び C<sub>μ</sub> が挙げられる）のイムノグロブリン重鎖由来であってもよい。リンカー配列はまた、例えば Ig 様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR 等）、ヒンジ領域由来配列、及び他のタンパク質の天然配列等の他のタンパク質由来であってもよい。

#### 【0178】

##### 抗体 - 薬剤結合物

一部の実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、薬剤と結合され、抗体 - 薬剤結合物 (ADC) を形成する。概して、ADC は、癌応用に用いられており、抗体 - 薬剤結合物を、細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤の局所送達のために用いることにより、薬剤部分を腫瘍へ標的化送達することが可能になり、それによって、毒性は低く、高い有効性等が得られる。この技術の概要は、Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carter et al., Cancer J. 14(3):154 (2008) 及び Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009) に開示されている（それらすべて、本明細書に参照によりその全体で援用される）。

30

#### 【0179】

ゆえに、本発明により、薬剤に結合された多重特異性抗体が開示される。一般的に、結合は、以下に詳述するように抗体への共有結合によってなされ、及び通常、リンカー（多くの場合、ペプチドリンカー）に依っている（以下に記述されるように、標的部位で、プロテアーゼによる開裂に感受性であるよう、又は感受性ではないように設計される）。さらに、上述のように、リンカー - 薬剤ユニット (LU-D) の連結は、抗体内のシステインへの付加により行われてもよい。当業者に認識されているように、抗体当たりの薬剤の数は、反応条件により変更されてもよく、及び 1 : 1 ~ 10 : 1 の薬剤 : 抗体の割合で変化してもよい。当業者に認識されているように、実数は平均である。

40

#### 【0180】

ゆえに、本発明により、薬剤に結合された多重特異性抗体が開示される。以下に記述され

50

るように、ADCの薬剤は、任意の数の剤であってもよく、限定されないが、細胞毒性剤（例えば、化学療法剤、増殖抑制剤、毒素（例えば、酵素的に活性となる細菌毒素、真菌毒素、植物毒、もしくは動物起源の毒、又はそれらの断片等）又は放射性同位体（すなわち、放射性結合物）等）が挙げられる。他の実施態様において、本発明により、ADCを用いる方法が皿に開示される。

#### 【0181】

本発明における使用のための薬剤としては、細胞毒性剤、特に、癌治療に用いられるものが挙げられる。そのような薬剤としては、通常、DNA傷害剤、抗代謝剤、天然物質、及びそのアナログが挙げられる。細胞毒性剤の例示的な種類としては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤及びチミジル酸合成酵素阻害剤等の酵素阻害剤、DNAインターカレーター、DNA開裂剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリン薬剤ファミリー、ビンカ剤、ミトマイシン、プレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、プテリジン薬剤ファミリー、ジイネン (diynenes)、ポドフィロトキシン、ドラスタチン、マイタンシノイド、分化誘導剤及びタキソールが挙げられる。

10

#### 【0182】

これらの分類の薬剤としては、例えば、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、ロイロシン、ロイロシジン (leurosidine)、アクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ミトマイシンC、ミトマイシンA、カミノマイシン、アミノプテリン、タリソマイシン (tallosomycin)、ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体（例えば、エトポシド又はリン酸エトポシド）、ビンブラスチン、ピンクラスチン、ビンデシン、タキサン、（タキソールを含む）、タキソテレチノイン酸、酪酸、N8-アセチルスペルミジン、カンプトテシン、カリケアミシン、エスペラミシン、エンジン、ズオカルミシンA、ズオカルミシンSA、カリケアミシン、カンプトテシン、マイタンシノイド (DM1を含む)、モノメチルオーリスタチンE (MMAE)、モノメチルオーリスタチンF (MMAF)、及びマイタンシノイド (DM4) 並びにそれらのアナログが挙げられる。

20

#### 【0183】

毒素を、抗体-毒素結合物として用いてもよく、例えばジフテリア毒素等の細菌毒素、例えばリシン等の植物毒、例えばゲルダナマイシン (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、マイタンシノイド (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアミシン (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342) 等の小分子毒素が挙げられる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、又はトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムにより、その細胞毒性効果及び細胞増殖抑制効果を発揮する。

30

#### 【0184】

多重特異性抗体と、1以上の小分子毒素（例えば、マイタンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、トリコテセン、カリケアミシン、及びCC1065並びに、毒素活性を有するこれら毒素の誘導体等）の結合物が予期される。

40

#### 【0185】

##### マイタンシノイド

マイタンシノイド薬剤部分としての使用に適したマイタンシン化合物は、当分野に公知であり、公知の方法に従い、天然物質から単離することができ、遺伝子操作技術を用いて製造することができ (Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973を参照のこと)、又はマイタンシノール及びマイタンシノールアナログは、公知の方法に従い合成的に調製することができる。以下に記述されるように、薬剤は、例えばチオール又はアミン基等の、抗体の結合に対し機能的に活性な基を組み込むことにより、修飾されてもよい。

50

## 【0186】

例示的なマイタンシノイド薬剤部分の例としては、例えば、C-19-デクロロ（米国特許第4,256,746号）（アンサマイトシンP2の水素化アルミニウムリチウム還元により調製される）；C-20-ヒドロキシ（又はC-20-デメチル）+/-C-19-デクロロ（米国特許第4,361,650号及び第4,307,016号）（ストレプトマイセス又は垂口のマイセスを用いた脱メチル化、又はLAHを用いた脱塩素により調製される）；及びC-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ（-OCOR）、+/-デクロロ（米国特許第4,294,757号）（アシルクロリドを用いたアシル化により調製される）等の修飾芳香族環を有するもの、及び他の位置で修飾を有するもの、が挙げられる。

10

## 【0187】

マイタンシノイド薬剤部分の例としてはまた、例えば、C-9-SH（米国特許第4,424,219号）（H<sub>2</sub>S又はP<sub>2</sub>S<sub>5</sub>を用いたマイタンシノールの反応により調製される）；C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/CH<sub>2</sub>OR）（米国特許第4,331,598号）；C-14-ヒドロキシメチル又はアシルオキシメチル（CH<sub>2</sub>OH又はCH<sub>2</sub>OAc）（米国特許第4,450,254号）（ノカルジアから調製される）；C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ（米国特許第4,364,866号）（ストレプトマイセスによるマイタンシノールの転換により調製される）；C-15-メトキシ（米国特許第4,313,946号及び第4,315,929号）（Trewiana nudifloraから単離される）；C-18-N-デメチル（米国特許第4,362,663号及び第4,322,348号）（ストレプトマイセスによるマイタンシノールの脱メチル化により調製される）；及び4,5-デオキシ（米国特許第4,371,533号）（チタニウムトリクロリド/マイタンシノールのLAH還元により調製される）等の修飾を有する者が挙げられる。

20

## 【0188】

DM1（米国特許第5,208,020号に開示される。参照により援用される）及びDM4（米国特許第7,276,497号に開示される。参照により援用される）が特に使用される。また、5,416,064、WO/01/24763、7,303,749、7,601,354、USSN 12/631,508、WO02/098883、6,441,163、7,368,565、WO02/16368及びWO04/1033272（それらすべて、参照によりその全体において明示的に援用される）の多くのさらなるマイタンシノイド誘導体及び方法を参照のこと。

30

## 【0189】

マイタンシノイドを含有するADC、それを作製する方法、及びその治療用途は、例えば、米国特許第5,208,020号；第5,416,064号；第6,441,163号及び欧州特許第0425235B1号に開示されている（それら開示は、参照により明示的に本明細書に援用される）。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)において、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に連結された、DM1と指定されるマイタンシノイドを含有するADCが記述されている。結合物は、培養結腸癌細胞に対し、高い細胞毒性があることが判明しており、in vivo腫瘍増殖アッセイにおいて、抗腫瘍活性を示した。

40

## 【0190】

Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)において、マイタンシノイドが、ヒト結腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neu癌遺伝子に結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に、ジスルフィド結合を介して結合されているADCが開示されている。TA.1マイタンシノイド結合物の細胞毒性は、ヒト乳癌細胞株SK-BR-3（3x10<sup>5</sup>のHER-2表面抗原/細胞を発現している）に対し、in vitroで検証された。薬剤結合物は、遊離マイタンシノイド薬物と同程度の細胞毒性を発揮し、抗体分子あたりのマイタンシノイド分子の数を増加させることにより、細胞毒性の程度も増加した。A7-マイタンシノイド結合物は、マウ

50

スにおいて、全身性の細胞毒性が低かった。

【0191】

#### オーリスタチン及びドラスタチン

一部の実施態様において、ADCは、ドラスタチン又はドラスタチンペプチドアナログ及び誘導体、オーリスタチン（米国特許第5,635,483号；第5,780,588号）に結合された多重特異性抗体を含有する。ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管の動態、GTP加水分解、並びに核及び細胞の分裂に干渉することが示されており（Wo yke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584）、抗癌活性（米国特許第5,663,149号）及び抗真菌活性（Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965）を有している。ドラスタチン又はオーリスタチン薬剤部分は、ペプチド薬剤部分のN（アミノ）末端又はC（カルボキシル）末端を介して抗体に付加されていてもよい（WO 02/088172）。

10

【0192】

例示的なオーリスタチンの実施態様としては、N末端結合モノメチルオーリスタチン薬剤部分DE及びDFが挙げられ、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623（2004年3月28日公開）に開示され、及び米国特許公開2005/0238648に記述されている（それら開示は、明示的にその全体で参照により援用される）。

【0193】

オーリスタチンの例示的な実施態様は、MMAEである（米国特許第6,884,869号を参照のこと。参照によりその全体で明示的に援用される）。

20

【0194】

オーリスタチンの他の例示的な実施態様は、MMAFである（US2005/0238649、5,767,237及び6,124,431を参照のこと。参照によりその全体で明示的に援用される）。

【0195】

MMAE又はMMAF及び様々なリンカー成分（本明細書に詳述される）を含むさらなる例示的な実施態様は、以下の構造及び略語を有している（Abは抗体を意味し、pは1～約8である）。

【0196】

典型的には、ペプチドを基にした薬剤部分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することにより調製されることができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において公知である液相合成法（E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照のこと）に従い、調製されてもよい。オーリスタチン/ドラスタチン薬剤部分は、米国特許第5,635,483号；米国特許第5,780,588号；Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725；Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及びDor onina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784の方法に従い調製されてもよい。

30

40

【0197】

#### カリケアミシン

他の実施態様において、ADCは、1以上のカリケアミシン分子に結合された本発明の抗体を含有する。例えば、My l o t a r gは、最初に市販されたADC薬物であり、カリケアミシン 1をペイロードとして使用している（米国特許第4,970,198号を参照のこと。その全体で参照により援用される）。さらなるカリケアミシン誘導体は、米国特許第5,264,586号、第5,384,412号、第5,550,246号、第5,739,116号、第5,773,001号、第5,767,285号、及び第5,877,296号に開示されている（すべて、参照により明示的に援用される）。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNAの破壊をもたらすことがで

50

きる。カリケアミシンファミリー結合物の調製については、米国特許第 5,712,374 号、第 5,714,586 号、第 5,739,116 号、第 5,767,285 号、第 5,770,701 号、第 5,770,710 号、第 5,773,001 号、第 5,877,296 号を参照のこと(すべて、American Cyanamid Company)。用いることができるカリケアミシンの構造アナログとしては、限定されないが、1 I、2 I、2 I、N-アセチル-1 I、PSAG 及び I 1 が挙げられる (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)、及び前述の American Cyanamid に対する米国特許)。抗体が結合することができる他の抗腫瘍薬剤は、抗葉酸剤の QFA である。カリケアミシン及び QFA の両方とも、細胞内に作用部位を有し、細胞膜を容易に透過しない。それゆえ、これらの剤を、抗体介在性の内在化により細胞内に取り込ませることにより、細胞毒性効果を大幅に増強させることができる。

10

【0198】

#### ズオカルミシン

CC-1065 (4,169,888 を参照のこと。参照により援用される) 及びズオカルミシンは、ADC に用いられる抗腫瘍抗生物質のファミリーの一つである。これら構成物質は、副溝のアデニンの N3 で、配列選択的に DNA をアルキル化することにより作用すると考えられており、アポトーシスをもたらすカスケード事象を開始させる。

【0199】

ズオカルミシンの重要なメンバーとしては、ズオカルミシン A (米国特許第 4,923,990 号、参照により援用される)、及びズオカルミシン SA (米国特許第 5,101,038 号。参照により援用される)、及び米国特許第 7,517,903 号、第 7,691,962 号、第 5,101,038 号、第 5,641,780 号、第 5,187,186 号、第 5,070,092 号、第 5,070,092 号、第 5,641,780 号、第 5,101,038 号、第 5,084,468 号、第 5,475,092 号、第 5,585,499 号、第 5,846,545 号、WO2007/089149、WO2009/017394A1、第 5,703,080 号、第 6,989,452 号、第 7,087,600 号、第 7,129,261 号、第 7,498,302 号、及び第 7,507,420 号(それらすべて、明示的に参照により援用される)に開示される多くのアナログが挙げられる。

20

30

【0200】

#### 他の細胞毒性剤

本発明の抗体に結合することができる他の抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾシン、ピンクリスチン、及び 5-フルオロウラシル、集合的に LL-E33288 複合体 (米国特許第 5,053,394 号、第 5,770,710 号に記述される) として知られる剤のファミリー、並びにエスペラミシン (米国特許第 5,877,296 号) が挙げられる。

【0201】

用いることができる酵素的に活性な毒素及びその断片としては、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素 A 鎖 (緑膿菌由来)、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、サルシン、Aleurites fordii タンパク質、dianthin タンパク質、Phytolacca americana タンパク質 (PAPI、PAPII、及び PAP-S)、momordica charantia 阻害物質、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis 阻害物質、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノミシン、エノミシン及びトリコテシンが挙げられる。例えば、WO93/21232 (1993 年 10 月公開) を参照のこと。

40

【0202】

本発明からさらに、抗体と、核酸分解活性を有する化合物 (例えば、リボヌクレアーゼ又は DNA エンドヌクレアーゼ (例えば、デオキシリボヌクレアーゼ; DNase)) の間に形成される ADC が予期される。

50

## 【0203】

腫瘍の選択的崩壊のために、抗体は、高い放射性原子を含有してもよい。様々な放射性同位体が、放射性結合抗体の製造に利用可能である。例としては、At 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、Bi 212、P 32、Pb 212及びLuの放射性同位体が挙げられる。

## 【0204】

放射性標識又は他の標識を、公知の方法で結合物に組み込んでよい。例えば、ペプチドは、例えば、水素の代わりにフッ素 - 19を含有する適切なアミノ酸前駆体を用いた化学アミノ酸合成により生合成又は合成されてもよい。例えば、Tc 99m又はI 123、Re 186、Re 188及びIn 111等の標識物を、ペプチドのシステイン残基を介して付加してもよい。イットリウム - 90を、リシン残基を介して付加してもよい。IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) を、ヨウ素 - 123を組み込むために用いることができる。" Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy " (Chatal, CRC Press 1989)は他の方法を詳細に開示している。

10

## 【0205】

複数の抗体を含有する組成物のために、薬剂量は、抗体ごとの薬剤分子の平均数である、薬剂量は、pによりあらわされる。1~20薬剤(D)/抗体の範囲であってもよい。結合物調製の反応における、抗体ごとの薬剤の平均数は、例えば質量分析、ELISAアッセイ、及びHPLC等の従来的な手段により特徴解析されてもよい。pを単位として、抗体 - 薬剤 - 結合物の量的分布が測定されてもよい。

20

## 【0206】

一部の例において同種抗体 - 薬剤 - 結合物の分離、精製、及び特徴解析 (pは、他の薬剤担持を伴う抗体 - 薬剤 - 結合物由来の所定の値である) は、例えば、逆相HPLC又は電気泳動等の手段により行われてもよい。例示的な実施態様において、pは、2、3、4、5、6、7又は8又はその分数である。

## 【0207】

抗体 - 薬剤 - 結合物の作製は、当業者公知の任意の方法により行うことができる。簡略に述べれば、抗体 - 薬剤 - 結合物は、抗体ユニットとして多重特異性抗体、薬剤、及び任意選択的に薬剤を結合するリンカー、及び結合剤を含有してもよい。

30

## 【0208】

多くの異なる反応が、薬剤及び/又はリンカーの結合剤に対する共有結合に対し利用可能である。これは、結合剤のアミノ酸残基の反応により行うことができ、例えば、リシンのアミン基、グルタミン酸及びアスパラギン酸の遊離カルボキシル酸基、システインのスルフヒドリル基、及び芳香族アミノ酸の様々な部分を含む抗体分子が挙げられる。普遍的に用いられている非特異的な共有結合法は、化合物のカルボキシ(又はアミノ)基を、抗体のアミノ(又はカルボキシ)基に連結するためのカルボジイミド反応である。さらに、例えばジアルデヒド又はイミドエステル等の二機能性剤を用いて、化合物のアミノ基を、抗体分子のアミノ基に連結させる。

## 【0209】

また、Schiffベース反応が、結合剤へ薬剤を付着するために利用可能である。この方法には、グリコール又はヒドロキシ基を含有する薬剤の過ヨウ素酸塩酸化が含まれ、それによって、アルデヒドが形成され、次いで、結合剤と反応させる。付加は、結合剤のアミノ基を伴うSchiffベースの形成を介して発生する。イソチオシアネートを、結合剤への共有結合する薬剤に対するカップリング剤として用いることもできる。他の技術も当業者に公知であり、本発明の範囲内にある。

40

## 【0210】

一部の実施態様において、リンカーの前駆体である中間体を適切な条件下で薬剤と反応させる。他の実施態様において、反応基は、薬剤及び/又は中間体に用いられる。薬剤と中間体の間の反応の産物、又は誘導体化薬剤を、次いで、本発明の多重特異性抗体と適切な

50

条件下で反応させる。

【0211】

化学的修飾を所望される化合物に施し、本発明の結合物の調製の目的に対し、より簡便にその化合物の反応を行ってもよい。例えば、アミン、ヒドロキシル又はスルフヒドリル等の官能基を、薬剤の活性又は他の特性に最小限の受容可能な影響に留まる位置で、薬剤に付加してもよい。

【0212】

A D C リンカーユニット

典型的には、抗体 - 薬剤結合物は、薬剤ユニットと抗体ユニットの間にリンカーユニットを含有する。一部の実施態様において、リンカーは、細胞内又は細胞外の条件下で開裂可能であり、リンカーの開裂により、適切な環境下で抗体から薬剤ユニットが放出される。例えば、あるプロテアーゼを分泌する固形腫瘍を、開裂可能なリンカーの標的とし、他の実施態様においては、細胞内プロテアーゼが用いられる。さらに他の実施態様において、リンカーユニットは開裂可能ではなく、例えばリソソームにおける抗体の分解により、薬剤が放出される。

10

【0213】

一部の実施態様においてリンカーは、細胞内環境（例えば、リソソーム又はエンドソーム又はカベオラ内）に存在する開裂剤により開裂可能である。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼ酵素又はプロテアーゼ酵素（限定されないが、リソソームプロテアーゼ又はエンドソームプロテアーゼが挙げられる）により開裂されるペプチジルリンカーであってもよい。一部の実施態様においては、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸の長さであり、又は少なくとも3アミノ酸もしくはそれ以上の長さである。

20

【0214】

開裂剤としては、限定されないが、カテプシンB及びD並びにプラスミン（それらすべて、ジペプチド薬剤誘導体を加水分解することが知られており、標的細胞の内側で活性薬剤の放出をもたらす）が挙げられる（例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123を参照のこと）。CD38発現細胞に存在する酵素により開裂可能なペプチジルリンカー。例えば、癌性組織において高度に発現されているチオール依存性プロテアーゼカテプシンBにより開裂可能なペプチジルリンカーを用いてもよい（例えば、Phe - Leu又はGly - Phe - Leu - Glyリンカー（配列番号X））。そのようなリンカーの他の例は、米国特許第6,214,345号（全ての目的に対し、参照によりその全体で本明細書に援用される）に開示されている。

30

【0215】

一部の実施態様において、細胞内プロテアーゼにより開裂可能なペプチジルリンカーは、Val - Citリンカー又はPhe - Lysリンカーである（例えば、val - citリンカーとドキシソルピシンの合成を開示する米国特許第6,214,345号を参照のこと）。

【0216】

他の実施態様において、開裂可能なリンカーは、pH感受性である。すなわち、あるpH値での加水分解に感受性である。典型的には、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソームで加水分解可能な酸 - 不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス - アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタール等）を用いてもよい（例えば、米国特許第5,122,368号、第5,824,805号、第5,622,929号、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661を参照のこと）。そのようなリンカーは、例えば血液中などの中性pH条件下で比較的安定であるが、リソソームの近似pHであるpH5.5又は5.0を下回る場合は不安定である。ある実施態様において、加水分解可能なリンカーは、チオエステルリンカーである（例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に付加されるチオエステル）（米国特許第5,622,929号を参照のこと）。

40

50

## 【0217】

さらに他の実施態様において、リンカーは、還元条件下で開裂可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。様々なジスルフィドリンカーが当分野に公知であり、例えば、SATA（N-スクシンイミジル-5-アセチルチオアセテート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチレート）及びSMP T（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- -メチル- -（2-ピリジル-ジチオ）トルエン）-、SPDB及びSMP Tが挙げられる。（例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987を参照のこと。米国特許第4, 880, 935号も参照のこと）。

## 【0218】

他の実施態様において、リンカーは、マロン酸リンカー（Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304）、又は3'-N-アミドアナログ（Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12）である

## 【0219】

さらに他の実施態様において、リンカーユニットは、開裂可能ではなく、薬剤は、抗体の分解により放出される。米国特許公開2005/0238649を参照のこと（全ての目的に対し、全体で本明細書に参照により援用される）。

## 【0220】

多くの実施態様において、リンカーは自壊性である。本明細書において、「自壊性スペーサー」という用語は、2つの離れて置かれた化学的部分を共に共有結合させ、三部構成分子とすることができる二機能性化学部分を指す。もし第一の部分に対するその結合が開裂された場合、第二の化学的部分から自発的に分離する。例えば、WO2007059404A2、WO06110476A2、WO05112919A2、WO2010/062171、WO09/017394、WO07/089149、WO07/018431、WO04/043493及びWO02/083180を参照のこと（薬剤及び開裂可能な基質が任意選択的に自壊性リンカーを介して連結されている薬剤-開裂可能な基質の結合物を目的としており、すべて参照により明示的に援用される）。

## 【0221】

多くの場合、リンカーは細胞外環境に対し実質的に感受性ではない。本明細書において、リンカーに関し、「細胞外環境に対し実質的に感受性ではない」とは、抗体-薬剤結合物が細胞外環境（例えば、血漿中）に存在した際に、抗体-薬剤結合物試料中のリンカーの約20%、15%、10%、5%、3%未満又はリンカーの約1%未満が、開裂されることを意味する。

## 【0222】

リンカーが細胞外環境に実質的に感受性ではないかどうかは、例えば、抗体-薬剤結合物と血漿を、既定の時間（例えば、2、4、8、16又は24時間）、インキュベートし、次いで、血漿中に存在する遊離薬剤の量を定量することによって、測定することができる。

## 【0223】

他の、非相互排他的な実施態様において、リンカーは、細胞内在化を促進する。ある実施態様において、リンカーは、治療剤と結合された際に細胞内在化を促進する（すなわち、本明細書に記述される抗体-薬剤結合物のリンカー治療剤部分の環境において）。さらに他の実施態様において、リンカーは、オーリスタチン化合物及び本発明の多重特異性抗体の両方と結合された際に、細胞の内在化を促進する。

## 【0224】

本発明の組成物及び方法に用いることができる様々なリンカーの例は、WO2004-010957、米国特許公開2006/0074008、米国特許公開200502386

10

20

30

40

50

49、及び米国特許公開2006/0024317に記述されている（各々が、全ての目的に対し、参照により本明細書にその全体で援用される）。

【0225】

**薬剂量**

薬剂量は、 $p$ により表され、及び分子中の抗体当たりの薬剂部分の平均数である。薬剂量（ $p$ ）は、抗体当たり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の部分であってもよいが、しばしば、平均数は、分数又は小数である。一般的に、1～4の薬剂量が多くの場合有用であり、及び1～2もまた有用である。本発明のADCは、1～20の薬剂部分の範囲で結合された抗体のコレクションを含有する。結合反応から調製されたADCの抗体当たりの薬剂部分の平均数は、例えば質量分析及びELISAアッセイ等の標準的な手段により解析されてもよい。

10

【0226】

$p$ を単位としたADCの量的分布もまた測定されてもよい。一部の例において、同種ADCの分離、精製及び特徴解析（ $p$ は、他の薬剂量を有するADC由来のある値である）は、例えば電気泳動等の手段により行うことができる。

【0227】

一部の抗体-薬剂結合物に対し、 $p$ は、抗体の付加部位の数により限定されうる。例えば、付加がシステインチオールである場合、上述の例示的な実施態様のように、抗体は、たった1つ、又はいくつかのシステインチオール基のみを有してもよく、又はたった1つ又はいくつかの十分に反応性のあるチオール基を有してもよく、それらを介してリンカーは付加される。ある実施態様において、例えば $p > 5$ 等、薬剂量が高いと、ある抗体-薬剂結合物の凝集、不溶、毒性、又は細胞透過性の消失が発生することがある。ある実施態様において、本発明のADCに対する薬剂量は、1～約8；約2～約6；約3～約5；約3～約4；約3.1～約3.9；約3.2～約3.8；約3.2～約3.7；約3.2～約3.6；約3.3～約3.8；又は約3.3～約3.7の範囲である。実施に、あるADCに対し、抗体当たりの最適な薬剂部分の比率は、8未満、及び約2～約5でありうることを示されている。2005-0238649 A1を参照のこと（参照によりその全体で本明細書に援用される）。

20

【0228】

ある実施態様において、薬剂部分の理論上の最大値よりも少ない量が、結合反応の間に抗体に結合される。抗体は、例えば、薬剂-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリシン残基を含有してもよい（以下に記述）。胃パン的に、抗体は、薬剂部分と連結される多くの遊離及び反応性のシステインチオール基を含有しない；実際に、抗体中のほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在している。ある実施態様において、抗体を、例えばジチオスレイトール（DTT）又はトリカルボニルエチルホスフェート（TCEP）等の還元剤を用いて、部分的に又は全体的に還元条件下で還元し、反応性のシステインチオール基を生じさせてもよい。ある実施態様において、抗体は、例えばリシン又はシステイン等の反応性求核基を示すために、変性条件に供される。

30

【0229】

ADCの量（薬剂/抗体比）は、異なる方法で制御されてもよく、例えば、（i）薬剂-リンカー中間体のモル過剰を制限する、又は抗体に対するリンカー試薬のモル過剰を制限する、（ii）結合反応時間又は温度を制限する、（iii）システインチオール修飾に対する、部分的又は制限還元条件、（iv）リンカー-薬剂付着物の数及び/又は位置の制御のためにシステイン残基の数及び位置が修飾されるよう、抗体のアミノ酸配列を組み換え技術により操作する（例えば、本明細書及びWO2006/034488開示されるように調製される、thioMab又はthioFab等。その全体で参照により本明細書に援用される）。

40

【0230】

2以上の求核基が薬剂-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応し、次いで薬剂部分試薬

50

と反応する場合、得られた産物は、抗体の付加された1以上の薬剤部分が分布されたADC化合物の混合物であることを理解されたい。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体に対し特異的であり、及び薬剤に対して特異的である、二重ELISA抗体アッセイにより混合物から算出されてもよい。個々のADC分子は、質量分析及びHPLC分離（例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー）によって、混合物中で特定されてもよい。

【0231】

一部の実施態様において、1つの担持値を有するヘテロADCが、電気泳動又はクロマトグラフィーにより結合物混合物から単離されてもよい。

【0232】

ADCの細胞毒性効果の測定法

薬剤又は抗体-薬剤結合物が細胞増殖抑制効果及び/又は細胞毒性効果を細胞に対し発揮しているかどうかを測定する方法は公知である。一般的に、抗体薬剤結合物の細胞毒性活性又は細胞増殖抑制活性は、以下により測定することができる：抗体薬剤結合物の標的タンパク質を発現する哺乳類細胞を、細胞培養培地中に曝すこと；約6時間～約5日間、細胞を培養すること；及び細胞の活性を測定すること。細胞ベースの*in vitro*アッセイを用いて、活性（増殖）、細胞毒性及び抗体薬剤結合物によるアポトーシスの誘導（カスパーゼ活性化）を測定することができる。

【0233】

抗体-薬剤結合物が、細胞増殖抑制効果を発揮しているかどうかを測定するために、チミジン取り込みアッセイを用いてもよい。例えば、標的抗原を発現している癌細胞を5,000細胞/ウェルの密度で播種し、72時間培養し、そして、72時間の最後の8時間の間に、3H-チミジンの0.5  $\mu$ Ciに曝してもよい。培養細胞への3Hチミジンの取り込みは、抗体薬剤結合物の存在下、又は非存在下で測定される。

【0234】

細胞毒性の測定に対しては、ネクローシス又はアポトーシス（プログラム化された細胞死）を測定してもよい。ネクローシスは、通常、細胞膜の透過性増加により発生する；細胞の膨張及び細胞膜の破裂。アポトーシスは通常、膜のブレブ形成、細胞質の凝縮、及び内在性エンドヌクレアーゼの活性化により特徴づけられる。癌細胞に対するこれら効果が測定された場合、当該抗体薬剤結合物が、癌の治療に有用であることを示している。

【0235】

細胞活性は、例えばニュートラルレッド、トリパンブルー、又はALAMAR（登録商標）ブルー（例えば、Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476を参照）等の色素の細胞における取り込みを測定することにより、確定することができる。そのようなアッセイにおいては、細胞は、色素を含有する培地中でインキュベートされ、細胞が洗浄され、そして色素が残留すれば、それは色素の細胞取込を反映しており、分光光度計により測定される。タンパク質結合色素であるスルホローダミンB（SRB）もまた、細胞毒性の測定に用いることができる（Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12）。

【0236】

あるいは、例えばMTT等のテトラゾリウム塩が、生きた細胞は検出するが、死んだ細胞は検出しないことにより、哺乳類細胞の生存及び増殖に対する定量比色アッセイに用いられる（例えば、Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63を参照のこと）。

【0237】

アポトーシスは、例えば、DNAの断片化を測定することにより定量することができる。DNA断片化の*in vitro*定量測定のための市販の光分析法が利用可能である。そのようなアッセイの例としては、TUNEL（断片化DNAにおける標識ヌクレオチドの組み込みを検出する）及びELISAベースアッセイが挙げられ、（Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals)）に記述されている。

【0238】

アポトーシスはまた、細胞における形態変化を測定することにより、確定することができる

10

20

30

40

50

る。例えば、ネクローシスに関しては、細胞膜の完全性の消失が、ある色素の取り込みを測定することにより確定することができる（例えば、アクリジンオレンジ又はエチジウムブロミド等の蛍光色素）。アポトーシスの細胞数を測定する方法は、Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)に開示されている。また、細胞をDNA色素で標識してもよく（例えば、アクリジンオレンジ、エチジウムブロミド、又はヨウ化プロピジウム等）、クロマチン凝集及び核膜内部に沿った辺縁趨向が細胞に観察される。アポトーシスを確定するために測定することができる他の形態変化としては、例えば、細胞質凝縮、膜ブレブ化の増加、及び細胞萎縮が挙げられる。

#### 【0239】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着分画及び「浮遊」分画の両方で測定することができる。例えば、両方の分画を上清を除去することにより回収し、付着細胞をトリプシン処理し、遠心洗浄工程（例えば、2000rpmで10分）の後で調製物を混合し、そしてアポトーシスを検出する（例えば、DNA断片化の測定により）（例えば、Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16を参照のこと）。

#### 【0240】

本発明の多重特異性抗体の治療組成物の *in vivo*における治療効果は、適切な動物モデルにおいて評価することができる。例えば、ヘテロ癌モデルを用いることができ、ここで、癌移植片又は継代ヘテロ組織は免疫不全動物（例えば、ヌードマウス又はSCIDマウス）へと導入されている（Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408）。有効性は、腫瘍形成、腫瘍退縮又は転移等の障害を測定するアッセイを用いて測定することができる。

#### 【0241】

上述の実施において用いられる治療組成物は、所望の送達法に適した担体を含有する医薬組成物へと製剤化することができる。適切な担体としては、治療組成物と混合した際に当該治療組成物の抗腫瘍機能が保持され、一般的に、患者の免疫システムに対し非反応性である任意の物質が挙げられる。例としては、限定されないが、例えば滅菌リン酸緩衝生理食塩水、静菌性水等の標準的な多くの医薬担体の内の任意のものが挙げられる（概要として、Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980を参照のこと）。

#### 【0242】

##### *in vivo*投与のための抗体組成物

本発明に従い用いられる抗体の製剤は、所望の程度の純度を有する抗体と、任意の薬学的に受容可能な担体、賦形剤又は安定化剤（Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osal, A. Ed. [1980]）を混合することにより、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、保管のために調製される。受容可能な探知、賦形剤又は安定化剤は、用いられる投与量及び濃度で、受け手に対し非毒性であり、例えばリン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝剤；抗酸化剤（アスコルビン酸及びメチオニンが挙げられる）；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン（例えば、メチルパラベン又はプロピルパラベン）；カテコール；レゾルシン；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；例えば血清アルブミン、ゼラチン、又はイムノグロブリン等のタンパク質；例えばポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；単糖、二糖及び他の糖質（グルコース、マンノース又はデキストリンが挙げられる）；例えばEDTA等のキレート剤；例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖類；塩形成カウンターイオン（例えばナトリウム）；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又は非イオン性界面活性剤（例えば、TWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）又はポリエチレングリコール（PEG））、が

10

20

30

40

50

挙げられる。

【0243】

本明細書の製剤はまた、治療される特定の疾患に対して、必要に応じて2以上の活性化化合物（好ましくは、互いに悪影響を絶えない相補的な活性を有するもの）を含有してもよい。例えば、他の特異性を有する抗体を加えることが望ましい。あるいは、又はさらに、組成物は、細胞毒性剤、サイトカイン、増殖阻害剤、及び/又は小分子アンタゴニストを含有してもよい。そのような分子は、意図される目的に対し有効な量で組み合わせて適切に存在する。

【0244】

活性成分はまた、例えば、液滴形成技術により、又は界面重合により調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ-（メチルメタシレート）マイクロカプセル）に、コロイド薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、又はマクロエマルジョン中で、内包されてもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

10

【0245】

*in vivo* 投与に用いられる製剤は、滅菌されている、又はそれに近いものでなければならない。これは、滅菌ろ過膜を通してろ過することにより、容易に行うことができる。

20

【0246】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の適切な例としては、抗体を含有する疎水性個体ポリマーの半透過性基質が挙げられ、当該基質は、例えばフィルム又はマイクロカプセル等の造形品の形態である。徐放性基質の例としては、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレンビニル酢酸、分解性の乳酸グリコール酸のコポリマー（例えば、LUPRON DEPOSIT（登録商標）（乳酸グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射用マイクロスフィア）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。例えばエチレンビニル酢酸及び乳酸グリコール酸等のポリマーは、100日間にわたり分子を放出することができる一方で、あるハイドロゲルは、もっと短い期間、タンパク質を放出する。

30

【0247】

内包化された抗体が、体内に長期間滞留する場合、37℃で湿潤な環境に曝されたことによって分解又は凝集する可能性があり、その結果、生物学的活性を失い、免疫原性が変化する可能性がある。関与するメカニズムに依存した安定化のための合理的戦略を策定してもよい。例えば、もし凝集のメカニズムがチオ-ジスルフィド交換を介した分子間S-S結合の形成であることが判明した場合、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、適切な添加剤を用いて含水率を制御し、及び特異的なポリマー基質組成物を開発することにより、安定化を達成することができる。

40

【0248】

投与モダリティ

本発明の抗体及び化学療法剤は、例えばボラス投与として、又はある期間にわたる持続注入による静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、脳脊髄内投与、皮下投与、動脈内投与、滑液嚢内投与、くも膜下投与、口腔投与、局所投与又は吸入経路等の公知方法に従い、対象投与される。抗体の静脈内投与又は皮下投与が好ましい。

【0249】

治療モダリティ

本発明の方法において、治療を用いて、疾患又は状態に関し、治療に対する好反応を得る。「治療に対する好反応」とは、疾患もしくは状態における改善、及び/又は疾患もしくは

50

は状態と関連した症状における改善が意図される。例えば、治療に対する好反応とは、以下の疾患における改善のうちの1以上を指す：(1)腫瘍細胞の数の減少；(2)腫瘍細胞死の増加；(3)腫瘍細胞生存の阻害；(5)腫瘍増殖の阻害(すなわち、ある程度までの減速、好ましくは停止)；(6)患者の生存率の増加；及び(7)疾患又は状態に関連した症状の1つ以上からの何らかの緩和。

【0250】

所与の疾患又は状態における治療に対する好反応は、その疾患又は状態二特異的な、標準化された反応基準により測定することができる。腫瘍応答は、例えば、磁気共鳴画像撮影法(MRI)スキャン、X線放射線画像撮影、コンピューター断層撮影(CT)スキャン、骨スキャン画像撮影法、内視鏡、及び骨髄穿刺(BMA)を含む腫瘍生検試料採取及び循環系中の主要細胞数の計測等のスクリーニング技術を用いて、腫瘍の形態(すなわち、全体的な腫瘍体積、腫瘍サイズ等)における変化に対して評価することができる。

10

【0251】

これらの治療に対する好反応に加え、治療を受けた対象は、疾患と関連した症状の改善の有益な効果を経験するであろう。

【0252】

ゆえに、B細胞腫瘍に対しては、対象は、いわゆるB症状(すなわち、寝汗、発熱、体重減少及び/又はじんましん)の減少を経験するであろう。前悪性状態に対しては、多重特異性治療剤を用いた治療によって、関連悪性疾患の発症(例えば、意義不明のモノクローナル性高ガンマグロブリン血症(MGUS))に罹患する対象における、多発性骨髄腫の発症等)が阻害、及び/又は発症までの時間が延長されてもよい。

20

【0253】

疾患の改善は、完全寛解として特徴付けられてもよい。「完全寛解」とは、従前の異常なX線検査のいずれかの正常化を伴う、臨床的に検出可能な疾患の消失が意図される(骨髄腫の場合には、骨髄、及び脳脊髄液(CSF)又は以上なモノクローナル性タンパク質)。

【0254】

本発明方法に従う治療の後に、そのような応答が、少なくとも4~8週間、場合によっては6~8週間、維持されてもよい。あるいは疾患における改善は、部分反応であるとしてカテゴライズされてもよい。「部分反応」とは、新たな病変部位を除き、すべての計測可能な腫瘍組織量(すなわち、対象に存在する悪性細胞の数、又は腫瘍量の測定量、又は異常なモノクローナル性タンパク質の量)における少なくとも約50%の減少が、4~8週間、又は6~8週間維持されることが意図される。

30

【0255】

本発明に従う治療には、用いられる医薬品の「治療有効量」が含まれる。「治療有効量」とは、所望される治療効果を得るために、必要な期間、及び投与量での有効な量を指す。

【0256】

治療有効量は、例えば個々の疾患状態、年齢、性別及び体重等の因子、及び当該医薬の個々において所望される応答を惹起する能力に従い変化しうる。治療有効量はまた、抗体又は抗体部分の治療上の有益な効果が、毒性効果又は有害作用を上回る量である。

40

【0257】

腫瘍療法に対する「治療有効量」はまた、疾患の進行を安定化させる能力により測定されてもよい。化合物の癌を阻害する能力は、ヒト腫瘍における効果を予測させる動物モデルシステムにおいて評価されてもよい。

【0258】

あるいは、組成物のこの特性は、又は当業者公知の*in vitro*アッセイにより、化合物の、細胞増殖を阻害する、アポトーシスを誘導する能力を検証することにより、評価してもよい。治療化合物の治療有効量は、腫瘍サイズを減少させてもよく、又は対象における症状を改善してもよい。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重篤度、及び特定の組成物又は選択された投与経路等の因子に基づいて、その量を決定することができ

50

る。

【0259】

投与レジメンは、最適な所望される応答（例えば、治療応答）がもたらされるよう調節される。例えば、単回ボラス投与が行われてもよく、数回に分けられた投与量が、経時的に投与されてもよく、又は治療状況の要件によって、投与量を比例的に増加又は減少させてもよい。非経口投与組成物は、投与を簡便にするために、及び投与量を均一にするために、投与単位の形態で処方されてもよい。本明細書において用いられる投与単位の形態とは、治療される対象に対して単一化された投与量として適した、物理的に別個の単位を指し；各単位には、必要とされる医薬担体と関連した、所望の治療効果をもたらすように算出された既定量の活性化化合物を含有する。

10

【0260】

本発明の投与単位の形態に対する仕様は、（a）活性化化合物のユニークな特徴及び得られる特定の治療効果、並びに、（b）例えば個々における治療感受性に対する、当該活性化化合物の構成に関する当分野固有の制限、により決定され、及び直接的に依存している。

【0261】

本発明において用いられる多重特異性抗体に対する効率的な投与量及び投与レジメンは、治療される疾患又は状態に依っており、及び当業者によって決定されてもよい。

【0262】

本発明において用いられる多重特異性抗体の治療有効量に対する非限定的な範囲の例は、0.1 ~ 100 mg / kg であり、例えば、約 0.1 ~ 50 mg / kg、例えば、約 0.1 ~ 20 mg / kg、例えば約 0.1 ~ 10 mg / kg、例えば約 0.5、例えば約 0.3、約 1、又は約 3 mg / kg である。他の実施態様において、抗体は、1 mg / kg 以上の投与量、例えば、1 ~ 20 mg / kg の投与量、例えば、5 ~ 20 mg / kg の投与量、例えば、8 mg / kg の投与量で投与される。

20

【0263】

当分野の医療専門家であれば、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、医者又は獣医であれば、所望される治療効果を得るために必要とされる量よりも低いレベルで、医薬組成物中の薬剤の投与を開始し、及び所望される効果が得られるまで、徐々に投与量を増加させることができる。

【0264】

1つの実施態様において、多重特異性抗体は、10 ~ 500 mg / kg の投与量（例えば、200 ~ 400 mg / kg）で毎週、点滴により投与される。そのような投与を例えば、1 ~ 8回、例えば3 ~ 5回、繰り返してもよい。投与は、2 ~ 24時間（例えば、2 ~ 12時間）の期間にわたる持続注入により行われてもよい。

30

【0265】

1つの実施態様において、多重特異性抗体は、もし毒性を含む副作用を減少させることが必要とされる場合には、長い期間（例えば、24時間以上）にわたる、ゆっくりとした持続注入により投与される。

【0266】

1つの実施態様において、多重特異性抗体は、250 mg ~ 2000 mg（例えば、300 mg、500 mg、700 mg、1000 mg、1500 mg、又は2000 mg）の投与量で、8回（例えば、4 ~ 6回）まで、毎週投与される。投与は、2 ~ 24時間（例えば、2 ~ 12時間）の期間にわたる持続注入により行われてもよい。当該レジメンは、例えば6か月 ~ 12か月後に、必要に応じて1回以上繰り返されてもよい。投与量は、例えば生物学的試料を採取し、当該多重特異性抗体の抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を用いることによって本発明の化合物の血中量を測定することにより決定又は調節されてもよい。

40

【0267】

さらなる実施態様において、多重特異性抗体は、2 ~ 12週間（例えば、3 ~ 10週間、例えば4 ~ 8週間）に1度、投与されてもよい。

50

## 【0268】

1つの実施態様において、多重特異性抗体は、維持療法により、例えば、6か月以上の期間、週に1度、投与される。

## 【0269】

1つの実施態様において、多重特異性抗体は、多重特異性抗体の1度の点滴と、その後の放射性同位体に結合された多重特異性抗体の点滴を含むレジメンにより投与される。レジメンは、例えば、7～9日後に繰り返されてもよい。

## 【0270】

非限定的な例として、本発明に従う治療は、治療開始後、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40日目のうちの少なくとも1つで、あるいは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20週目のうちの少なくとも1つで、又はそれらの任意の組み合わせで、24、12、8、6、4もしくは2時間又はそれらの任意の組み合わせ毎に、単回投与、又は分割投与を用いて、1日当たり約0.1～100mg/kg（例えば、0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90又は100mg/kg）の量の抗体を1日投与量として投与してもよい。

10

20

## 【0271】

一部の実施態様において、多重特異性抗体分子は、1以上の追加の治療剤（例えば、化学療法剤）と組み合わせて用いられる。DNA損傷化学療法剤の非限定的な例としては、トポイソメラーゼI阻害物質（例えば、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、及びそのアナログ又は代謝物、並びにドキシソルピシン）；トポイソメラーゼII阻害物質（例えば、エトポシド、テニポシド、及びダウノルピシン）；アルキル化剤（例えば、メルファラン、クロラムブシル、ブシルファン、チオテパ、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、デカルバジン、メトトレキサート、ミトマイシンC、及びシクロホスファミド）；DNAインターカレーター（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、及びカルボプラチン）；DNAインターカレーター及びフリーラジカル生成物質（例えば、プレオマイシン）；並びに、ヌクレオシド模倣体（例えば、5-フルオロウラシル、カペシチビン、ゲムシタビン、フルダラビン、シタラビン、メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、及びヒドロキシウレア）が挙げられる。

30

## 【0272】

細胞複製を妨害する化学療法剤としては、：パクリタキセル、ドセタキセル、及び関連アナログ；ビンクリスチン、ピンブラスチン、及び関連アナログ；サリドマイド、レナリドミド、及び関連アナログ（例えば、CC-5013及びCC-4047）；タンパク質チロシンキナーゼ阻害物質（例えば、イマチニブメシレート及びゲフチニブ）；プロテアソーム阻害物質（例えば、ボルテゾミブ）；NF- $\kappa$ B阻害物質（I $\kappa$ Bキナーゼの阻害物質を含む）；癌で過剰発現されているタンパク質に結合する抗体で、それにより細胞複製を下方制御するもの（例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ及びペバシズマブ）；並びに、癌において上方制御、過剰発現又は活性化されており、その阻害により細胞複製が下方制御されることが知られている他のタンパク質又は酵素の阻害物質。

40

## 【0273】

一部の実施態様において、本発明の抗体は、V e l c a d e（登録商標）（ボルテゾミブ）を用いた治療の前、治療と同時、又は治療の後に用いられてもよい。

## 【0274】

すべての引用された参考文献は、その全体において、参照により本明細書に明示的に援用される。

## 【0275】

50

解説の目的のために本発明の特定の実施態様が上述されているが、当業者であれば、添付の請求項に記述される本発明から逸脱することなく、詳細に関する多くの変更が行われ得ることを認識するであろう。

【実施例】

【0276】

本発明を解説するために、実施例が以下に提示される。これら実施例は、任意の特定の応用又は動作理論に本発明が限定されることを意図しない。本発明に検討される全ての定常領域の位置に関し、ナンバリングは、Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda。参照により全体が援用される)のEUインデックスに従っている。当業者であれば、この慣習が、イムノグロブリン配列の具体的な領域における非連続的なナンバリングからなり、それによりイムノグロブリンファミリーの保存された位置に基準を標準化することが可能となることが認識されるであろう。したがって、EUインデックスにより定義された任意の所与のイムノグロブリンの位置は、その連続的な配列に対応する必要はない。

10

【0277】

実施例1. pIを低下させるための非天然型電荷置換の設計

抗体定常鎖を、定常ドメインにおいて置換を操作することにより、低いpIを有するよう改変した。pIの低下は、塩基性アミノ酸(K又はR)を酸性アミノ酸(D又はE)へと置換することにより操作することができ、それにより、最も大きくpIが変化する。塩基性アミノ酸を中性アミノ酸へと変異させる、及び中性アミノ酸を酸性アミノ酸へと変異させることによっても、pIの低下がもたらされる。アミノ酸pK値のリストは、Bjellqvist et al., 1994, Electrophoresis 15:529-539の表1にある。

20

【0278】

我々は、抗体CH1(C<sub>1</sub>)及びCL(C<sub>1</sub>又はCK)領域(図13に配列を示す)中の置換を研究することを選択した(Fc領域とは異なり、それらは抗体の薬理学的特性に影響を与える天然型のリガンドと相互作用しないため)。どの位置を変異させるかを決定するに当たり、例えば構造及び/又は機能に対する置換もしくは置換セットの影響を最小化するために、周辺環境及びWTアミノ酸とその近隣との接触点の数を考慮した。CH1及びCKの位置の各々の、溶媒の到達しやすさ、及び露出される割合を、抗体Fabドメインの関連結晶構造を用いて算出した。結果は、USSN 13/648, 951の図2及び図3において、それぞれC<sub>1</sub>及びCKに対し示されている(図及び付随する説明分は明示的に参照により本明細書に援用される)。イムノグロブリンアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)間のアイソタイプである位置に関して、CH1及びCLドメインを検証することにより、さらに設計を行った。そのようなバリエーションは自然に発生するものであるため、当該位置は、置換に対し許容的であると予測される。この分析に基づいて、pIを低下させるが、ドメインの生物物理的特性に与える影響は最小限であると予測される多くの置換が特定された。

30

【0279】

本明細書のすべてのヘテロ二量体タンパク質に対して、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子を、哺乳類発現ベクターpTT5において構築した。ヒトIgG1定常鎖遺伝子は、IMAGEクローンから得て、pTT5ベクターへとサブクローニングされた。抗VEGF抗体をコードするVH及びVL遺伝子は、業者により合成され(Blue Heron Biotechnologies, Bothell WA)、及び適切なCL及びIgG1定常鎖をコードするベクターへとサブクローニングされた。アミノ酸修飾は、QuickChange(登録商標)部位指向性突然変異誘導法(Stratagene, La Jolla CA)を用いた、部位指向性突然変異誘導により構築された。すべてのDNAが配列解析され、配列の忠実性が確認された。

40

【0280】

重鎖遺伝子(VH-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)を含有するプラスミドを、軽鎖遺伝子(VL-C<sub>1</sub>)を含有するプラスミドと共に、リポフェクトアミン(Invitrogen, Carlsba

50

d CA) を用いて 293E 細胞へと共トランスフェクトし、FreeStyle 293 培地 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中で増殖させた。5 日間増殖させた後、MabSelect 樹脂 (GE Healthcare) を用いたプロテイン A アフィニティによって培養上清から精製した。抗体濃度は、ピシンコニン酸 (BCA) アッセイ (Pierce) により測定した。

#### 【0281】

pI 操作された mAb は、Agilent Bioanalyzer 上での SDS PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、等電点ゲル電気泳動 (IEF)、Biacore による抗原への結合、及び示差走査熱量測定法 (DSC) によって、大まかに特徴解析された。すべての mAb が、SDS-PAGE 及び SEC で高い純度を示した。IEF ゲルは、各変異体が設計された等電点を有していたことを示していた。Biacore での結合分析により、pI 操作変異体は、元の抗体と同様のアフィニティで抗原に結合したことが示され、このことから、設計された置換は、mAb の機能を阻害しなかったことが示唆された。図中の DSC は、どの変異体が高い熱安定性を有していたかを示している。

10

#### 【0282】

必要に応じて、血清半減期に対する薬物動態実験を、B6 マウス (マウス FcRn に関しホモ接合性のノックアウトであり、ヒト FcRn のヘテロ接合性のノックインである (mFcRn - / -、hFcRn +))。本明細書において、hFcRn 又は hFcRn + マウスとも呼称される) (Petkova et al., 2006, Int Immunol 18(12):1759-69。参照により全体として援用される) において行った。

20

#### 【0283】

単回の抗体尾静脈注射 (2 mg / kg) を、4 ~ 7 匹のメスのマウス群 (体重によりランダム化されている (20 ~ 30 g の範囲)) に行った。血液 (約 50  $\mu$ l) を各時点で後眼窩静脈叢から採取し、血清へと処理し、分析まで -80 で保存した。抗体濃度は、ELISA アッセイを用いて測定した。抗体の血清濃度は、捕捉試薬として組換え抗原を用いて測定し、検出は、ビオチニル化抗ヒト抗体及びユウロピウム標識ストレプトアビジンを用いて行った。時間分解蛍光シグナルを採取した。PK パラメーターは、WinNonLin (Pharsight Inc, Mountain View CA) を用いた非コンパートメントモデルにより、個々のマウスに対して測定された。名目上の時間及び投与量を、統一の計量点で用いた。

30

#### 【0284】

実施例 2 . 定常領域 pI 操作に対する操作方法

タンパク質又は抗体の pI の低下は、様々な方法を用いて行うことができる。最も基本的なレベルでは、高い pKa を有する残基 (リシン、アルギニン、及びある程度はヒスチジン) を、中性又は負の残基で置き換える、及び / 又は中性の残基を低い pKa の残基 (アスパラギン及びグルタミン酸) で置き換える。具体的な置換は、様々な因子 (構造中の位置、機能における役割、及び免疫原性を含む) に依存する。

#### 【0285】

免疫原性が懸念されるため、pI を低下させる置換により免疫原性が惹起されるリスクを最小化しよう心掛けてもよい。リスクを最小化する 1 つの方法は、変異体の変異量を最小化することである。すなわち、変異数を最も少なくして、pI を低下させることである。電荷交換変異 (K、R 又は H は、D 又は E と交換される) は、pI の低下に最も大きな影響を与えるため、これらの置換が好ましい。pI を低下させながら免疫原性のリスクを最小化する他の方法は、同種ヒトタンパク質からの置換を利用することである。ゆえに、抗体定常鎖に関しては、IgG サブクラス (IgG1、IgG2、IgG3 及び IgG4) 間のアイソタイプ差を利用することによって、低リスクの置換がもたらされる。免疫の認識は、局所的な配列レベルで発生するため (すなわち、MHC II 及び T 細胞受容体が、エピトープ (通常は、9 残基の長さ) を認識する)、pI 改変置換は、配列中に近接するアイソタイプ置換により行われてもよい。この方法において、エピトープは、天然型

40

50

アイソタイプと合致するよう伸長されてもよい。そのような置換により、他のヒト I g G アイソタイプに存在するエピトープが作製され、及び寛容化が期待される。

【0286】

p I の変化を操作する 1 つの方法は、本明細書に開示されるアイソタイプ交換を用いる方法である。

【0287】

タンパク質及び抗体に p I 低下の操作を行う他の方法は、負荷電残基を N 末端又は C 末端に融合する方法である。ゆえに、例えば、主にアスパラギン酸とグルタミン酸からなるペプチドを、抗体重鎖、軽鎖もしくは両方に対する N 末端又は C 末端に融合されてもよい。N 末端は構造的に抗原結合部位に近いので、C 末端が好ましい。

10

【0288】

開示される操作方法に基づいて、抗体重鎖（通常は F c 領域）及び一部の場合においては軽鎖の等電点を改変するための多くの変異体が設計される。

【0289】

実施例 3 . アイソタイプ軽鎖定常領域変異

C K 及び C 間の相同性は、I g G サブクラス間のようには高くないが、存在する配列相同性及び構造的相同性を用いて、アイソタイプ低 p I 軽鎖定常領域を作製するために、置換を誘導した。図 5 6 において、高 p I ( K , R 及び H ) 又は低 p I ( D 及び E ) に貢献する残基を有する位置が太字で強調されている。グレーは、等電点を低下させるための、好ましくはアスパラギン酸又はグルタミン酸で置換されうるリシン、アルギニン及びヒスチジンを示す。これら変異は、単独又は任意の組み合わせで、独立して、及び任意選択的に、少なくとも 1 つの軽鎖を有するスキャホールドの他の全ての重鎖変異と組み合わせることができる。

20

【0290】

実施例 4 . 改変等電点を有する抗体変異体の混合物の精製

分析及び精製を容易にするために、抗体等電点を改変する置換が、抗体変異体の 1 以上の鎖へと導入されてもよい。例えば、U S 2 0 1 1 / 0 0 5 4 1 5 1 A 1 に開示されているようなヘテロ二量体抗体は、1 つの鎖の等電点を改変することにより精製することができ、それにより、発現及びプロテイン A 精製後に存在する多様な種を、電荷の差に基づいた、タンパク質分離法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー）による精製することができる。

30

【0291】

例として、W T - I g G 1 - H C 、低 - p I - H C 及び W T - L C が 2 9 3 E 細胞にトランスフェクトされた際に産生される 3 つの種の間電荷における差異が、アニオン交換クロマトグラフィーによる精製を容易にするのに十分な大きさとなるよう、ペバシズマブの重鎖を、等電点を低下させる置換を導入することにより改変した。上述のようにクローンを作製し、トランスフェクトを行い、及びプロテイン A クロマトグラフィーによる最初の精製が上述のように行われた。図中に 3 つの鎖「X E N P 1 0 6 5 3 の重鎖 1」、「X E N P 1 0 6 5 3 の重鎖 2」、及び「X E N P 1 0 6 5 3 の軽鎖」の配列を示す。プロテイン A 精製の後、ほとんど同じ分子量を有するが、異なる電荷の 3 種を得た。これらは、W T - I g G 1 - H C / W T - I g G 1 - H C 同種二量体 ( p I = 8 . 1 2 ) 、 W T - I g G 1 - H C / 低 p I - H C ヘテロ二量体 ( p I = 6 . 8 9 ) 、及び低 p I - H C / 低 p I - H C 同種二量体 ( p I = 6 . 2 0 ) である。混合物を、2 0 m M T r i s ( p H 7 . 6 ) 中で G E H i T r a p Q H P カラムにロードし、及び同じ T r i s 緩衝液中で、5 0 m M 、 1 0 0 m M 及び最後は 2 0 0 m M からなる N a C l の段階的な勾配を用いて溶出した。溶出は A 2 8 0 でモニターし、及び各分画は、N o v e x ランニング緩衝液を用いて、I n v i t r o g e n の p H 3 ~ 1 0 I E F ゲル上で分析し、及びこれら結果は図 4 0 に示す。W T - I g G 1 - H C / W T - I g G 1 - H C 同種二量体は、p H 7 . 6 でアニオン交換カラムに結合せず、そのため、フロースルー及び洗浄液中に存在する（レーン 1 ~ 2 ）。所望されるヘテロ二量体は、5 0 m M の N a C l （レーン 3 ）で溶出され

40

50

た一方、低 pI - HC / 低 pI - HC 同種二量体は、カラムに最も強く結合し、100 mM (レーン4) 及び200 mM (レーン5) の NaCl で溶出された。ゆえに、所望されるヘテロ二量体変異体は、他の2種と類似した分子量のために、他の手段では精製が困難であるにもかかわらず、低 pI 置換を1つの鎖に導入することによって容易に精製された。各鎖の等電点を操作することによる、抗体の精製法は、様々な二重特異性抗体構築物の精製法に適用することができる。本方法は特に、混合物中の所望の物質が類似の分子量及び他の特性を有するために、通常の前製技術では所望される物質を高い収率で分離することができない場合に特に有用である。

#### 【0292】

実施例5 . pI を改変するための非天然型の電荷置換の設計

10

抗体定常鎖の pI を、定常ドメインの置換を行うことにより改変した。低 pI は、pI を最も大きく低下させる、塩基性アミノ酸 (K 又は R) の酸性アミノ酸 (D 又は E) への置換を行うことにより操作された。塩基性アミノ酸の、中性アミノ酸への変異、及び中性アミノ酸の酸性アミノ酸への変異もまた、pI の低下をもたらす。逆に、pI の増加は、最も大きな pI の増加をもたらす、酸性アミノ酸 (D 又は E) の塩基性アミノ酸 (K 又は R) への置換を行うことにより操作することができる。酸性アミノ酸の、中性アミノ酸への変異、及び中性アミノ酸の塩基性アミノ酸への変異もまた、pI の増加をもたらす。アミノ酸の pK 値のリストは、Bjellqvist et al., 1994, Electrophoresis 15:529-539 の表1に見出される。

#### 【0293】

20

どの位置に変異を行うかを決定するに当たり、例えば構造及び/もしくは機能に対する置換又は置換セットの影響を最小化するために、周辺環境及び WT アミノ酸とその近隣との接触点の数を考慮した。各定常領域位置の溶媒の到達しやすさ、及び露出される割合を、関連結晶構造を用いて算出した。この分析に基づいて、pI を低下又は増加させるが、ドメインの生物物理的特性に与える影響は最小限であると予測される多くの置換が特定された。

#### 【0294】

タンパク質の pI の算出は以下のように行われた。第一に、タンパク質中に存在する D、E、C、H、K、R 及び Y アミノ酸の数、並びに、N 末端及び C 末端の数の総数が考慮された。次いで、タンパク質が全体的にゼロ電荷となる pH を特定することにより、pI が算出された。これは、多くの検証 pH 値での、タンパク質の正味電荷を算出することにより行われた。検証 pH 値は、低 pH (0) から高 pH (14) まで、0.001 きざみで増加させながら、タンパク質の電荷がゼロに到達又はゼロを超えるまで、反復方式でセットされた。所与の pH でのタンパク質の正味電荷は、以下の式により算出された：

30

#### 【数1】

$$q_{\text{protein}}(\text{pH}) = \sum_{i=\text{H,K,R,Ntermini}} \frac{N_i}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_i}} - \sum_{i=\text{D,E,C,Y,Ctermini}} \frac{N_i}{1 + 10^{\text{pK}_i - \text{pH}}}$$

ここで、 $q$  タンパク質 (pH) は、所与の pH でのタンパク質の正味電荷であり、タンパク質中に存在するアミノ酸  $i$  (又は N 末端もしくは C 末端) の数であり、及びアミノ酸  $i$  (又は N 末端もしくは C 末端) の pK である。

40

#### 【0295】

実施例6 . 改変等電点を有する抗体変異体の混合物の精製

変異体は、最初にプロテイン A により精製され、次いで、50 mM MES (pH 6.0) 中で、GE Healthcare HiTrap SP HP カチオン交換カラムにロードされ、NaCl 勾配を用いて溶出された。溶出の後、各ピーク由来の分画を、分析のために、Lonza IsoGel IEF プレート (pH 範囲は 7 - 11) にロードした。中間の pI ヘテロ二量体の分離は、各ケースにおいて行われ、ヘテロ二量体が、同種二量体よりも大きな pI の差を有している場合に、分離はより良いものとなった。

50

## 【0296】

## 実施例7．pI等配電子変異体の安定性

示差走査蛍光光度法(DSF)を用いて、等配電子pI置換を含有する抗体の安定性を評価した。DSF実験は、Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection Systemを用いて行われた。タンパク質は、SYPRO Orange 蛍光色素を混合され、PBS中で0.25~0.50 mg/mLで溶出された。SYPRO Orangeの最終濃度は10Xであった。最初の10分のインキュベーション期間の後(25)、タンパク質は25 から95 に加熱された(1 / 分の加熱速度)。蛍光測定は、30秒ごとに行われた。融点は、機器のソフトウェアを用いて算出された。結果は図110に示す。結果から、等配電子(+ ) pI変異は安定性が低いことが示唆された。それゆえ、われわれは、高pI側に対し、置換数を減少させるための変異体を作製したが、結果は、E269Qのみが安定性に小さな効果があったのみであり、E272Q及びE283Qは、安定性に対し負の影響が大きかった。

10

## 【0297】

## 実施例8．ヘテロ二量体二重特異性抗体を含有するscFvのIEX精製を可能にするための、荷電scFvリンカーの設計

我々は従前に、アイソタイプ及び等配電子の電荷置換の両方を用いて、pIを増加又は低下させるために、ヘテロ二量体抗体の抗体定常領域を操作した。これらの方法により、ヘテロ二量体種のIEX精製を効果的に行うことができるが、自然にはない置換導入のために、抗体の安定性及び免疫原性に影響を与える可能性がある。ヘテロ二量体二重特異性抗体を含有するscFvに対しては(図87に例を示す)、荷電置換を他の領域(scFv構築物のVH及びVLを連結するscFvリンカー)に導入する。最も普遍的に用いられるリンカーは、(GGGGS)3又は(GGGGS)4であり、ダイアポディ形成を伴わずに、安定したscFvの形成が可能になるほど可塑性があることが示されている。これらの配列はすでに自然には無いものであり、免疫原性の可能性があるエピトープに対し特異性のある配列をほとんど含有しない。それゆえ、われわれは、scFvリンカーに荷電置換を導入することにより、scFvを含有するヘテロ二量体二重特異性種のIEX精製が可能になると考えた。様々な正荷電scFvリンカー及び負荷電scFvリンカーを設計し、それらを図85に示す。全てのリンカーは新規の構築物である(Whitlow et al., (Whitlow M, Protein Eng. 1993 (8), 989-995.)により報告された「Whitlow」リンカーを除く)。6paxA\_1(+A)及び3hsc\_2(-A)として設計されたリンカーは、PDBファイルから得られたヒトタンパク質中の非構造領域のデータベースから取得し、及びこれらリンカーは、(GGGGS)3とおよそ同じ長さであり、及び正荷電又は負荷電を含有している。他のリンカーは、Lys又はGluの反復残基、並びに、正荷電リンカーにおけるタンパク質分解の機会を低下させるために設計されたLys-Proモチーフの導入に基づいている。

20

30

## 【0298】

荷電リンカーは、scFv-His形式における生物物理学的特性に対して最初に評価され、次いで、その後、抗CD19xCD3 Fab-scFv-Fc二重特異性形式中に構築された。抗CD3抗体SP34又は抗CD19 4G7抗体の操作形式のscFvをコードする遺伝子が、哺乳類発現ベクターpTT5中で構築された。全長構築物に対しては、ヒトIgG1定常鎖遺伝子を、IMAGEクローンから取得し、pTT5ベクターへとサブクローニングした。scFv遺伝子は、業者により合成された(Blue Heron Biotechnologies, Bothell WA)。アミノ酸修飾は、QuickChange(登録商標)部位指向性突然変異誘導法(Stratagene, La Jolla CA)を用いた、部位指向性突然変異誘導により構築された。すべてのDNAが配列解析され、配列の忠実性が確認された。

40

## 【0299】

scFv又は重鎖及び軽鎖遺伝子を含有するプラスミドを、リポフェクトアミン(Invitrogen, Carlsbad CA)を用いて293E細胞へとトランスフェクトし(又は全長形式

50

については共トランスフェクトし)、及びFreeStyle 293培地(Invitrogen, Carlsbad CA)中で増殖させた。5日間増殖させた後、MabSelect樹脂(GE Healthcare)を用いた、又はHisタグ化scFvに対してはNi-NTA樹脂を用いたプロテインA(全長)による培養上清からの精製を行った。ヘテロ二量体はさらに、イオン交換クロマトグラフィー(IEX)により精製し、効率的に精製することができるが、改変pI重鎖の能力を評価した。正荷電リンカーをCD3scFv中に含有する抗CD19xCD3二重特異性抗体に対するIEX精製の例は、図90に示す。抗体濃度は、ピシニコニン酸(BCA)アッセイ(Pierce)により測定した。

#### 【0300】

pI操作scFv又は抗体は、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、等電点(IEF)ゲル電気泳動、及び/又は示差走査蛍光光度法(DSF)により特徴を解析した。

#### 【0301】

実施例9. 荷電リンカーを含有するscFvの安定性及び特性

正荷電リンカー又は負荷電リンカーをそれぞれ含有する抗CD3scFv及び抗CD19scFvを、SECの特性並びに、DSFを用いた安定性について評価した。示差走査蛍光光度法(DSF)を用いて、荷電リンカーを含有するscFvの安定性を評価した。DSF実験は、Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection Systemを用いて行われた。タンパク質は、SYPRO Orange蛍光色素と混合され、0.25又は0.50mg/mLまでPBSで希釈された。SYPRO Orangeの最終濃度は10Xであった。25℃で最初に10分間インキュベートした後、タンパク質を、1℃/分の加熱速度で25℃から95℃まで加熱した。蛍光測定は30秒ごとに行った。融点は、機器のソフトウェアを用いて算出した。scFvに対する値は、図86に示す。荷電リンカーは、そのTm値から示されるように、scFv全体の安定性に対しわずかな影響しか与えなかった。精製scFvから得たSECクロマトグラムは図4に示す。高荷電リンカーは、より長い溶出時間を有し、顕著なピーク尾部からは、過剰な電荷によってscFvが予想よりも長くSEC樹脂に張り付いたことが示された。正荷電抗CD3scFvのCD4+T細胞への結合に対する結合の結果(図88)から、非常に高荷電の(GK GK S)4scFv(弱い結合を示した)以外のほとんどのscFvの結合は類似していたことが示された。PBMC中のCD20+細胞に対しゲーティングを行った際、予想外の結合は検出されなかった。しかしながら、SP34細胞を用いて予測外結合を検証した際、高濃度の最も高い荷電リンカーにおいて、若干の予測外結合が認められた(図89)。

#### 【0302】

抗CD19xCD3 Fab-scFv-Fc構築物の抗CD3scFvの正荷電scFvリンカーは、高分子量凝集の量を低下させるという予想外の特徴を有していた(図91)。様々な濃度でインキュベートされた2つの二重特異性構築物(13121-標準的な(GGGGS)4リンカー、及び13124-荷電リンカー(GKPGS)4)のSECクロマトグラムにより、この現象が確認された。

#### 【0303】

荷電scFvリンカーを抗CD3scFv中に含有する抗CD19xCD3構築物の活性は、PBMC及び異なるscFvリンカーを含有するFab-scFv-Fc形式の二重特異性抗CD19xCD3抗体を用いたRTCCアッセイにより評価された(図92)。リンカーは、高荷電リンカー(GK GK S)3(低い活性を有する)を除き、RTCC活性にほとんど影響を与えなかった。

#### 【0304】

本発明のすべての構築物に対する配列を、図93に示す。

10

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

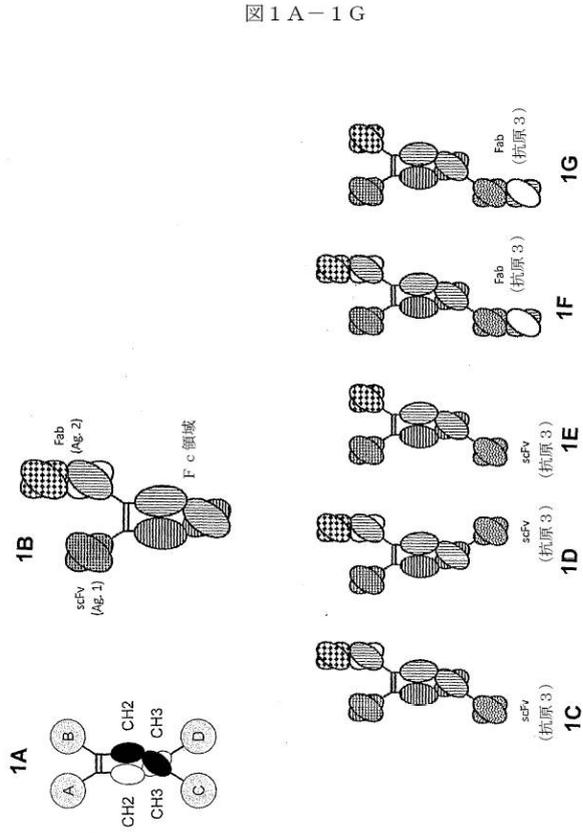
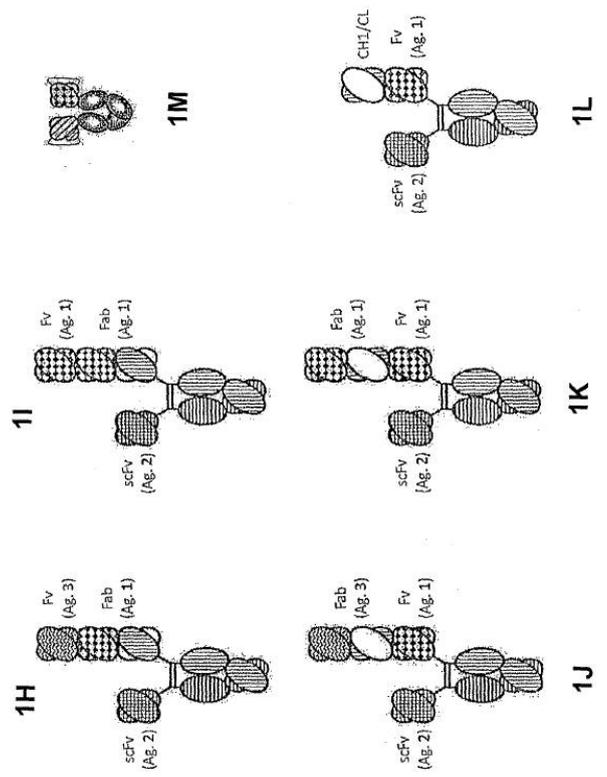


図 1A-1G

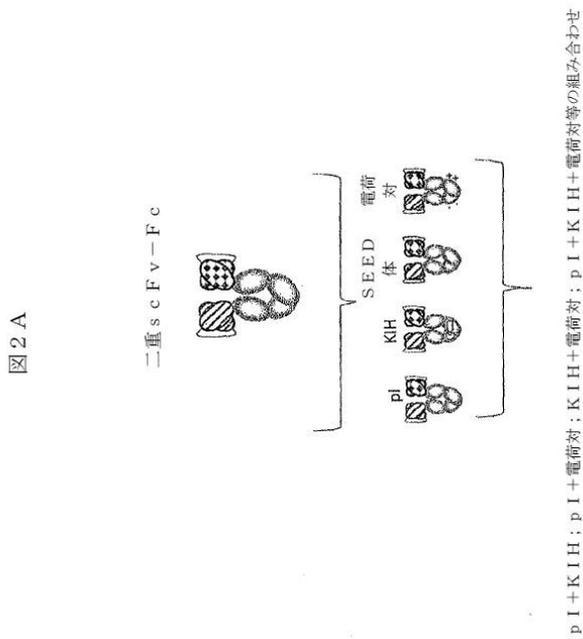
【 図 1 - 2 】



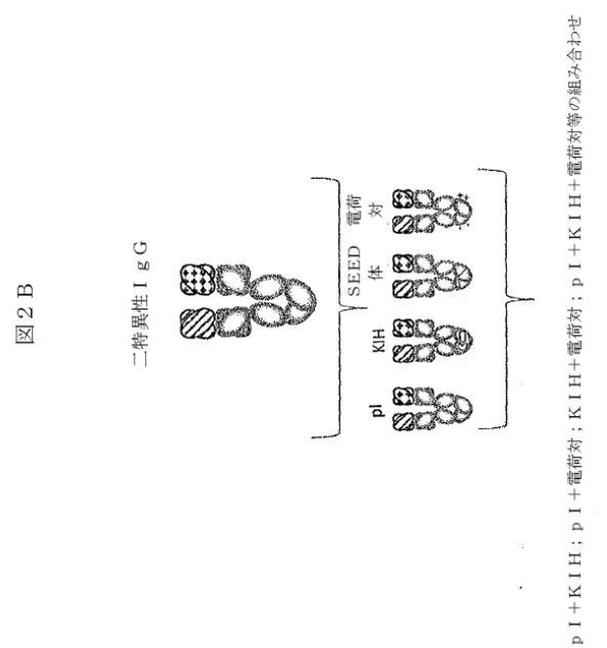
10

20

【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】

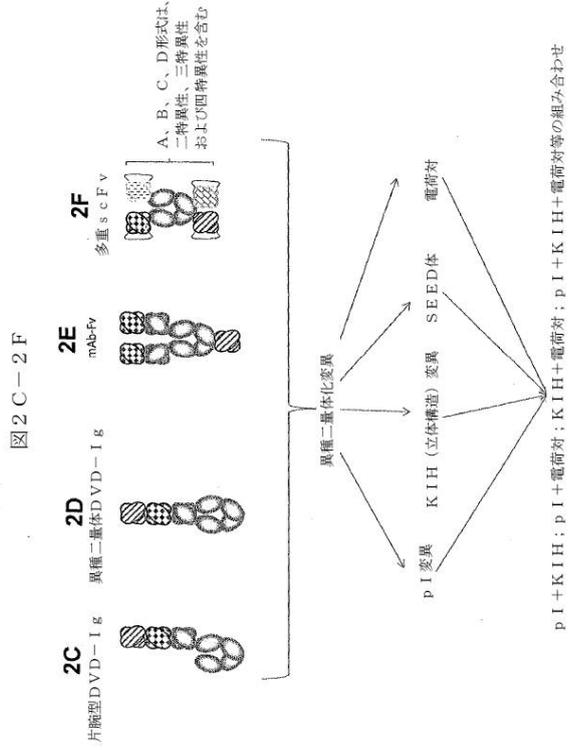


30

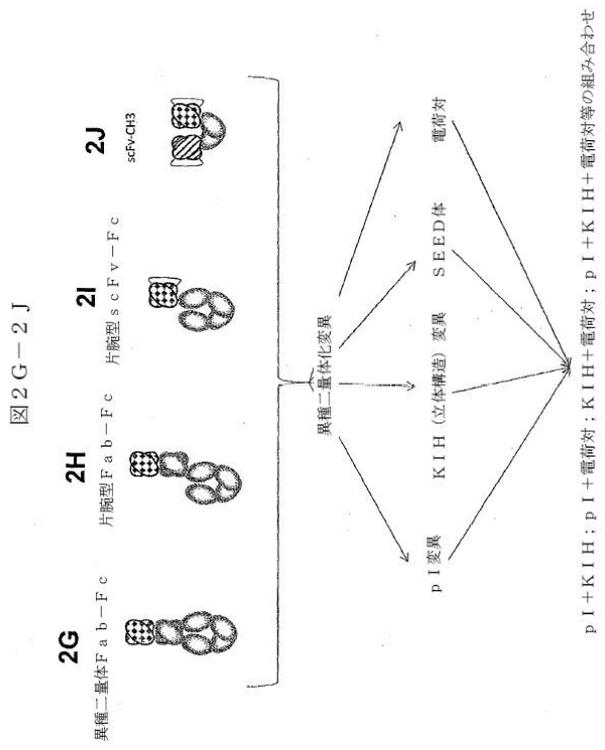
40

50

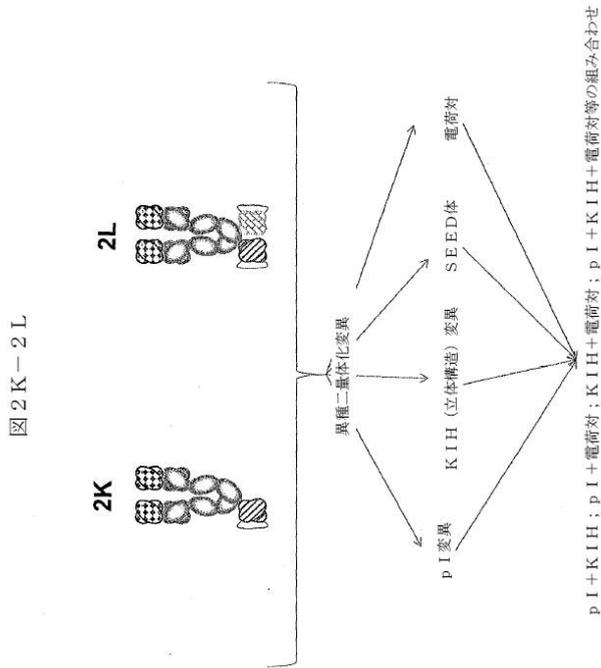
【 図 2 - 3 】



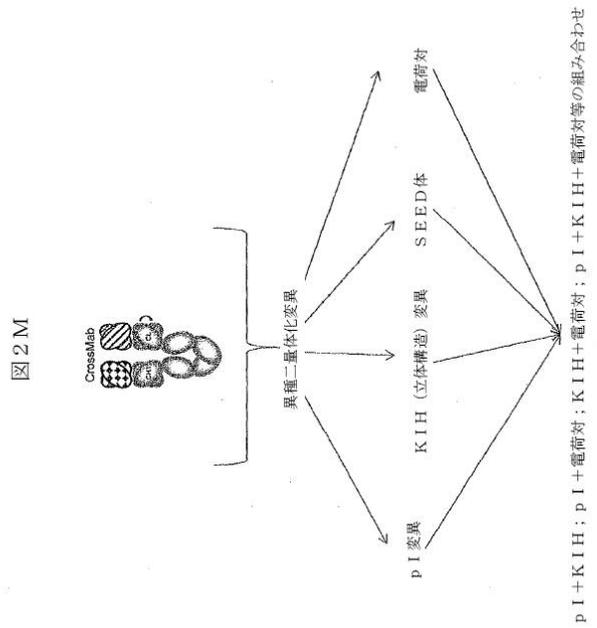
【 図 2 - 4 】



【 図 2 - 5 】



【 図 2 - 6 】



10

20

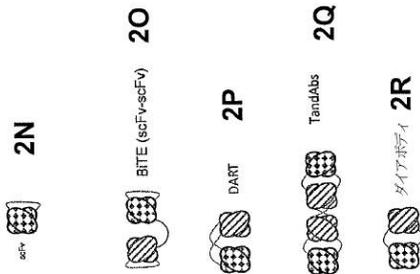
30

40

50

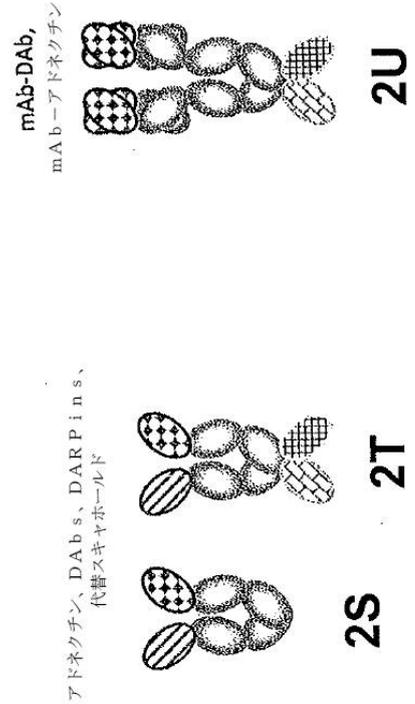
【 2 - 7 】

2N-2R



【 2 - 8 】

2S-2U



10

20

【 3 - 1 】

3A

モノマー 1	モノマー 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364F	Y349K
S364H	K370G
S364I	Y349K
S364J	Y349T
S364K	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L351K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357Q/S354K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q

【 3 - 2 】

3B

モノマー 1	モノマー 2
K370S	S364K/E357Q
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
T411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411E/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K

30

40

50

【 図 3 - 3 】

図 3 C

モノマー 1	モノマー 2
L388E/K370T/Q347E/E357L	S364K
L388E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401R/T411R
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
Y407T	T394W
F405A	T394W
T366Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K362D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S409R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447	Q196K/I199T/N276K
I199T N203D K247Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447	
N208D Q295E N384D Q418E N421D	
N208D Q295E Q418E N421D	
Q196K I199T P217R P228R N276K	
Q196K I199T N276K	
E269Q E272Q E283Q E357Q	
E269Q E272Q E283Q	
E269Q E272Q	
E269Q E283Q	
E272Q E283Q	
E289Q	

【 図 4 - 1 】

図 4 A

モノマー 1	モノマー 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/F411E
L361E/S364D	Y349K/L351K
L361E/S364E	Y349K/L351K
L361E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/F411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/F411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K

10

20

【 図 4 - 2 】

図 4 B

モノマー 1	モノマー 2
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
T411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411E/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368D/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357L	S364K

【 図 4 - 3 】

図 4 C

モノマー 1	モノマー 2
L368E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401K/T411K
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447	Q196K/I199T/N276K

30

40

50

【 図 5 】

図 5

モノマー 1	モノマー 2
Y407T	T366Y
F405A	T394W
T3691F/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E

【 図 6 】

図 6

変異定常領域	置換
pl_ISO (-)	I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447
pl_(-)_ 等配電子 _A	N208D Q295E N384D Q418E N421D
pl_(-)_ 等配電子 _B	N208D Q295E Q418E N421D
pl_ISO (+RR)	Q196K I199T P217R P228R N276K
pl_ISO (+)	Q196K I199T N276K
pl_(+)_ 等配電子 _A	E269Q E272Q E283Q E357Q
pl_(+)_ 等配電子 _B	E269Q E272Q E283Q
pl_(+)_ 等配電子 _E269Q/E272Q	E269Q E272Q
pl_(+)_ 等配電子 _E269Q/E283Q	E269Q E283Q
pl_(+)_ 等配電子 _E272Q/E283Q	E272Q E283Q
pl_(+)_ 等配電子 _E269Q	E269Q

10

20

【 図 7 】

図 7

変異	変異 (複数含む)、対照
G236R	P329K
S239G	A330L
S239K	A330S/P331S
S239Q	I332K
S239R	I332R
V266D	V266D/A327Q
S267K	V266D/P329K
S267R	S267R/A327Q
H268K	S267R/P329K
E269R	G236R/L328R
Z99R	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K
Z99K	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
K322A	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G
A327G	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G
A327L	E233P/L234V/L235A/G236del
A327N	
A327Q	
L328E	
L328R	
P329A	
P329H	

【 図 8 】

図 8

XENP	VH ID	VL ID	VH置換	VL置換
12912	H1.79	L1.48	G44C	G100C
13701	H1.80	L1.49	Q105C	S43C
13702	H1.81	L1.50	Y100BC	G49C
13703	H1.81	L1.51	Y100BC	G50C
13704	H1.82	L1.51	D100C	G50C
13705	H1.83	L1.52	A101C	G46C
13706	H1.84	L1.53	Q39C	Q38C
13707	H1.85	L1.54	V89C	K42C
13708	H1.86	L1.55	V100CC	K53C
13709	H1.83	L1.56	A101C	A55C

30

40

50

【 図 9 】

図 9

正荷電 s c F v リンカー

名称	配列	長さ	荷電	配列番号:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGSGGGGS	15	0	
Whitlowリンカー	GSTSGGKPGSGEGSTKG	18	+1	
6pax_A_1(+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	
+B	GKGGSGKGGSGKGGGS	15	+3	
+C	GGKSGGKGGSGKGGGS	15	+3	
+D	GGKSGGKGGSGGGKS	15	+3	
+E	GKGGSGKGGSGKGGKS	15	+6	
+F	GGKSGGKGGSGKGGGS	15	+3	
+G	GKPGSGKPGSGKPGGS	15	+3	
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGGS	20	+4	
+I	GKGGSGKGGSGKGGSGKGGKS	20	+8	

負荷電 s c F v リンカー

名称	配列	長さ	荷電
Gly-Ser 15	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	20	0
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4
-B	GEGSGEGSGEGGS	15	-3
-C	GEGSGEGSGEGGS	15	-3
-D	GEGSGEGSGEGGS	15	-3
-E	GEGSGEGSGEGGS	15	-6
-F	GEGSGEGSGEGGS	15	-3
-G	GEGSGEGSGEGSGEGGS	20	-8

【 図 1 0 - 1 】

図 1 0 A

異種二量体化変異

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	変異
196	Q	Q	Q	K	K
199	I	T	T	T	T
203	N	D	N	D	D
217	P	R	L	S	R
220	C	C	P	G	E,R (IgG2)
221	D	-	LGD	-	E,R (IgG1)
222	K	V	T	-	E,R (IgG2)
223	T	-	T	-	D,E,R,K
225	T	-	T	P	D,E,R,K
228	P	P	RCPEPK SCDTPP PCPRCP EPKSCD TPFPFC RCPEPK SCDTPP PCPR	S	D,E,R,K
247	P	P	P	P	Q
276	N	N	K	N	K
340	K	K	K	K	E,Q
345	E	E	E	E	K
	Q	Q	Q	Q	E,K,R
349	Y	Y	Y	Y	A,C,D,E,I,K,S,T,W
350	T	T	T	T	I
351	L	L	L	L	E,K,V,Y
354	S	S	S	S	C
355	R	R	R	Q	E,Q
356	D	E	E	E	K,L,R
357	E	E	E	E	K,R,Q,T
	K	K	K	K	D,E
362	Q	Q	Q	Q	E,K
	S	S	S	S	C,D,E,F,G,H,K,R,T,Y
366	T	T	T	T	A,D,I,K,L,M,S,V,W,Y
	L	L	L	L	A,D,E,K,S ほとんど C,P
370	K	K	K	K	C,D,E,G,R,S,T,V ほとんど C,P
371	G	G	G	G	D
384	N	N	S	N	S
390	N	N	N	N	D,E,K,R
392	K	K	N	K	C,D,E,F,L,M,N
394	T	T	T	T	F,S,V,W,Y

10

20

【 図 1 0 - 2 】

図 1 0 B

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	変異
395	P	P	P	P	T,V
396	P	P	P	P	T,V
397	V	M	M	V	M,S,T
399	D	D	D	D	ほとんど C,P C,K,R
400	S	S	S	S	A,D,E,K,R
401	D	D	D	D	K,N,R
405	F	F	F	F	L,ほとんど C,P A,F,L,M,S,T,V
407	Y	Y	Y	Y	T,V ほとんど C,P A,L,M,V
409	K	K	K	R	R ほとんど C,P D,E,F,K,L,M,V,W
419	T	T	T	T	E
439	Q	Q	Q	E	E
	K	K	K	K	D,E

【 図 1 1 】

図 1 1

異種二量体形式への変異の組み合わせ

異種二量体形式	FcRm変異モノマー1 ー1および/ またはモノマー2	Fc変異モノマー1 および/ またはモノマー2	pI変異	立体構造変異 (電荷対を 含む)	組み合わせ (凡例Eを参照のこと)
*抗体型 scFv-Fab-Fc ( 図 11B)	凡例Aを参照のこと	凡例Aを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
三量体抗体型 ( 図 11A, 12Bおよび12D)	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
二量体抗体型 Fab-Fv-scFv; 図 13A	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
三量体抗体型 Fab-Fv-scFv; 図 14B	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
三量体抗体型 Fab-Fv-scFv; 図 15C	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
三量体抗体型 Fab-Fv-Fab; 図 16D	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)
三量体抗体型 Fab-Fv-Fab; 図 17E	凡例Aを参照のこと	凡例Bを参照のこと	凡例Cを参照のこと	凡例Dを参照のこと	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9) and 10)

30

40

50

【 図 1 2 - 1 】

図 1 2 A

F c 異種二量体化に有利な好ましい立体構造変異

モノマー 1	モノマー 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L361K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K
Y349T	S364H
T394F	F405A
Y349T/T394F	S364H/F405A
K370E	T411K
K370E/T411D	T411K
K370E/T411E	K370R/T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T411E	S364H/D401K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K

【 図 1 2 - 2 】

図 1 2 B

F c 異種二量体化に有利な特に好ましい立体構造変異

変異 1	変異 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	Y349K
S364H	Y349T
L351K	L351E
D401K	T411E
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K
Y349T	S364H
T394F	F405A
Y349T/T394F	S364H/F405A
K370E	T411K
K370E/T411D	T411K
K370E/T411E	K370R/T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T411E	S364H/D401K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K

10

20

【 図 1 2 - 3 】

図 1 2 C

F c 異種二量体化に有利な好ましい立体構造変異

モノマー 1	モノマー 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L361K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K
Y349T	S364H
T394F	F405A
Y349T/T394F	S364H/F405A
K370E	T411K
K370E/T411D	T411K
K370E/T411E	K370R/T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T411E	S364H/D401K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K

【 図 1 2 - 4 】

図 1 2 D

モノマー 1	モノマー 2
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
L368E/K370S	S364K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q
L368E/K370S	S364K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q

30

40

50

【 図 1 2 - 5 】

図 1 2 E

モノマー 1	モノマー 2
ISO (←) 側	ISO (→) または ISO (↑+R) 側
T411E	D401K
T411E K360D	D401K
T411E K360E	D401K
T411E Q362E	D401K
T411E N390D	D401K
T411E	D401K Q347K
T411E	D401K Q347R
T411E K360D Q362E	D401K
T411E K360E Q362E	D401K
T411E K360E N390D	D401K
T411E Q362E N390D	D401K
T411E Q347R	D401K K360D
T411E Q347R	D401K K360E
T411E K360	D401K Q347K
T411E K360D	D401K Q347R
T411E K360E	D401K Q347K
T411E K360E	D401K Q347R
T411E S364K	D401K K370S
T411E K370S	D401K S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q Q362K
K360D Q362E	Q347R
K360D Q362E	D401K
K360D Q362E	Q347R D401K
K360E Q362E	Q347R
K360E Q362E	D401K
K360E Q362E	Q347R D401K
Q362E N390D	D401K
Q347E K360D	D401N
K360D	Q347R N390K
K360D	N390KD401N
K360E	Y349H
K370S Q347E	S364K
K370S E357L	S364K
K370S E357Q	S364K
K370S Q347E E357L	S364K
K370S Q347E E357Q	S364K
L368D K370S Q347E	S364K
L368D K370S E357L	S364K
L368D K370S E357Q	S364K
L368D K370S Q347E E357L	S364K
L368D K370S Q347E E357Q	S364K
L368E K370S Q347E	S364K
L368E K370S E357L	S364K
L368E K370S E357Q	S364K
L368E K370S Q347E E357L	S364K
L368E K370S Q347E E357Q	S364K
L368D K370T Q347E	S364K
L368D K370T E357L	S364K
L368D K370T E357Q	S364K

【 図 1 2 - 6 】

図 1 2 F

モノマー 1	モノマー 2
L368D K370T Q347E E357L	S364K
L368D K370T Q347E E357Q	S364K
L368E K370T Q347E	S364K
L368E K370T E357L	S364K
L368E K370T E357Q	S364K
L368E K370T Q347E E357L	S364K
L368E K370T Q347E E357Q	S364K
T411E Q362E	D401K T411K
T411E N390D	D401K T411K
T411E Q362E	D401R T411R
T411E N390D	D401R T411R

10

20

【 図 1 2 - 7 】

図 1 2 G

XENP	異種二量体-ねじれ 変異、鎖 1	異種二量体-ねじれ 変異、鎖 2	異種二量体 産生量 (%)	CH3 Tm (°C)
12757	無し	無し	52.7	83.1
12758	L368D/K370S	S364K	94.4	76.6
12759	L368D/K370S	S364K/E357L	90.2	77.2
12760	L368D/K370S	S364K/E357Q	95.2	77.5
12761	T411E/K360E/Q362E	D401K	85.6	80.6
12496	L368E/K370S	S364K	91.5	n.d.
12511	K370S	S364K	59.9	n.d.
12840	L368E/K370S	S364K/E357Q	59.5	n.d.
12841	K370S	S364K/E357Q	90.4	n.d.
12894	L368E/K370S	S364K	41.0	n.d.
12895	K370S	S364K	49.3	n.d.
12896	L368E/K370S	S364K/E357Q	73.9	n.d.
12901	K370S	S364K/E357Q	87.9	n.d.

【 図 1 2 - 8 】

図 1 2 H

好ましい異種二量体化変異

Fcモノマー 1 置換	Fcモノマー 2 置換
Y407T	T368Y
F405A	T394W
T368Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T368W
T368S/L368A/Y407V	T368W
T368S/L368A/Y407V/Y349C	T368W/S354C
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
Y349T	S364H
T394F	F405A
Y349T/T394F	S364H/F405A
K370E	T411K
K370E/T411D	T411K
K370E/T411E	K370R/T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T411E	S364H/D401K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/ K392N/V397M/Q419E/K447_ (K447の 欠乏)	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/ K392N/V397M/Q419E/K447	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T368I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T368V/K409F	L351Y/Y407A
T368A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
Y349T	S364H
T394F	F405A
Y349T/T394F	S364H/F405A
K370E	T411K
K370E/T411D	T411K
K370E/T411E	K370R/T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T411E	S364H/D401K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R

30

40

50

















【 14 - 30 】

14DD

XENP12113 H1\_L1\_38

配列番号 235.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 236.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 237.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 238.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

XENP12114 H1\_L1\_39

配列番号 239.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 240.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 241.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 242.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

【 14 - 32 】

14FF

XENP12133 H1.32\_L1.4

配列番号 251.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 252.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 253.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 254.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

XENP12134 H1.33\_L1.4

配列番号 255.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 256.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 257.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 258.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

【 14 - 31 】

14EE

XENP12131 H1.30\_L1.4

配列番号 243.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 244.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 245.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 246.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

XENP12132 H1.31\_L1.4

配列番号 247.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 248.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 249.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 250.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

【 14 - 33 】

14GG

XENP12135 H1.34\_L1.4

配列番号 259.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 260.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 261.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 262.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

XENP12136 H1.35\_L1.4

配列番号 263.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 264.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 265.

EVQLVESGGGLVQP... TISRDDSKNTLYLQMN...

配列番号 266.

QAVVTQEP... GKAAITLSGAQPEDEAE...

10

20

30

40

50

【 14 - 34 】

14HH

XENP12137 H1.36\_L1.4

配列番号 267.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 268.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 269.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 270.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

XENP12138 H1.37\_L1.4

配列番号 271.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 272.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 273.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 274.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

【 14 - 36 】

14JJ

XENP12213 H1.30\_L1.40

配列番号 283.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 284.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 285.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 286.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

XENP12214 H1.8\_L1.40

配列番号 287.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 288.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 289.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 290.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

【 14 - 35 】

14II

XENP12139 H1.37\_L1.32

配列番号 275.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 276.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 277.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 278.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

XENP12149 H1\_L1.40

配列番号 279.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 280.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 281.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 282.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

【 14 - 37 】

14KK

XENP12215 H1.39\_L1.40

配列番号 291.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 292.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 293.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 294.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

XENP12216 H1.40\_L1.40

配列番号 295.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 296.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGG

配列番号 297.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
SRDSDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

配列番号 298.
QAVVTQEP...
GKAALTL...
GKAALTL...

10

20

30

40

50





【 14 - 46 】

14TT

XENP12233 H1.30\_L1.45

配列番号 363.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 364.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 365.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 366.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

XENP12234 H1.8\_L1.45

配列番号 367.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 368.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 369.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 370.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

【 14 - 48 】

14VV

XENP12237 H1.30\_L1.46

配列番号 379.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 380.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 381.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 382.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

XENP12238 H1.8\_L1.46

配列番号 383.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 384.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 385.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 386.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

【 14 - 47 】

14UU

XENP12235 H1.39\_L1.45

配列番号 371.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 372.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 373.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 374.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

XENP12236 H1.40\_L1.45

配列番号 375.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 376.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 377.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 378.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

【 14 - 49 】

14WW

XENP12239 H1.39\_L1.46

配列番号 387.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 388.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 389.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 390.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

XENP12240 H1.40\_L1.46

配列番号 391.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 392.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 393.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS...
TISRDDS...
QAVVTQEP...
GKAALTI...

配列番号 394.
QAVVTQEP...
GKAALTI...

10

20

30

40

50







【 図 17 - 1 】

図 17 A

XENP13124=428L/434S無し; XENP13681=428L/434S有り

scFvモノマー (+)	Fabモノマー (-)
異種二量体 p I 変異 S364K/E357Q	異種二量体化 p I 変異 L368D/K370S
scFv荷電リンカー(GKPGS)4	等配電子 p I 置換 N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
FcRnに対して、±428L/434S	FcRnに対して、±428L/434S
CD3 scFvは、SP34 H. 130 L1. 47 (+荷電リンカー) である	標的抗原 (たとえば、CD19を含む) に対する Fv 配列

2.

scFvモノマー	Fabモノマー
異種二量体 p I 変異 S364K/E357Q	異種二量体化 p I 変異 L368D/K370S
scFv荷電リンカー(GKPGS)4	p I 置換 I199T N203D K274Q R355Q Q419E K447del
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
FcRnに対して、±428L/434S(任意)	FcRnに対して、±428L/434S(任意)
CD3 scFvは、SP34 H. 130 L1. 47 (+荷電リンカー) である	標的抗原 (たとえば、CD19を含む) に対する Fv 配列

【 図 17 - 3 】

図 17 C

XENP13681 scFv-Fc HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLT  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYA  
 NWWVQKPGKSPRGLGGTNRAPGVPARFSGSLGGKAALTSGAQPEDEADYYCALWYS  
 NHWVFGGKTLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHSHYTKLSL  
 LSPGK

XENP13681 Fab-Fc HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 NEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDYAVYVCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVS  
 SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEYIN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 EQGDVFCSCVMHEALHSHYTKLSLSPGK

XENP13124, XENP13681 LC

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLN  
 SGVPPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDYSTYL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 図 17 - 2 】

図 17 B

XENP13124 scFv-Fc HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLT  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYA  
 NWWVQKPGKSPRGLGGTNRAPGVPARFSGSLGGKAALTSGAQPEDEADYYCALWYS  
 NHWVFGGKTLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHSHYTKLSL  
 LSPGK

XENP13124 Fab-Fc HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 NEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDYAVYVCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVS  
 SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEYIN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 EQGDVFCSCVMHEALHSHYTKLSLSPGK

【 図 18 】

図 18

XEN13124 抗CD19x抗CD3 Fab-Fv-Fc [抗CD3HC]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLT  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYA  
 NWWVQKPGKSPRGLGGTNRAPGVPARFSGSLGGKAALTSGAQPEDEADYYCALWYS  
 NHWVFGGKTLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHSHYTKLSL  
 LSPGK (配列番号: 461)

XEN13124 抗CD19x抗CD3 Fab-Fv-Fc [抗CD19HC]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYAT  
 NEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDYAVYVCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVS  
 SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEYIN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 EQGDVFCSCVMHEALHSHYTKLSLSPGK (配列番号: 462)

XEN13124 抗CD19x抗CD3 Fab-Fv-Fc [抗CD19LC]

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLN  
 SGVPPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDYSTYL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 463)

10

20

30

40

50

【 図 19 - 1 】

図 19 A

安定化抗 CD 19 可変領域

融点 (Tm) は、0.2 mg/mL の濃度で D S F により測定された

Table with 5 columns: 変異, 置換, Tm, ΔTm. Lists various amino acid substitutions and their corresponding melting point changes.

【 図 19 - 2 】

図 19 B

安定化抗 CD 19 可変領域

融点 (Tm) は、0.4 mg/mL の濃度で D S F により測定された

Table with 5 columns: 変異, 置換, Tm, ΔTm. Lists specific amino acid substitutions and their corresponding melting point changes.

10

20

30

40

50

【 図 20 - 1 】

図 20 A

安定化抗 CD 19 s c F v 変異

4G7\_H1.52\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.52\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.52\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.52\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.155\_H1.52\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.155\_H1.52\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.155\_H1.52\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.155\_H1.52\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.211\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.211\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.211\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.211\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.212\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.212\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.212\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.212\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

【 図 20 - 2 】

図 20 B

4G7\_H1.213\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.213\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.213\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.213\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.214\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.214\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.214\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.214\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.215\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.215\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.215\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.215\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

4G7\_H1.216\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.216\_L1.155\_scFv\_6X-His)

4G7\_H1.216\_L1.155\_scFv\_Hi 無し

EVQLVESGGGLV... (Sequence for 4G7\_H1.216\_L1.155\_scFv\_Hi 無し)

50

【 20 - 3 】

図 20 C

4G7\_H1.217\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.217\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.218\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.218\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.219\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.219\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.221\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
RSEDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.221\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
RSEDTAMYYCARGT...

【 20 - 5 】

図 20 E

4G7\_H1.52\_L1.177\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.177\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.178\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.178\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.179\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.179\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.180\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.180\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

【 20 - 4 】

図 20 D

4G7\_H1.222\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.222\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.223\_L1.155\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.223\_L1.155\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.225\_L1.197\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.225\_L1.197\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.176\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.176\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

【 20 - 6 】

図 20 F

4G7\_H1.52\_L1.181\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.181\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.182\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.182\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.183\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.183\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.184\_scFv\_6X-His

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

4G7\_H1.52\_L1.184\_scFv\_Hi

EVQLVESGGGLV...
SFDTAMYYCARGT...

10

20

30

40

50



【 図 2 0 - 1 1 】

図 2 0 K

4G7\_L1.198\_H1.226\_20AAリナー scFv His無し

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS

4G7\_L1.198\_H1.227\_20AAリナー scFv 6X-His

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSSGSHHHH  
HH

4G7\_L1.198\_H1.227\_20AAリナー scFv His無し

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS

4G7\_L1.200\_H1.227\_20AAリナー scFv 6X-His

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSSGSHHHH  
HH

4G7\_L1.200\_H1.227\_20AAリナー scFv His無し

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS

【 図 2 1 】

図 2 1

安定化抗CD19 Fv変異

VH(4G7\_H1.227)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSR  
SEDTAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS

VL(4G7\_L1.198)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIK

VL(4G7\_L1.199)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIK

10

【 図 2 2 - 1 】

図 2 2 A

安定化抗CD19可変領域を有する二重-s c F v変異

4G7\_L1.199\_H1.227\_20AAリナー scFv\_SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1 pl ISO(-) pl ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R

重鎖 1 (4G7\_L1.199\_H1.227\_20AAリナー scFv-Fc(216)\_IgG1 pl ISO(-)\_C2205/G236R/L328R)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFA  
VYYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAP  
GGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
E MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYNTPPMLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQEGNWFSCVMHEALHN  
HHTQKLSLSPG

重鎖 2 (SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1 pl ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFTYAMNHWVRQAPGKGLVWGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSD  
KNTLYLQMNLSRAEDTAVYCVRHGNGFNSVWFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSTLV  
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGKAALTSQAQPEDEAEYCY  
ALWYNSLWVFGGKTLVLERKSSDKTHTCPRCPAPPELLRGPVFLPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVKFK  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS  
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYKTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEAL  
HNTQKLSLSPGK

【 図 2 2 - 2 】

図 2 2 B

4G7\_H1.227\_L1.198\_20AAリナー scFv\_SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1 pl ISO(-) pl ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_L1.198\_20AAリナー scFv-Fc(216)\_IgG1 pl ISO(-)\_C2205/G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST  
AYMELSSRSEDATAVYCARGTYYGTRVFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSL  
SPGERATISCRSSKSLQVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLSGVVDRFSGSGGTEFTLTISLSEDPFAVYYCM  
QHLEYPITFGGGTKLEIKPKSSDKTHTCPCPAPPELLRGPVFLPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVQFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
E MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYNTPPMLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQEGNWFSCVMHEALHN  
HHTQKLSLSPG

重鎖 2 (SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1 pl ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFTYAMNHWVRQAPGKGLVWGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSD  
KNTLYLQMNLSRAEDTAVYCVRHGNGFNSVWFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSTLV  
SPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGKAALTSQAQPEDEAEYCY  
ALWYNSLWVFGGKTLVLERKSSDKTHTCPCPAPPELLRGPVFLPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVKFK  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS  
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYKTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEAL  
HNTQKLSLSPGK

20

30

40

50

【 2 3 - 1 】

図 2 3 A

安定化抗CD19Fv sを有する栓抜き型変異

4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_pl\_ISO(-)-pl\_ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R

重鎖1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl\_ISO(-)\_G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTYYTRFDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL...

重鎖2 (SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_pl\_ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPGKGLVWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNSVWFAYWGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGSAVVTQEPSTLVS...

軽鎖 (4G7\_L1.199)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPPDRFSGSGSGETFTLISLEPEDFAVYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

【 2 3 - 2 】

図 2 3 B

4G7\_H1.227\_L1.198\_Fab-SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_pl\_ISO(-)-pl\_ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R

重鎖1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl\_ISO(-)\_G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTYYTRFDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL...

重鎖2 (SP34\_H1L1.4\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_pl\_ISO(+RR)\_C2205/G236R/L328R)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPGKGLVWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNSVWFAYWGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGSAVVTQEPSTLVS...

軽鎖 (4G7\_L1.198)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRMSNLNSGVPPDRFSGSGSGETFTLISLEPEDFAVYCMQHLEYPITFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

10

【 2 4 - 1 】

図 2 4 A

XENP4547 (ヘバシズマブ-アハチン-IgG1 WT)

重鎖 (ヘバシズマブ-アハチン-WT-IgG1重鎖)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGMNWRQAPGKGLVWGWINTYTGEPYAADFKRRFFSLDTSKSTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY...

軽鎖 (ヘバシズマブアハチンL0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSAQDISNLYNQKPGKAPKVLIVFTSSLSHGVPFRFSGSGSGETFTLISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

XENP12774 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A)

重鎖 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGMNWRQAPGKGLVWGWINTYTGEPYAADFKRRFFSLDTSKSTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY...

軽鎖 (ヘバシズマブアハチンL0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSAQDISNLYNQKPGKAPKVLIVFTSSLSHGVPFRFSGSGSGETFTLISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

【 2 4 - 2 】

図 2 4 B

XENP12775 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_B)

重鎖 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_B)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGMNWRQAPGKGLVWGWINTYTGEPYAADFKRRFFSLDTSKSTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY...

軽鎖 (ヘバシズマブアハチンL0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSAQDISNLYNQKPGKAPKVLIVFTSSLSHGVPFRFSGSGSGETFTLISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

XENP12776 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_A)

重鎖 (ヘバシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_A)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGMNWRQAPGKGLVWGWINTYTGEPYAADFKRRFFSLDTSKSTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY...

軽鎖 (ヘバシズマブアハチンL0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSAQDISNLYNQKPGKAPKVLIVFTSSLSHGVPFRFSGSGSGETFTLISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS...

20

30

40

50



【 図 2 4 - 7 】

図 2 4 G

XENP12878 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(-)\_等配電子\_B\_pl(+)\_等配電子\_A)  
 重鎖 1 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(-)\_等配電子\_B)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

重鎖 2 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_A)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

XENP12879 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(-)\_等配電子\_B\_pl(+)\_等配電子\_B)  
 重鎖 1 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(-)\_等配電子\_B)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

重鎖 2 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_B)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

XENP12948 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E272Q/E283Q)  
 重鎖 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E272Q/E283Q)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNMGVWVRRQAPGKLEWVGVWINTYGEPTYAADFRRFTSLDTSKS  
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGLVKDY  
 FPEPVTYVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC

【 図 2 4 - 9 】

図 2 4 I

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

軽鎖 ( ベンシズマブ\_アミンA)  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNLYNYYQKPKGKPKVLIYFTSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPE  
 DFAQYTCQYQYVTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSFIHPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWVVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKSTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

XENP12951 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q)  
 重鎖 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNMGVWVRRQAPGKLEWVGVWINTYGEPTYAADFRRFTSLDTSKS  
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGLVKDY  
 FPEPVTYVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC

軽鎖 ( ベンシズマブ\_アミンA)  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNLYNYYQKPKGKPKVLIYFTSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPE  
 DFAQYTCQYQYVTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSFIHPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWVVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKSTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

XENP12952 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E272Q/E283Q)  
 重鎖 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E272Q/E283Q)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

【 図 2 4 - 8 】

図 2 4 H

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

軽鎖 ( ベンシズマブ\_アミンA)  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNLYNYYQKPKGKPKVLIYFTSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPE  
 DFAQYTCQYQYVTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSFIHPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWVVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKSTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

XENP12949 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E283Q)  
 重鎖 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E283Q)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNMGVWVRRQAPGKLEWVGVWINTYGEPTYAADFRRFTSLDTSKS  
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGLVKDY  
 FPEPVTYVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC

軽鎖 ( ベンシズマブ\_アミンA)  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNLYNYYQKPKGKPKVLIYFTSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPE  
 DFAQYTCQYQYVTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSFIHPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWVVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKSTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

XENP12950 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E272Q)  
 重鎖 ( ベンシズマブ\_IgG1\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E272Q)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNMGVWVRRQAPGKLEWVGVWINTYGEPTYAADFRRFTSLDTSKS  
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGLVKDY  
 FPEPVTYVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKDKKVEPKSCDKTHTCPPC

【 図 2 4 - 1 0 】

図 2 4 J

XENP12953 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E283Q)  
 重鎖 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E283Q)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

XENP12954 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E272Q)  
 重鎖 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q/E272Q)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

XENP12955 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q)  
 重鎖 ( 空 -Fc(216)\_IgG1\_C2205\_pl(+)\_等配電子\_E269Q)  
 EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

XENP13228 (467\_H1.227\_L1.199\_Fab-SP34\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_PVA\_/S267K\_pl(-)  
 )\_等配電子\_A\_WT-IgG1\_C2205)  
 重鎖 1 (467\_H1.227\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_PVA\_/S267K)  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNMGVWVRRQAPGKLEWVGVWINTYGEPTYAADFRRFTSLDTSKS  
 AYMEELLSRSEDVAVYYCARGTYGGYTRVFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGLVKDYFPEP  
 TVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHPKSDTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPV  
 AGPSVFLFPPKPKDLMISRTEPTVTCVVDVSHQDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK

10

20

30

40

50

【 図 2 4 - 1 1 】

図 2 4 K

重鎖 2 (SP34\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc[216]\_IgG1\_C220S/PVA\_/S267K)

EVQIVESGGGI VOPGGSI RISCASGFTSTYAMNWRQAPGKGI FWVGRIRSKYNNYAYDSVKGRFTISRDSDK
NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCYRHHGFDYSYWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSAVVTQPSLTVS
PGGTVTLTCGSSGAVTTSNYANWVQKQPKGKSPRGLIGTNKRAGVPPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCA
LWYNSHWVFGGGTKLVLEPKSSDKHTHTPCPPAPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVDVHKHDEPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQSLCLVCKGYPGSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMVHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

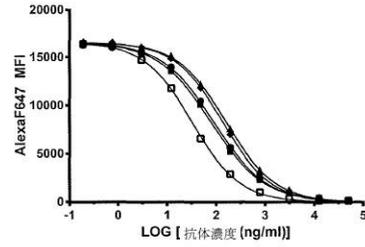
軽鎖 (4G7\_L1.199)

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKLNQVNGNTLYLWVQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTS
SLEPEDFAVYYCMQHLEVPITFGGGTKLEIKRVAAPSVFIPSPDEQLKSGTASVYVCLNNFYPREAKVQWYVDNALQS
GNSQSVTEQDSKSDYSLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 図 2 5 】

図 2 5

安定化抗CD19可変領域-標識抗CD19 IgG1 (1μg/mL)を用いた競合結合

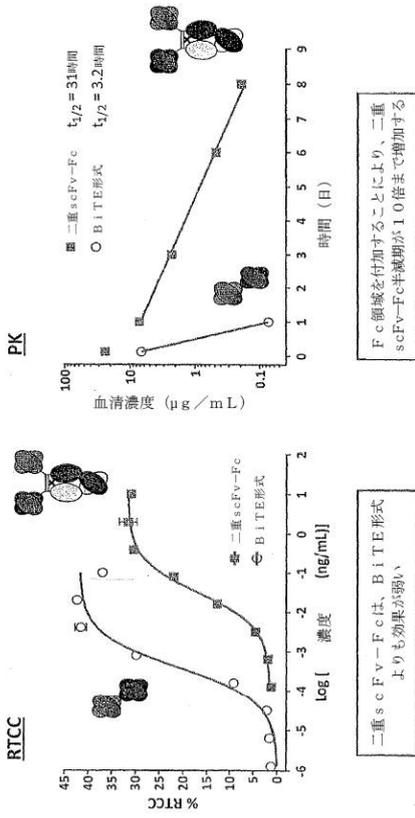


- Legend for Figure 25: 4G7\_H1.52\_L1.155\_scFv\_6X-His, 4G7\_L1.198\_H1.227\_20AA\_リンカー\_scFv\_6X-His, 4G7\_L1.199\_H1.227\_20AA\_リンカー\_scFv\_6X-His, 4G7\_L1.155\_H1.52\_scFv\_6X-His, 4G7\_H1.52\_L1.155\_20AA\_リンカー\_scFv\_6X-His

10

【 図 2 6 】

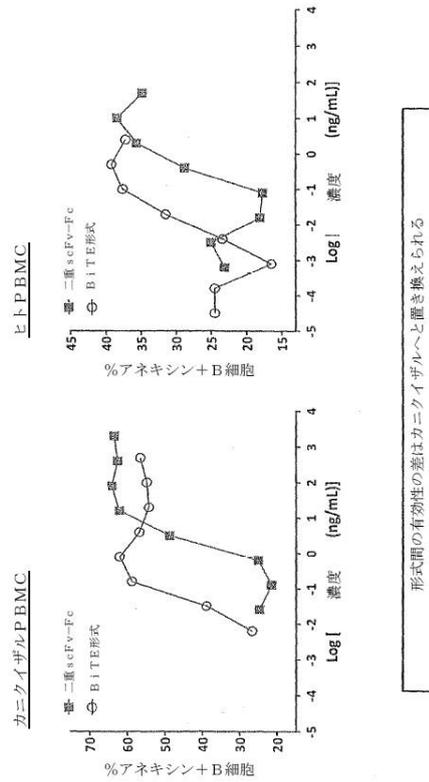
図 2 6



蛍光L2DH RTCCアッセイ (2.4時間)。1.0kのRaji細胞+400kのT細胞。E/T比は4.0:1。hFcRn Tg276半抗体BL/6マウスにおける2mg/kg IVボラス投与。2.4時間まで、BiTE形式に対する、6匹中、4匹のマウスのBLQ (<70ng/mL) 非コンバージョンメント解析により、Phoenix WinNonlin6. Iで測定された半減期

【 図 2 7 】

図 2 7



形式間の有効性の差はカニキイガルへと置き換えられる

20

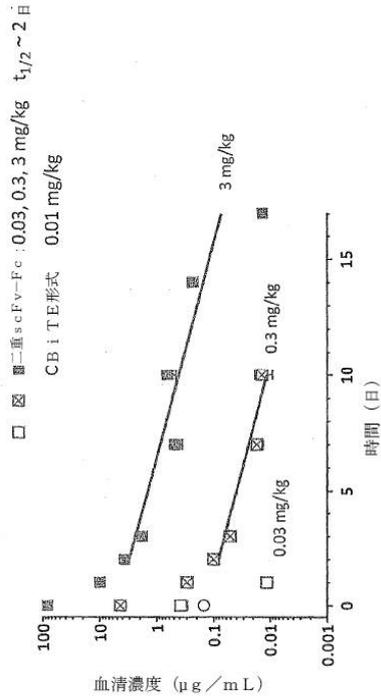
30

40

50

【 図 2 8 】

図 28

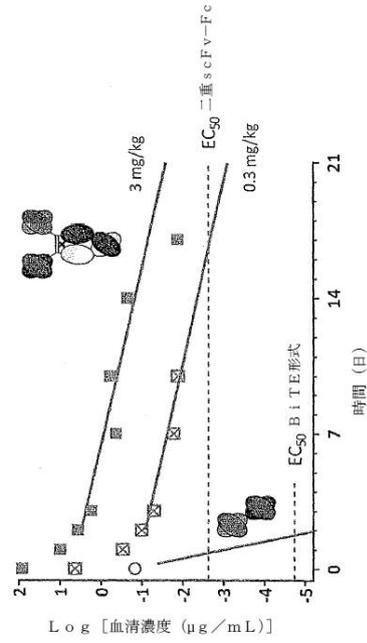


Fc領域の付加により半減期の延長がもたらされる

カニクイザル (n=3) における単回IVボース投与。  
24時間まで、BiTE形式に対する、3匹中のカニクイザルのBLQ (<2 ng/mL)  
非コンパートメント解析により、Phoenix WinNonlin6. Iで測定された半減期

【 図 2 9 】

図 29

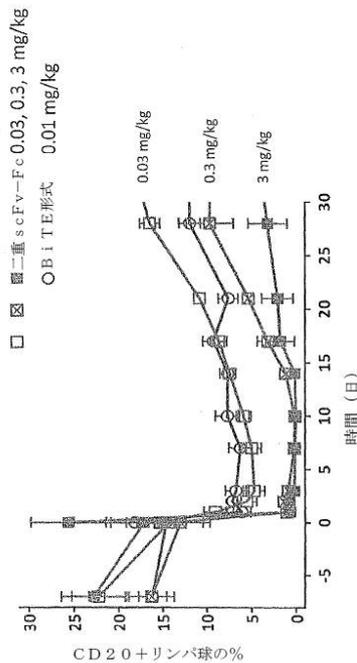


血清濃度が $>EC_{50}$ である期間は、BiTE形式よりも、二重s.c.Fv-Fcの方が長い  
(2~3日に対し、2~3週)

【 図 3 0 】

図 30

血清リンパ球分画における、CD20+細胞 (B細胞) の%



二重s.c.Fv-FcによってPKが延長することにより、B細胞の枯渇が14日まで延長される

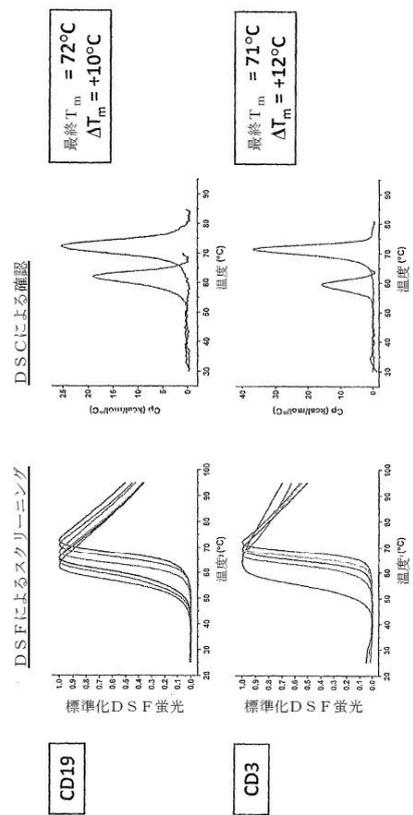
カニクイザル (n=3) における単回IVボース投与

【 図 3 1 】

図 31

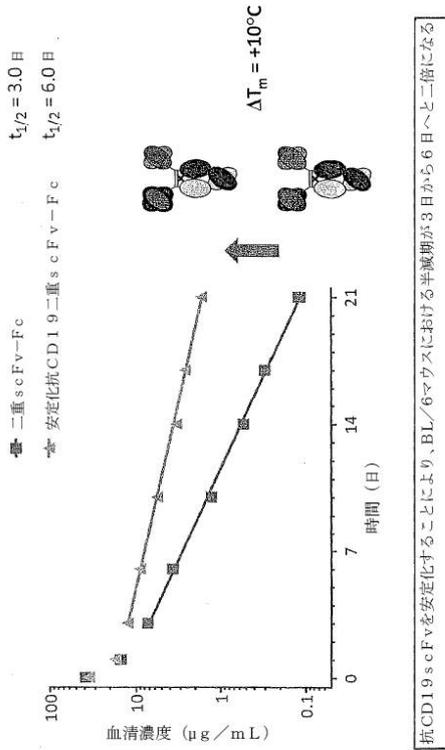
方法:

- 希少アミノ酸の特定/置換
- 独特な接頭基を有するアミノ酸の特定/置換
- リンカー操作
- VL-VH方向への転換



DSF: 0.2~0.9 mg/mLでのs.c.Fv (加熱速度1°C/分)  
DSC: 0.18~0.25 mg/mLでのs.c.Fv (加熱速度1.5°C/分)

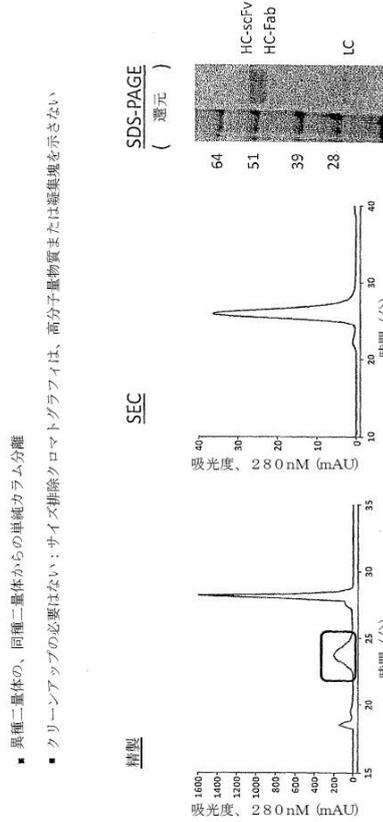
【 図 3 2 】



抗 CD19 scFv を安定化することにより、BL/6 マウスにおける半減期が 3 日から 6 日へと二倍になる

BL/6 マウス (n=5), 2mg/kg IV 投与。非コンパートメント解析により、Phoenix WinNonlin 6.1 で測定された半減期

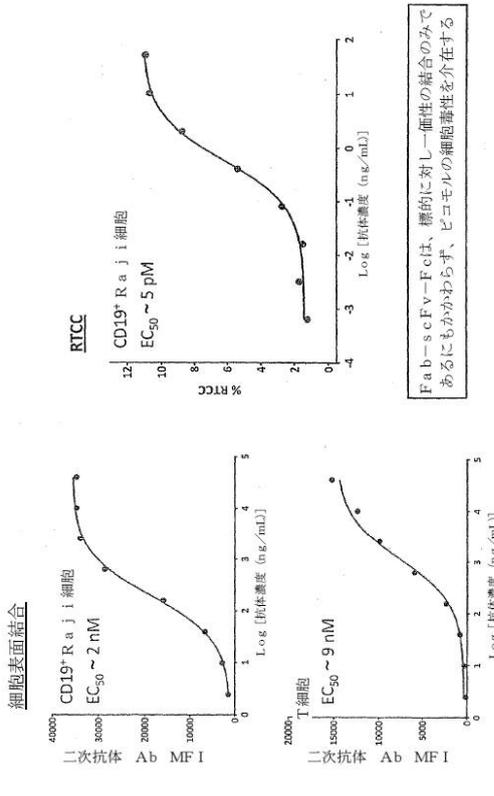
【 図 3 3 】



10

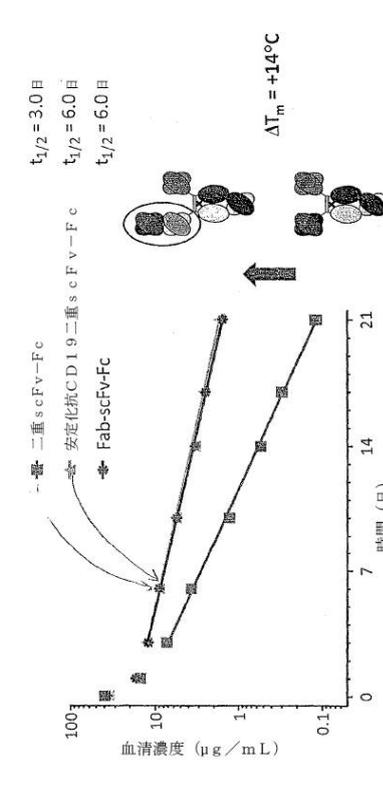
20

【 図 3 4 】



蛍光LDH RTCCアッセイ (24時間)。10kのRaji細胞+400kのT細胞。40:1のE:T比

【 図 3 5 】



抗 CD19 scFv を Fab と置換することにより、BL/6 マウスにおける半減期が 3 日から 6 日へと二倍になる

BL/6 マウス (n=5), 2mg/kg IV 投与。非コンパートメント解析により、Phoenix WinNonlin 6.1 で測定された半減期

30

40

50

【 図 3 6 】

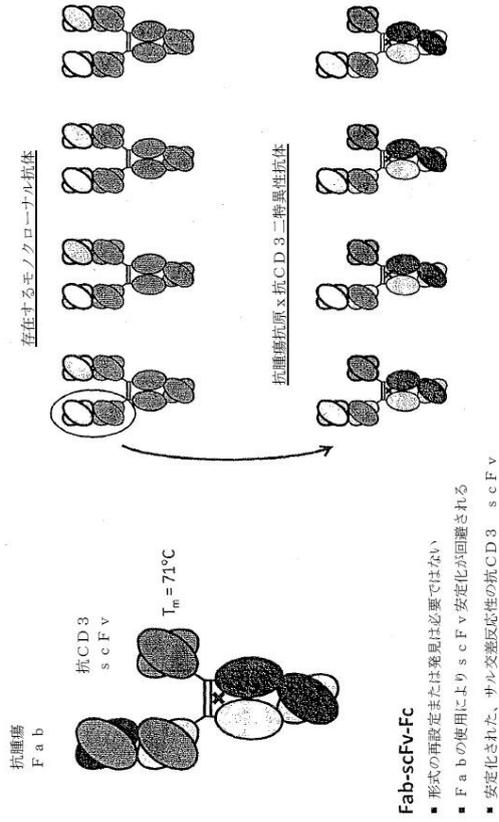


図 3 6

【 図 3 7 - 1 】

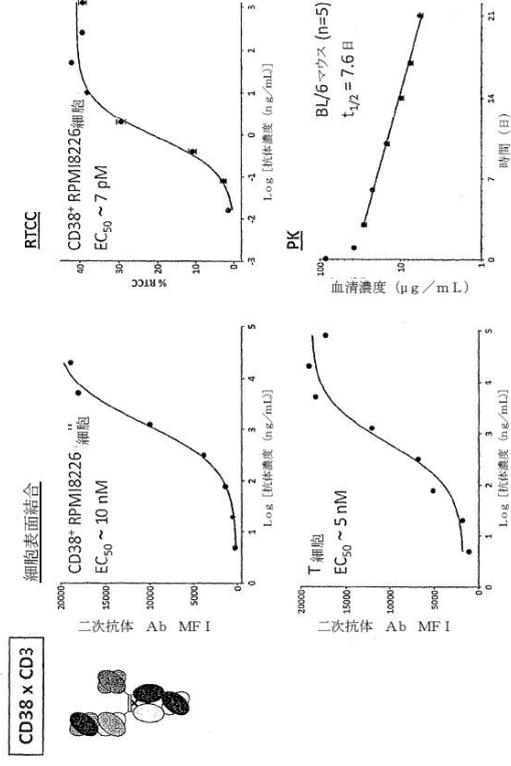


図 3 7 A

10

20

【 図 3 7 - 2 】

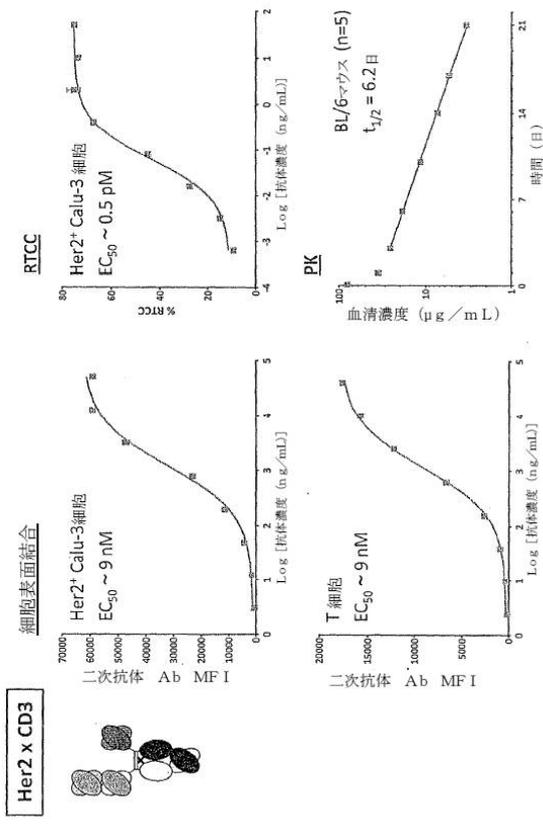


図 3 7 B

【 図 3 8 】

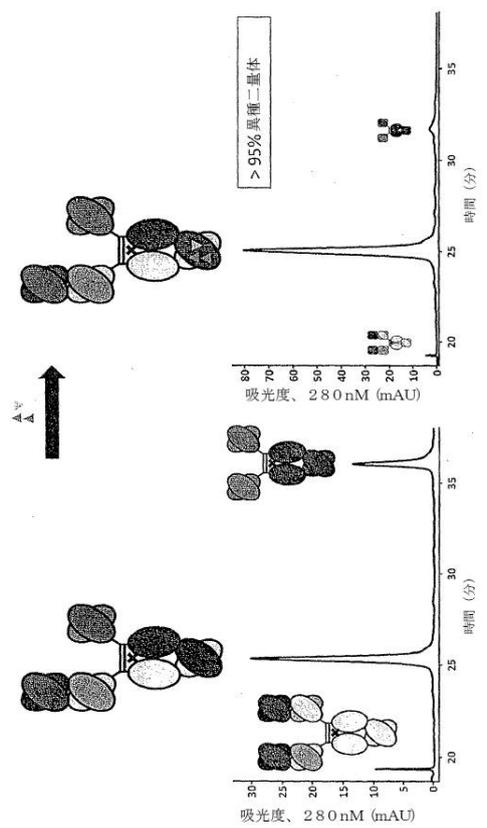


図 3 8

30

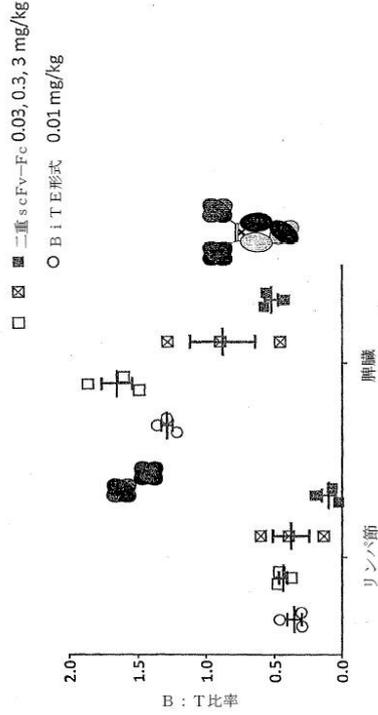
40

50

【 図 3 9 】

図 3 9

単回投与の36日後の、リンパ節および脾臓におけるB細胞とT細胞の比率  
(CD20+ : CD4+&CD8+)



二重 s c F v - F c は、非血清分画中におけるB細胞を枯渇させるのに十分に有効である

カニクイザル (n=3) における単回 I V ボーラス投与

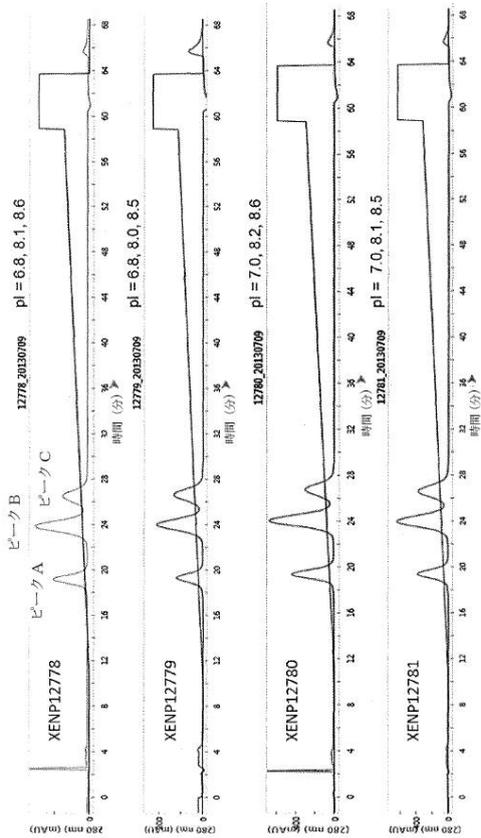
【 図 4 0 】

図 4 0

タンパク質 番号	名称	算出 p I	
		同種二抗体1	同種二抗体2
12778	ヘリスズマブ IgG1_pI(1) Isosteric_A_pI(1) 等配電子 A	6.77	8.12
12779	ヘリスズマブ IgG1_pI(2) Isosteric_A_pI(1) 等配電子 B	6.77	8.04
12780	ヘリスズマブ IgG1_pI(1) Isosteric_B_pI(1) 等配電子 A	7.02	8.19
12781	ヘリスズマブ IgG1_pI(2) Isosteric_B_pI(1) 等配電子 B	7.02	8.12
12876	空...-Fc(216) IgG1_C2205_pI(1) Isosteric_A_pI(1) 等配電子 A	6.01	7.34
12877	空...-Fc(216) IgG1_C2205_pI(2) Isosteric_A_pI(1) 等配電子 B	6.01	7.00
12878	空...-Fc(216) IgG1_C2205_pI(1) Isosteric_B_pI(1) 等配電子 A	6.20	7.68
12879	空...-Fc(216) IgG1_C2205_pI(2) Isosteric_B_pI(1) 等配電子 B	6.20	7.34
13228	4G7_H1.227_L1.199_Fab-SP24_H1.30_L1.47_56V_Fc(216) IgG1_P1VA_A5267K_pI(1) 等配電子 A_WT-IgG1_C2205	7.84	8.38

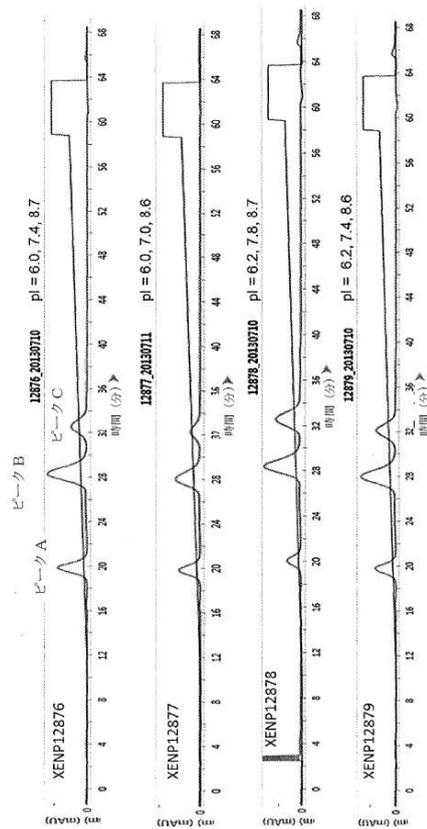
【 図 4 1 】

図 4 1



【 図 4 2 】

図 4 2



【 図 4 3 】

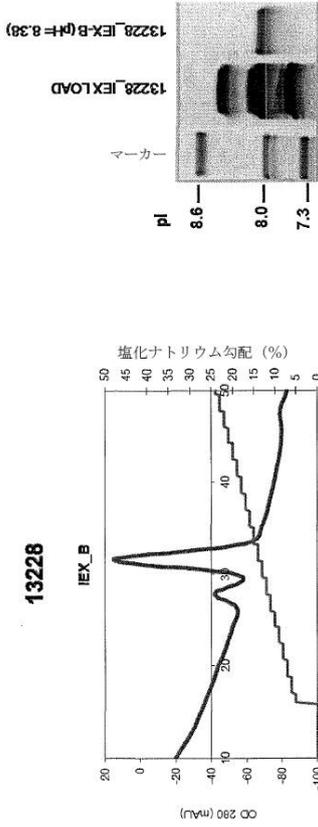


図 4 3

【 図 4 4 】

XENP	変異	置換	Tm	Δ Tm
4547	ヘキサスタブ_アパルチン-IgG1.WT	WT	68.5	
12774	ヘキサスタブ_IgG1_p(-)_等配電子_A	N208D Q295E N384D Q418E N421D	69.0	0.5
12775	ヘキサスタブ_IgG1_p(-)_等配電子_B	N208D Q295E Q418E N421D	68.5	0.0
12776	ヘキサスタブ_IgG1_p(+)_等配電子_A	E269Q E272Q E283Q E357Q	60.0	-8.5
12777	ヘキサスタブ_IgG1_p(+)_等配電子_B	E269Q E272Q E283Q	60.0	-8.5
12948	ヘキサスタブ_IgG1_p(+/+)_等配電子_E272Q/E283Q	E272Q E283Q	60.5	-8.0
12949	ヘキサスタブ_IgG1_p(+/+)_等配電子_E269Q/E283Q	E269Q E283Q	63.5	-5.0
12950	ヘキサスタブ_IgG1_p(+/+)_等配電子_E269Q/E272Q	E269Q E272Q	64.5	-4.0
12951	ヘキサスタブ_IgG1_p(+/+)_等配電子_E269Q	E269Q	68.5	0.0
12952	空_Fg(216)_IgG1_C220S_p(+/+)_等配電子_E272Q/E283Q	E272Q/E283Q	59.5	-9.0
12953	空_Fg(216)_IgG1_C220S_p(+/+)_等配電子_E269Q/E283Q	E269Q/E283Q	63.5	-5.0
12954	空_Fg(216)_IgG1_C220S_p(+/+)_等配電子_E269Q/E272Q	E269Q E272Q	64.0	-4.5
12955	空_Fg(216)_IgG1_C220S_p(+/+)_等配電子_E269Q	E269Q	67.5	-1.0

図 4 4

【 図 4 5 】

XENP	変異	リンカー配列	配列番号	長さ	電荷	Tm1 (°C)
12241	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His	GGGSGGGSGGGGGG	15	0	68.0	
12782	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	66.0	
12783	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+B)	GKGGSGGGSGGGG	15	+3	68.0	
12784	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+C)	GKGGSGGGSGGGG	15	+3	68.0	
12785	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+D)	GGGSGGGSGGGGKS	15	+3	68.5	
12786	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+E)	GKGGSGGGSGGGGKS	15	+6	68.5	
12787	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+F)	GGGSGGGSGGGGKS	15	+3	68.0	
12788	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+G)	GK*GGKPPGSGKPPGSG	15	+3	69.0	
12789	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+H)	GK*GGKPPGSGKPPGSG	20	+4	69.0	
12790	CD3_H1.30_L1.47_scFv_His_scFvリンカー(+I)	GKGGSGGGSGGGSGGGGKS	20	+8	69.5	
11869	467_L1.199_H1.227_20AA_リンカー_6X-His	GGGSGGGSGGGSGGGGGS	20	0	67.5	
12791	467_L1.199_H1.227_14AA_リンカー_(-A)_scFv_6X-His	STAGDTHLGGEDFD	14	-4	64.5	
12792	467_L1.199_H1.227_15AA_リンカー_(-B)_scFv_6X-His	GEGSGGGSGGGGGS	15	-3	66.0	
12793	467_L1.199_H1.227_15AA_リンカー_(-C)_scFv_6X-His	GEGSGGGSGGGGGS	15	-3	66.5	
12794	467_L1.199_H1.227_15AA_リンカー_(-D)_scFv_6X-His	GGGSGGGSGGGGGS	15	-3	67.0	
12795	467_L1.199_H1.227_15AA_リンカー_(-E)_scFv_6X-His	GEGSGGGSGGGGGS	15	-6	65.5	
12796	467_L1.199_H1.227_15AA_リンカー_(-F)_scFv_6X-His	GGGSGGGSGGGGGS	15	-3	66.5	
12801	467_L1.199_H1.227_20AA_リンカー_(-G)_scFv_6X-His	GEGSGGGSGGGGGS	20	-8	67.0	

図 4 5

【 図 4 6 】

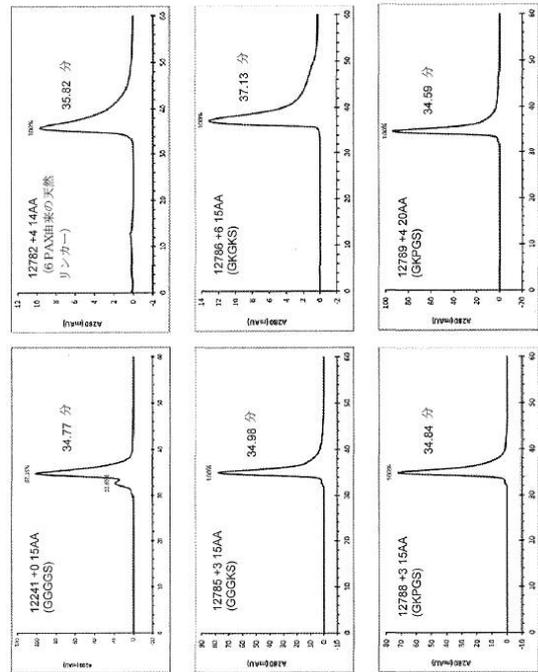
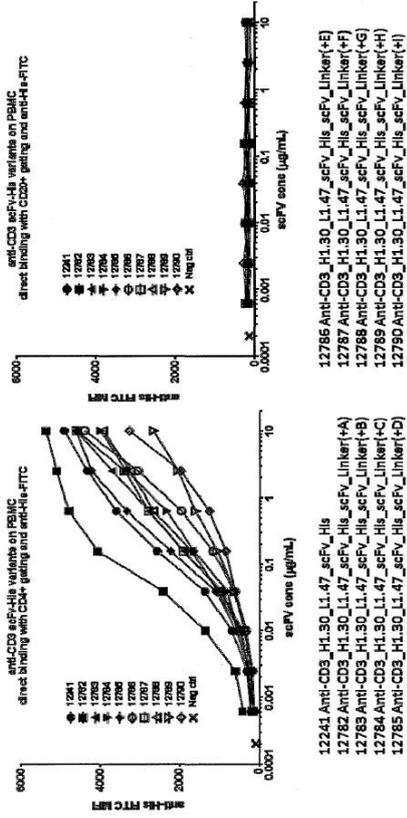


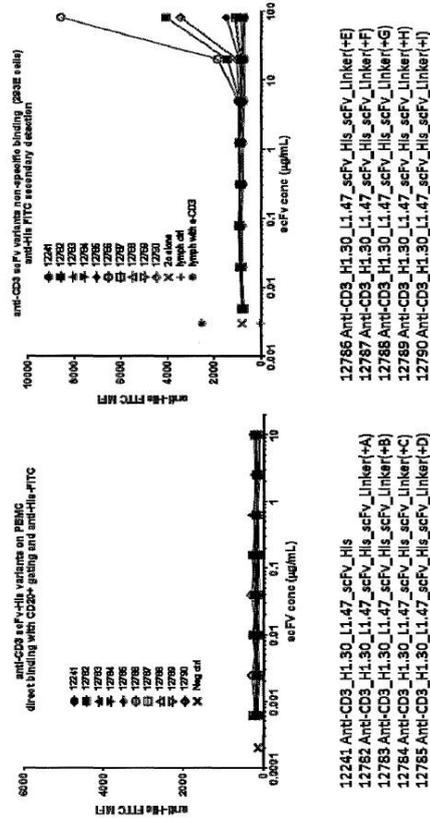
図 4 6

【 4 7 】



4 7

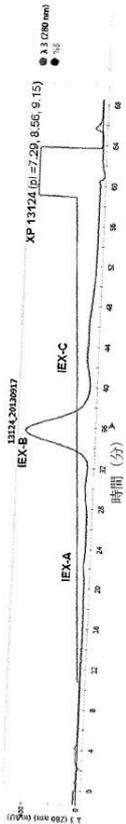
【 4 8 】



4 8

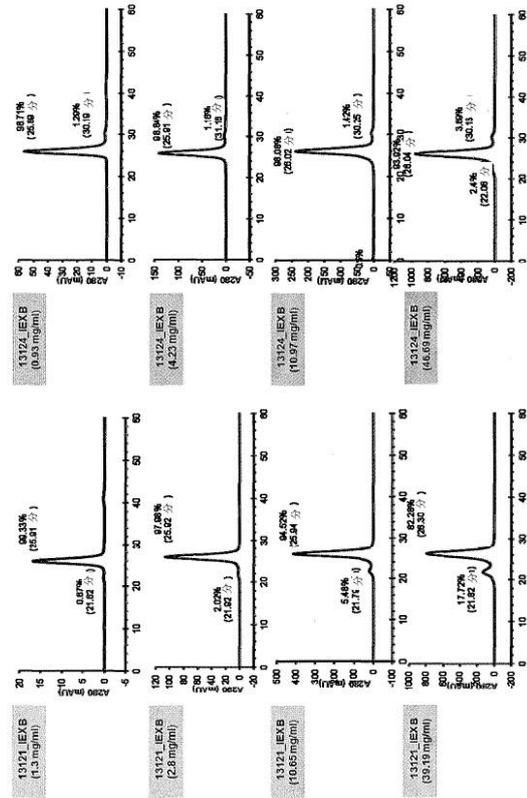
【 4 9 】

4 9



【 5 0 】

5 0



(GWPGS) リンカー (+4 の電荷)

(GS) リンカー (非荷電)



【 図 5 2 - 4 】

図 5 2 D

XENP12785 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+D))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+D))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSG

XENP12786 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+E))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+E))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSG

XENP12787 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+F))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+F))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

【 図 5 2 - 6 】

図 5 2 F

XENP12790 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+H))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+H))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEAD
YYCALWYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEAD
YYCALWYSNHWVFGGGLTLVLSG

XENP12791 (4G7\_L1.199\_H1.227\_14AA\_リカー(-A)\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_14AA\_リカー(-A)\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GLTVTVSSGHHHHH

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GLTVTVSSG

XENP12792 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-B)\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-B)\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSGHHHHH

【 図 5 2 - 5 】

図 5 2 E

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSG

XENP12788 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+G))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+G))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEADYYCAL
WYSNHWVFGGGLTLVLSG

XENP12789 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+H))

一本鎖 Fv (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_His\_scFvリカー(+H))

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEAD
YYCALWYSNHWVFGGGLTLVLSGSHHHHHH

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTLTVSSGGKSGGKSGGKSGQAVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGGKAAITISGAQPEDEAD
YYCALWYSNHWVFGGGLTLVLSG

【 図 5 2 - 7 】

図 5 2 G

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSG

XENP12793 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-C)\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-C)\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSGHHHHH

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSG

XENP12794 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-D)\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リカー(-D)\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSGHHHHH

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQPKLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGETFTLTI
SLEPEDFAVYVCMQHLIYPIITFGGGLKLEIKGGEGSGGEGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYFTTSYV
MHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSSLRSEDATVYVYARGTYTTRVFDYWG
GGGLTVTVSSG

10

20

30

40

50

【 図 5 2 - 8 】

図 5 2 H

XENP12795 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-E}\_scFv\_6X-His)

一本鎖 i Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-E}\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYVM
HWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSGHHHHHH

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYVM
HWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSG

XENP12796 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-F}\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-F}\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYVM
MHWVWVQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSGHHHHHH

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYV
MHWVWVQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSG

XENP12801 (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-G}\_scFv\_6X-His)

一本鎖 Fv (4G7\_L1.199\_H1.227\_15AA\_リネカー\_{-G}\_scFv\_6X-His)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYVM
HWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSGHHHHHH

【 図 5 2 - 10 】

図 5 2 J

XENP13121 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_PVA\_/S267K\_pl(-)
)\_等配電子\_A\_L368D/K370S-IgG1\_C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-) 等配電子 A\_PVA\_/S267K/L368D/K370S)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
AYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYCNVNHKPSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNYK
TTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWEQDVFVSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA\_/S267K/S364K/E357Q)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
NTLYLQMNLSRAEDATVYVCRHGNFGDSYVWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGSAQVVTQEPSTLVSP
PGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGKAAALTSIGAQPDEADYCYCA
LWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQDQVNFVSCVMHEALH
LHNHYTQKLSLSPGK

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSDTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 図 5 2 - 9 】

図 5 2 I

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKGEGESGEGSEVQVLESVGGGLVQVGGSLKLSAASGYTFSYVM
HWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVYWG
QGLTVTVSSG

XENP12968 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_PVA\_/S267K\_pl(-)
-NKV)-pl\_ISO(+RR)\_L368D/K370S-C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl\_ISO(-) PVA\_/S267K/L368D/K370S/S384N/N392K/M397V)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
AYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYCNVNHKPSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPP
VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNY
YKTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFVSCVMHEALHNHYTQKLSLSPG

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv\_Fc(216)\_IgG1\_pl\_ISO(+RR)\_C220S/PVA\_/S267K/S364K/E357Q)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
NTLYLQMNLSRAEDATVYVCRHGNFGDSYVWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGSAQVVTQEPSTLVSP
PGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGKAAALTSIGAQPDEADYCYCA
LWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQDQVNFVSCVMHEALH
LHNHYTQKLSLSPGK

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSDTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 図 5 2 - 11 】

図 5 2 K

XENP13122 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-
CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKGG5)\_Fc(216)\_IgG1\_PVA\_/S267K\_pl(-) 等配電子\_A\_L368D/K370S-
IgG1\_C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-) 等配電子 A\_PVA\_/S267K/L368D/K370S)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
AYMELSLRSEDATVYVCARGTYYYGTRVDFVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYCNVNHKPSDTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNYK
TTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWEQDVFVSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKGG5)\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA\_/S267K/S364K/E357Q)

配列番号 X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKST
NTLYLQMNLSRAEDATVYVCRHGNFGDSYVWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGSAQVVTQEPSTLVSP
GGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQKPKGSPRGLIGGTRKRAPGVPARFSGSLGKAAALTSIGAQPDEADYCYCA
LWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTPREEEYNTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REQMTKNQVLTCLVKGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQDQVNFVSCVMHEALH
NHYTQKLSLSPGK

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGGGTLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKSDTYSLSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

【 図 5 2 - 1 2 】

図 5 2 L

XENP13123 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)3\_Fc(216)\_IgG1\_PVA /S267K\_pl(-)\_等配電子\_A\_L368D/K3705-IgG1\_C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_PVA /S267K/L368D/K3705)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYFTFSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSED... (truncated)

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)3\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA /S267K/S364K/E357Q)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSYAMNHWVRQAPGGGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN... (truncated)

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 :X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKLNQVNGNTLYWFQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPRDFSGSGSGETFTLISLEPEDFAV... (truncated)

【 図 5 2 - 1 3 】

図 5 2 M

XENP13124 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)4\_Fc(216)\_IgG1\_PVA /S267K\_pl(-)\_等配電子\_A\_L368D/K3705-IgG1\_C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_PVA /S267K/L368D/K3705)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYFTFSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSED... (truncated)

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)4\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA /S267K/S364K/E357Q)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSYAMNHWVRQAPGGGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN... (truncated)

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 :X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKLNQVNGNTLYWFQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPRDFSGSGSGETFTLISLEPEDFAV... (truncated)

10

20

30

40

50

【 図 5 2 - 1 4 】

図 5 2 N

XENP13125 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKGS)3\_Fc(216)\_IgG1\_PVA /S267K\_pl(-)\_等配電子\_A\_L368D/K3705-IgG1\_C220S/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_PVA /S267K/L368D/K3705)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYFTFSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSED... (truncated)

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKGS)3\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA /S267K/S364K/E357Q)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSYAMNHWVRQAPGGGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN... (truncated)

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 :X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKLNQVNGNTLYWFQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPRDFSGSGSGETFTLISLEPEDFAV... (truncated)

【 図 5 2 - 1 5 】

図 5 2 O

XENP13126 (4G7\_H1.227\_L1.199\_Fab-CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)4\_Fc(216)\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_L368D/K3705-IgG1\_C220S/PVA /S267K/E269Q/S364K/E357Q)

重鎖 1 (4G7\_H1.227\_IgG1\_pl(-)\_等配電子\_A\_PVA /S267K/L368D/K3705)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYFTFSYVMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISSDKSKSTAYMELSLRSED... (truncated)

重鎖 2 (CD3\_H1.30\_L1.47\_scFv(GKPGS)4\_Fc(216)\_IgG1\_C220S/PVA /S267K/E269Q/S364K/E357Q)

配列番号 :X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSYAMNHWVRQAPGGGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN... (truncated)

軽鎖 (4G7\_L1.199)

配列番号 :X

DIVMTQSPATLSLSPGERATISCRSSKLNQVNGNTLYWFQKPGQSPKLLIYRASNLNSGVPRDFSGSGSGETFTLISLEPEDFAV... (truncated)

50

【 図 5 3 】

図 5 3

アミノ酸	pI
アラニン Ala A	6.00
アルギニン Arg R	11.15
アスパラギン Asn N	5.41
アスパラギン酸 Asp D	2.77
システイン Cys C	5.02
グルタミン酸 Glu E	3.22
グルタミン Gln Q	5.65
グリシン Gly G	5.97
ヒスチジン His H	7.47
イソロイシン Ile I	5.94
ロイシン Leu L	5.98
リジン Lys K	9.59
メチオニン Met M	5.74
フェニルアラニン Phe F	5.48
プロリン Pro P	6.30
セリン Ser S	5.68
スレオニン Thr T	5.64
トリプトファン Trp W	5.89
チロシン Tyr Y	5.66
バリン Val V	5.96

【 図 5 4 - 1 】

図 5 4 A

変異	置換(複数含む) の数				平均 デルタ pI
	pl / pl	pl / WT	WT / WT	WT / WT	
G137E/N203D/K274Q/R355Q/K392N/Q419E/K447_	7	6.43	7.14	8.02	-0.79
G137E/N203D/K274Q/R355Q/K392N/Q419E	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
G137E/N203D/K274Q/R355Q/K392N/K447_	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
G137E/N203D/K274Q/R355Q/Q419E/K447_	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
G137E/N203D/K274Q/K392N/Q419E/K447_	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
G137E/N203D/R355Q/K392N/Q419E/K447_	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
N203D/K274Q/R355Q/K392N/Q419E/K447_	6	6.58	7.30	8.02	-0.72
G137E/N203D/K274Q/R355Q/K392N	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/K274Q/R355Q/Q419E	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/K274Q/K392N/Q419E	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/K274Q/K392N/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/K274Q/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/R355Q/K392N/Q419E	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/R355Q/K392N/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/R355Q/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/N203D/K392N/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
G137E/K274Q/R355Q/K392N/Q419E	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
G137E/K274Q/R355Q/K392N/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
G137E/K274Q/R355Q/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
G137E/R355Q/K392N/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.83
N203D/K274Q/R355Q/K392N/Q419E	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
N203D/K274Q/R355Q/K392N/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
N203D/K274Q/K392N/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
N203D/R355Q/K392N/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
K274Q/R355Q/K392N/Q419E/K447_	5	6.76	7.46	8.02	-0.63
G137E/N203D/K274Q/R355Q	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/K274Q/K392N	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/K274Q/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/R355Q/K392N	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/R355Q/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/R355Q/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/K274Q/R355Q/K392N	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/K274Q/R355Q/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/K274Q/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/K274Q/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/R355Q/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/R355Q/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/R355Q/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/K392N/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K274Q/R355Q/K392N	4	7.00	7.61	8.02	-0.51

10

20

【 図 5 4 - 2 】

図 5 4 B

変異	置換(複数含む) の数				平均 デルタ pI
	pl / pl	pl / WT	WT / WT	WT / WT	
N203D/K274Q/R355Q/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K274Q/R355Q/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K274Q/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K274Q/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K274Q/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/R355Q/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/R355Q/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/R355Q/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
N203D/K392N/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
K274Q/R355Q/K392N/Q419E	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
K274Q/R355Q/K392N/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
K274Q/R355Q/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
K274Q/K392N/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
R355Q/K392N/Q419E/K447_	4	7.00	7.61	8.02	-0.51
G137E/N203D/K274Q	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/N203D/R355Q	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/N203D/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/N203D/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/N203D/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K274Q/R355Q	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K274Q/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K274Q/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K274Q/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/R355Q/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/R355Q/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/R355Q/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K392N/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/K392N/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/Q419E/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K274Q/R355Q	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K274Q/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K274Q/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K274Q/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/R355Q/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/R355Q/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/R355Q/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K392N/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/K392N/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
N203D/Q419E/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K274Q/R355Q/K392N	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K274Q/R355Q/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K274Q/R355Q/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K274Q/K392N/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K274Q/K392N/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
R355Q/K392N/Q419E	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
R355Q/K392N/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
R355Q/Q419E/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
K392N/Q419E/K447_	3	7.30	7.74	8.02	-0.36
G137E/N203D	2	7.61	7.85	8.02	-0.21

【 図 5 4 - 3 】

図 5 4 C

変異	置換(複数含む) の数				平均 デルタ pI
	pl / pl	pl / WT	WT / WT	WT / WT	
G137E/K274Q	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
G137E/R355Q	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
G137E/K392N	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
G137E/Q419E	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
G137E/K447_	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
N203D/K274Q	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
N203D/R355Q	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
N203D/K392N	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
N203D/Q419E	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
N203D/K447_	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
K274Q/R355Q	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
K274Q/K392N	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
K274Q/Q419E	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
R355Q/K392N	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
R355Q/Q419E	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
R355Q/K447_	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
K392N/Q419E	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
K392N/K447_	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
Q419E/K447_	2	7.61	7.85	8.02	-0.21
G137E	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
N203D	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
K274Q	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
R355Q	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
K392N	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
Q419E	1	7.85	7.94	8.02	-0.09
K447_	1	7.85	7.94	8.02	-0.09

30

40

50

【 55 】

55

変異	置換(複数含む)の数	d / pl	pl / WT	WT / WT	平均アレルpI
Q196K/P217R/P228R/N276K/H435R	5	8.53	8.32	8.02	0.25
Q196K/P217R/P228R/N276K	4	8.45	8.27	8.02	0.22
Q196K/P217R/P228R/H435R	4	8.46	8.28	8.02	0.22
Q196K/P217R/N276K/H435R	4	8.45	8.27	8.02	0.22
Q196K/P228R/N276K/H435R	4	8.45	8.27	8.02	0.22
P217R/P228R/N276K/H435R	4	8.46	8.28	8.02	0.22
Q196K/P217R/P228R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P217R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P228R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P228R/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P217R/P228R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P217R/P228R/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.18
P217R/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P228R/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P217R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/P228R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/H435R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P217R/P228R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
P217R/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P217R/H435R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
P228R/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P228R/H435R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
N276K/H435R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K	1	8.16	8.10	8.02	0.07
P217R	1	8.16	8.10	8.02	0.07
P228R	1	8.16	8.10	8.02	0.07
N276K	1	8.16	8.10	8.02	0.07
H435R	1	8.16	8.10	8.02	0.07

【 56 】

56

変異	置換(複数含む)の数	d / pl	pl / WT	WT / WT	平均アレルpI
Q196K/P217R/P228R/N276K/H435R	5	8.53	8.32	8.02	0.25
Q196K/P217R/P228R/N276K	4	8.45	8.27	8.02	0.22
Q196K/P217R/P228R/H435R	4	8.46	8.28	8.02	0.22
Q196K/P217R/N276K/H435R	4	8.45	8.27	8.02	0.22
Q196K/P228R/N276K/H435R	4	8.45	8.27	8.02	0.22
P217R/P228R/N276K/H435R	4	8.46	8.28	8.02	0.22
Q196K/P217R/P228R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P217R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P228R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P228R/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P217R/P228R/N276K	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P217R/P228R/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.18
P217R/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
P228R/N276K/H435R	3	8.37	8.22	8.02	0.17
Q196K/P217R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/P228R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K/H435R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P217R/P228R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
P217R/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P217R/H435R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
P228R/N276K	2	8.27	8.16	8.02	0.13
P228R/H435R	2	8.28	8.16	8.02	0.13
N276K/H435R	2	8.27	8.16	8.02	0.13
Q196K	1	8.16	8.10	8.02	0.07
P217R	1	8.16	8.10	8.02	0.07
P228R	1	8.16	8.10	8.02	0.07
N276K	1	8.16	8.10	8.02	0.07
H435R	1	8.16	8.10	8.02	0.07

【 57 - 1 】

57 A

XENP12912 H1.79\_L1.48

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVLGSHHHHHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSS

QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

XENP13701 H1.80\_L1.49

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVLGSHHHHHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSS

QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

【 57 - 2 】

57 B

XENP13702 H1.81\_L1.50

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVLGSHHHHHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSS

QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

XENP13703 H1.81\_L1.51

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVLGSHHHHHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSSGGGGSGGGSGGGGS  
 QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRF  
 TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTIVTVSS

QAVVTQEPSSLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLG  
 GKAAALTSGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGCTKLTIVL

10

20

30

40

50



## 【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 令 和 4 年 2 月 2 日 ( 2 0 2 2 . 2 . 2 )

## 【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

a ) アミノ酸置換 S 3 6 4 K 及び E 3 5 7 Q を含む第一の変異 F c ドメインを含む第一のモノマーと、 10

b ) アミノ酸置換 L 3 6 8 D 及び K 3 7 0 S を含む第二の変異 F c ドメインを含む第二のモノマーと、

を含み、

ナンバリングが E U ナンバリングに従っている、

ヘテロ二量体タンパク質。

【 請 求 項 2 】

a )

i ) アミノ酸置換 S 3 6 4 K 及び E 3 5 7 Q を含む第一の変異 F c ドメイン、及び

i i ) 第一の融合パートナー 20

を含む第一のモノマーと、

b )

i ) アミノ酸置換 L 3 6 8 D 及び K 3 7 0 S を含む第二の変異 F c ドメイン、及び

i i ) 第二の融合パートナー

を含む第二のモノマーと、

を含み、

ナンバリングが E U ナンバリングに従っている、

ヘテロ二量体タンパク質。

【 請 求 項 3 】

前記第一及び第二の変異 F c ドメインが、変異ヒト I g G 1 F c ドメイン、変異ヒト I g G 2 F c ドメイン、及び変異ヒト I g G 4 F c ドメインからなる群から選択される変異ヒト F c ドメインである、請求項 1 又は 2 に記載のヘテロ二量体タンパク質。 30

【 請 求 項 4 】

a ) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の第一のモノマーをコードする第一の核酸と、

b ) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の第二のモノマーをコードする第二の核酸と、

を含む、核酸組成物。

【 請 求 項 5 】

a ) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の第一のモノマーをコードする第一の核酸を含む第一の発現ベクターと、

b ) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の第二のモノマーをコードする第二の核酸を含む第二の発現ベクターと、 40

を含む、発現ベクター組成物。

【 請 求 項 6 】

請求項 4 に記載の核酸組成物、又は請求項 5 に記載の発現ベクター組成物を含む、宿主細胞。

【 請 求 項 7 】

ヘテロ二量体タンパク質が産生される条件下で、請求項 6 に記載の宿主細胞を培養することと、

前記ヘテロ二量体タンパク質を回収することと、

を含む、ヘテロ二量体タンパク質を作製する方法。 50

## 【請求項 8】

a)

i) アミノ酸置換 S 3 6 4 K 及び E 3 5 7 Q を含む第一の変異 F c ドメイン、及び  
 ii) 第一の抗原結合ドメイン  
 を含む第一のモノマーと、

b)

i) アミノ酸置換 L 3 6 8 D 及び K 3 7 0 S を含む第二の変異 F c ドメイン、及び  
 ii) 第二の抗原結合ドメイン  
 を含む第二のモノマーと、  
 を含み、  
 ナンバリングが E U ナンバリングに従っている、  
 ヘテロ二量体抗体。

10

## 【請求項 9】

前記第一及び第二の変異 F c ドメインが、変異ヒト I g G 1 F c ドメイン、変異ヒト I g G 2 F c ドメイン、及び変異ヒト I g G 4 F c ドメインからなる群から選択される変異ヒト F c ドメインである、請求項 8 に記載のヘテロ二量体抗体。

## 【請求項 10】

a) 請求項 8 又は 9 に記載の第一のモノマーをコードする第一の核酸と、  
 b) 請求項 8 又は 9 に記載の第二のモノマーをコードする第二の核酸と、  
 を含む、核酸組成物。

20

## 【請求項 11】

a) 請求項 8 又は 9 に記載の第一のモノマーをコードする第一の核酸を含む第一の発現ベクターと、  
 b) 請求項 8 又は 9 に記載の第二のモノマーをコードする第二の核酸を含む第二の発現ベクターと、  
 を含む、発現ベクター組成物。

## 【請求項 12】

請求項 10 に記載の核酸組成物、又は請求項 11 に記載の発現ベクター組成物を含む、宿主細胞。

## 【請求項 13】

ヘテロ二量体抗体が産生される条件下で、請求項 12 に記載の宿主細胞を培養することと、  
 前記ヘテロ二量体抗体を回収することと、  
 を含む、ヘテロ二量体抗体を作製する方法。

30

## 【外国語明細書】

2022058633000186.pdf

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/938,095

(32)優先日 平成26年2月10日(2014.2.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/913,832

(32)優先日 平成25年12月9日(2013.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/913,879

(32)優先日 平成25年12月9日(2013.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/913,870

(32)優先日 平成25年12月9日(2013.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/794,896

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US2014/011549

(32)優先日 平成26年1月14日(2014.1.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/818,153

(32)優先日 平成25年5月1日(2013.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/818,344

(32)優先日 平成25年5月1日(2013.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 14/205,248

(32)優先日 平成26年3月11日(2014.3.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

1 0 1 6 , モンロピア , ウエスト レモン アベニュー 1 1 1 , ゼンコア インコーポレイテッド

(72)発明者 デスジャールレイス , ジョン

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 9 1 0 1 6 , モンロピア , ウエスト レモン アベニュー 1

- 
- (72)発明者 11, ゼンコア インコーポレイテッド  
ラシッド, ルマナ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91016, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1
- (72)発明者 11, ゼンコア インコーポレイテッド  
バーネット, マシュー, ジェイ.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91016, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1
- 11, ゼンコア インコーポレイテッド