

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7387611号

(P7387611)

(45)発行日 令和5年11月28日(2023.11.28)

(24)登録日 令和5年11月17日(2023.11.17)

(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 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

請求項の数 58 (全206頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-537829(P2020-537829)

(86)(22)出願日 平成30年9月20日(2018.9.20)

(65)公表番号 特表2020-534034(P2020-534034
A)

(43)公表日 令和2年11月26日(2020.11.26)

(86)国際出願番号 PCT/CN2018/106766

(87)国際公開番号 WO2019/057122

(87)国際公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

審査請求日 令和3年6月29日(2021.6.29)

(31)優先権主張番号 PCT/CN2017/103030

(32)優先日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 518330176

ウーシー バイオロジクス アイルランド
リミテッドアイルランド、エイ91・エックス56
エフ、カウンティ・ラウス、ダンドーク
、マラガーリン

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規二重特異性ポリペプチド複合体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチド複合体であって：

N-末端からC-末端へ、第一のT細胞受容体(TCR)定常領域(C1)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン(VH)を含む、第一のポリペプチド；及び

N-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域(C2)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、第二のポリペプチド；を含み、

ここで、

C1及びC2は、C1とC2の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、二量体を安定化することが可能であり、

C1が、操作されたCBetaを含み、且つC2が、操作されたCAlphaを含み；前記操作されたCBeta及び操作されたCAlphaが、CBeta中のS56C及びCAlpha中のT49Cの、一対の変異されたシステイン残基を含み、前記一対の変異されたシステイン残基が非天然型鎖間結合を形成することができ；

第一の抗体は、第一の抗原特異性を有する、ポリペプチド複合体。

【請求項2】

少なくとも1つの天然型N-グリコシル化部位が、C1及び／又はC2内に存在しないか又は存在する、請求項1記載のポリペプチド複合体。

【請求項 3】

前記二量体が、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10の非天然型鎖間結合を含み、任意に少なくとも1つの非天然型鎖間結合が、ジスルフィド結合である、請求項1又は2記載のポリペプチド複合体。

【請求項 4】

前記第一のVHが、第一の接続ドメインで、C1へ機能的に連結され、且つ

第一のVLが、第二の接続ドメインで、C2へ機能的に連結される、請求項1～3のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 5】

前記第一及び／又は第二の接続ドメインが、抗体V／C接続のC末端断片の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基の長さ、及びTCR V／C接続のN末端断片の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基の長さを含む、請求項4記載のポリペプチド複合体。

10

【請求項 6】

前記操作されたCBetaの位置C74に天然型システイン残基が、存在しないか又は存在する、請求項1記載のポリペプチド複合体。

【請求項 7】

前記少なくとも1つの天然型グリコシル化部位が、操作されたCBeta中及び／又は操作されたCAlpha中に、存在しないか又は存在する、請求項6記載のポリペプチド複合体。

20

【請求項 8】

前記操作されたCBeta中の天然型グリコシル化部位が、N69であり、及び／又は操作されたCAlpha中の天然型グリコシル化部位（複数）が、N34、N68、N79、及び任意のそれらの組合せから選択される、請求項7記載のポリペプチド複合体。

【請求項 9】

前記操作されたCBetaが、天然型CBetaのアミノ酸残基101～117を包含するFGループ及び／又は天然型CBetaのアミノ酸残基66～71を包含するDEループを欠くか又は保持する、請求項6～8のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 10】

前記操作されたCAlphaが、配列番号：43～48を含み、及び／又は操作されたCBetaが、配列番号：33～41を含む、請求項6～9のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

30

【請求項 11】

前記C1が、操作されたCBetaを含み、及びC2が、操作されたCAlphaを含み；並びに、ここで第一の接続ドメインが、配列番号：49もしくは50を含むかもしくはこれであり、並びに／又は第二の接続ドメインが、配列番号：51もしくは52を含むかもしくはこれである、請求項6～10のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 12】

前記第一の抗原特異性が、外来性抗原、内在性抗原、自己抗原、ネオ抗原、ウイルス抗原又は腫瘍抗原に対し向けられる、請求項1～11のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

40

【請求項 13】

第一の抗原特異性とは異なる第二の抗原特異性を有する第二の抗原結合部分と会合された、第一の抗原特異性を有する、請求項1～12のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分を含み、並びに

第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然Fab対応物である場合の別のものよりも、誤対形成する傾向が少ない、二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 14】

前記第二の抗原結合部分が、第二の抗原特異性を有する第二の抗体の重鎖可変ドメイン

50

及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項 13 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 15】

前記第二の抗原結合部分が、Fabを含む、請求項 13 又は 14 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 16】

前記第一の抗原特異性及び第二の抗原特異性が、2つの異なる抗原に対し向けられるか、又は一つの抗原上の2つの異なるエピトープに対し向けられる、請求項 15 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 17】

前記第一及び第二の抗原特異性の一方が、T細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK細胞）特異性受容体分子に対し向けられ、且つ他方が、腫瘍関連抗原に対し向けられる、請求項 16 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

10

【請求項 18】

前記第一及び第二の抗原特異性の一方が、CD3に対し向けられ、且つ他方が、腫瘍関連抗原に対し向けられる、請求項 17 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 19】

前記第一及び第二の抗原特異性の一方が、CD3に対し向けられ、且つ他方が、CD19に対し向けられる、請求項 18 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 20】

前記第一の抗原結合部分が更に、第一の二量体形成ドメインを含み、且つ第二の抗原結合部分が更に、第二の二量体形成ドメインを含み、ここで第一及び第二の二量体形成ドメインは会合されている、請求項 13～19のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

20

【請求項 21】

前記会合が、コネクター、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、もしくは疎水性－親水性相互作用、又はそれらの組合せを介してである、請求項 20 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 22】

前記第一及び／又は第二の二量体形成ドメインが、任意にIgG1、IgG2又はIgG4に由来した、抗体ヒンジ領域の少なくとも一部分を含む、請求項 20 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

30

【請求項 23】

前記第一及び／又は第二の二量体形成ドメインが更に、抗体CH2ドメイン、及び／又は抗体CH3ドメインを含む、請求項 22 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 24】

前記第一の二量体形成ドメインが、第三の接続ドメインで第一のTCR定常領域（C1）へ機能的に連結される、請求項 20 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 25】

前記C1が、操作されたCBetaを含み、且つ第三の接続ドメインが、配列番号：53、54、134、135、140又は141に含まれる、請求項 24 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

40

【請求項 26】

前記第二の二量体形成ドメインが、第二の抗原結合部分の重鎖可変ドメインに機能的に連結される、請求項 25 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 27】

前記第一及び第二の二量体形成ドメインが、異なり、且つホモ二量体形成を妨げ、及び／又はヘテロ二量体形成に有利に働く様式で会合している、請求項 20～26のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 28】

前記第一及び第二の二量体形成ドメインが、ヘテロ二量体へ、ノブイントゥホール、疎

50

水性相互作用、静電的相互作用、親水性相互作用、又は増大した可動性を介して、会合することが可能である、請求項 27 記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 29】

前記第一の抗原結合部分が、キメラ定常領域へ機能的に連結される V H を含む第一のポリペプチド、及び C 2 へ機能的に連結される V L を含む第二のポリペプチドを含み、ここでキメラ定常領域及び C 2 が、配列番号：177/176、179/178、184/183、185/183、180/176、181/178、182/178、184/186、185/186、188/187、196/187、190/189、192/191、192/193、及び 195/194 からなる群から選択される配列の対を含む、請求項 13～28 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

10

【請求項 30】

前記第一の抗原性が、C D 3 に対し向けられ、且つ第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドが、配列番号：2/1、4/3、5/1、6/3、7/3、9/8、10/8、9/11、10/11、13/12、15/14、17/16、17/18、20/19、及び 21/12 からなる群から選択される配列の対を含む、請求項 13～29 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項 31】

前記第一の抗原結合部分が、C D 3 へ結合することが可能であり、且つ第二の抗原結合部分が、C D 19 へ結合することが可能であり、且つ二重特異性ポリペプチド複合体が、配列番号：22/12/24/23、25/12/26/23、及び 25/12/27/23 からなる群から選択される 4 種のポリペプチド配列の組合せを含む、請求項 13～30 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体。

20

【請求項 32】

部分へコンジュゲートされた、請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 13～31 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体を含む、コンジュゲート。

【請求項 33】

請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 13～31 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体をコードしている、単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 34】

請求項 33 記載のポリヌクレオチドを含む、単離されたベクター。

【請求項 35】

請求項 33 記載の単離されたポリヌクレオチド、又は請求項 34 記載の単離されたベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 36】

請求項 35 記載の宿主細胞を、ポリペプチド複合体、又は二重特異性ポリペプチド複合体が発現される条件下で培養することを含む、請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 13～31 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体を発現する、方法。

40

【請求項 37】

請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 13～31 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体を製造する方法であって：

a) 宿主細胞へ：

N-末端から C-末端へ、第一の T C R 定常領域 (C 1) へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変領域 (V H) を含む第一のポリペプチドをコードしている第一のポリヌクレオチド、及び

N-末端から C-末端へ、第二の T C R 定常領域 (C 2) へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン (V L) を含む第二のポリペプチドをコードしている第二のポリヌクレオチド：を導入する工程であって、

50

ここで、C 1 及び C 2 が、C 1 と C 2 の間に少なくとも 1 つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合が、二量体を安定化することが可能であり、

C 1 が、操作された C B e t a を含み、且つ C 2 が、操作された C A l p h a を含み；前記操作された C B e t a 及び操作された C A l p h a が、C B e t a 中の S 5 6 C 及び C a l p h a 中の T 4 9 C の、一対の変異されたシステイン残基を含み、前記一対の変異されたシステイン残基が非天然型鎖間結合を形成することができ；

第一の抗体が、第一の抗原特異性を有する工程；

b) 宿主細胞にポリペプチド複合体を発現させる工程：を含む、方法。

【請求項 3 8】

a) 宿主細胞へ、

第二の抗原結合部分をコードしている追加のポリヌクレオチドを 1 又は複数導入する工程であって、

ここで、第二の抗原結合部分が、第一の抗原特異性とは異なる第二の抗原特異性を有する工程；

b) 宿主細胞に、二重特異性ポリペプチド複合体を発現させる工程：を更に含む、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体を単離する工程を更に含む、請求項 3 6 ～ 3 8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 1 3 ～ 3 1 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体を含有する、組成物。

【請求項 4 1】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 1 3 ～ 3 1 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体、及び医薬として許容し得る担体を含有する、医薬組成物。

【請求項 4 2】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、又は請求項 1 3 ～ 3 1 のいずれか一項記載の二重特異性ポリペプチド複合体の治療的有効量を含む、それを必要とする対象において状態を治療するための医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記状態が、第一の抗原及び第二の抗原が両方共調節された場合に、緩和、除去、治療、又は予防され得る、請求項 4 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

1) 第一の抗原特異性を有する請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分、

2) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第二の抗体の V H、及び

抗体軽鎖定常 (C L) ドメインへ機能的に連結された第二の抗体の V L を含む、第二の抗原結合部分を含むポリペプチド複合体であって、

第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然 F a b 対応物である場合の別のものよりも、誤対形成する傾向が少ない、ポリペプチド複合体。

【請求項 4 5】

抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V L を含む第三の抗原結合部分を更に含み、第三の抗原結合部分の C H 1 が、第二の抗原結合部分の V H へ機能的に連結されている、請求項 4 4 記載のポリペプチド複合体。

【請求項 4 6】

1) 第一の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分、

2) 第二の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第二の抗原結合部分、

3) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V L を含む第三の抗原結合部分；並びに

4) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V L を含む第四の抗原結合部分

を含むポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチド複合体が、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメイン並びに第一及び第二の抗体 C H 3 ドメインを更に含み、

第一の抗原結合部分由来の V H 及び第二の抗原結合部分由来の V H が、各々、第一及び第二の抗体 C H 3 ドメインへ機能的に連結され、第三の抗原結合部分由来の C H 1 及び第四の抗原結合部分由来の C H 1 が、各々、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメインへ機能的に連結され、並びに第三の抗原結合部分及び第四の抗原結合部分が、二量体を形成することが可能である、ポリペプチド複合体。

【請求項 47】

1) 第一の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分、

2) 第二の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第二の抗原結合部分、

3) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V L を含む第三の抗原結合部分；並びに

4) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V L を含む第四の抗原結合部分

を含むポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチド複合体が、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメイン並びに第一及び第二の抗体 C H 3 ドメインを更に含み、

第一の抗原結合部分由来の C 1 及び第二の抗原結合部分由来の C 1 が、各々、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメインへ機能的に連結され、第三の抗原結合部分由来の V H 及び第四の抗原結合部分由来の V H が、各々、第一及び第二の抗体 C H 3 ドメインへ機能的に連結され、並びに第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分が、二量体を形成することが可能である、ポリペプチド複合体。

【請求項 48】

1) 第一の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分、

2) 第二の抗原特異性を有する請求項 1～12 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、二の抗原結合部分、

3) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V L を含む第三の抗原結合部分；並びに

4) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V H、及び抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V L を含む第四の抗原結合部分、

を含むポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチド複合体が、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメイン並びに第一及び第二の

10

20

30

40

50

抗体 C H 3 ドメインを更に含み、

第三の抗原結合部分由来の C H 1 及び第四の抗原結合部分由来の C H 1 が、各々、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメインへ機能的に連結され、第一の抗原結合部分由来の C 1 が、第一の抗原結合部分由来の V H へ機能的に連結され、第二の抗原結合部分由来の C 1 が、第二の抗原結合部分由来の V H へ機能的に連結され、並びに第三の抗原結合部分及び第四の抗原結合部分が、二量体を形成することが可能である、ポリペプチド複合体。

【請求項 4 9】

1) 第一の抗原特異性を有する請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第一の抗原結合部分、

2) 第二の抗原特異性を有する請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、第二の抗原結合部分、

3) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V H、及び
抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第三の抗体の V L を含む第三の抗原結合部分；並びに

4) 抗体重鎖 C H 1 ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V H、及び
抗体軽鎖 C L ドメインへ機能的に連結された第四の抗体の V L を含む第四の抗原結合部分

を含むポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチド複合体が、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメイン並びに任意に第一及び第二の抗体 C H 3 ドメインを更に含み、第一の抗原結合部分由来の C 1 及び第二の抗原結合部分由来の C 1 が、各々、第一及び第二の抗体 C H 2 ドメインへ機能的に連結され、第三の抗原結合部分由来の C H 1 が、第一の抗原結合部分由来の V H へ機能的に連結され、第四の抗原結合部分由来の C H 1 が、第二の抗原結合部分由来の V H へ機能的に連結され、並びに第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分が、二量体を形成することが可能である、ポリペプチド複合体。

【請求項 5 0】

請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体をコードしている単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 1】

請求項 5 0 記載のポリヌクレオチドを含む、単離されたベクター。

【請求項 5 2】

請求項 5 0 記載の単離されたポリヌクレオチド又は請求項 5 1 記載の単離されたベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 5 3】

請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含有する、組成物。

【請求項 5 4】

請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、及び医薬として許容し得る担体を含有する、医薬組成物。

【請求項 5 5】

請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体の治療的有効量を含む、それを必要とする対象の状態を治療するための医薬組成物。

【請求項 5 6】

前記操作された C A l p h a 中の少なくとも 1 つの天然型 S e r 残基が、O-グリコシル化を減少するように変異されている、請求項 1 ～ 1 2 及び 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 5 7】

前記 C 2 が、操作された C A l p h a を含み、ここで操作された C A l p h a 中の少なくとも 1 つの天然型 S e r 残基が、O-グリコシル化を減少するように変異されている、請求項 1 ～ 1 2 及び 4 4 ～ 4 9 のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 5 8】

10

20

30

40

50

前記変異されたアミノ酸残基が、S 1 9、S 3 6、S 4 1、S 9 1及びS 9 4から選択される、請求項5 6又は5 7記載のポリペプチド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本開示は概して、T C R定常領域に融合された抗体可変領域を含む可溶性ポリペプチド複合体、及びこれを含む二重特異性ポリペプチド複合体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(相互参照)

本出願は、2 0 1 7 年 9 月 2 2 日に出願された国際特許出願PCT/CN2017/103030の優先権を主張するものであり、この出願の全内容は、引用により本明細書中に組み込まれている。

【0 0 0 3】

(背景)

二重特異性抗体は、治療用抗体の新たな範疇として成長している。これらは、2種の異なる標的又は標的上の2種の異なるエピトープに結合し、個別の抗体の作用を上回る相加作用又は相乗作用を生じることができる。多くの抗体操作の取組みで、D V D-I g、C r o s s M a b、B i T Eなどの、新規の二重特異性フォーマットが設計されている(Spie ssら、Molecular Immunology, 67(2), 95-106 (2015)。しかしこれらのフォーマットは、潜在的に、安定性、溶解度、短い半減期、及び免疫原性において、様々な制限がある。

【0 0 0 4】

これらの二重特異性抗体フォーマットの中で、I g G-様二重特異性抗体には、1つのアームは標的Aに結合し、及び別のアームは標的Bに結合するという共通のフォーマットがある。構造的に、これは、天然I g Gと類似したサイズ及び形状を持つ抗体Aの半分及び抗体Bの半分から作製される。下流開発を促進するために、そのような二重特異性分子は、高い発現レベル及び正確に集成された形状を持ち、単独の宿主細胞から通常のI g Gのように容易に作製され得ることが望ましい。残念ながら、コグネイト軽鎖-重鎖の対形成、並びに2つの異なる半抗体の集成は、自動的に制御することができない。ランダムな様式でのあらゆる種類の誤対形成は、著しい生成物の不均質を生じ得る。

【0 0 0 5】

「ノブイントゥホール」(Ridgwayら、Protein Engineering, 9(7), 617-21 (1996) ; Merchantら、Nature Biotechnology, 16(7), 667-681(1998)) ; 静電的(Gunasekaranら、Journal of Biological Chemistry, 285(25), 19637-19646 (2010))、又はネガティブ状態のデザイン(Kreudensteinら、mAbs, 5(5), 646-654 (2013) ; Leaver-Fayら、Structure, 24(4), 641-651, (2016))など、F c領域に変異を導入することにより、2種の異なる重鎖の好ましいヘテロ二量体性集成体が成し遂げられている。しかし、個別の抗体の各々の軽鎖-重鎖の選択的対形成は、依然課題である。軽鎖-重鎖間の境界面は、可変ドメイン(V H-V L)及び定常ドメイン(C H 1-C L)を含む。いくつかの戦略が、コグネイト対形成を促進するための、直交性境界面の設計に適用されている。Roche社は、C H 1及びC Lのドメインを交換し、CrossMabプラットフォームを作製し(Schaeferら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, 108(27), 11187-11192, (2011))、MedImmune社は、代わりにジスルフィド結合を導入し(Mazorら、mAbs, 7(2), 377-389, (2015))、Amgen社は、C H 1-C L領域を更に静電的とし(Liuら、Journal of Biological Chemistry, 290(12), 7535-7562, (2015))、並びにLilly社(Lewisら、Nature Biotechnology, 32(2), 191-198 (2014))及びGenentech社(Dillonら、mAbs, 9(2), 213-230, (2017))は、可変ドメイン及び定常ドメインの両方に変異を導入した。

10

20

30

40

50

【0006】

従って、所望の発現レベル及び抗原に対する親和性を持つ二重特異性分子を設計する大きい必要性が存在する。

【発明の概要】

【0007】

(発明の簡単な概要)

一つの態様において、本開示は、N-末端からC-末端へ、第一のT細胞受容体(TCR)定常領域(C1)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン(VH)を含む、第一のポリペプチド、及びN-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域(C2)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、第二のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、ここでC1及びC2は、C1とC2の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、二量体を安定化することが可能であり、並びに第一の抗体は、第一の抗原特異性を有するポリペプチド複合体を提供する。

10

【0008】

一つの態様において、本開示は、第二の抗原結合部分と会合された、第一の抗原結合部分を含む、二重特異性ポリペプチド複合体であって、ここで第一の抗原結合部分は、N-末端からC-末端へ、第一のT細胞受容体(TCR)定常領域(C1)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン(VH)を含む、第一のポリペプチド、及びN-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域(C2)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、第二のポリペプチドを含み、ここで、C1及びC2は、C1に含まれる第一の変異された残基とC2に含まれる第二の変異された残基の間に、少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、二量体を安定化することが可能であり、並びに第一の抗体は、第一の抗原特異性を有し、第二の抗原結合部分は、第一の抗原特異性とは異なる第二の抗原特異性を有し、並びに、第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然Fab対応物である場合の別のものよりも、誤対形成する傾向が少ない、二重特異性ポリペプチド複合体を提供する。

20

【0009】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、第一の抗原特異性とは異なる第二の抗原特異性を有する第二の抗原結合部分に会合された、第一の抗原特異性を有する本明細書に提供されるポリペプチド複合体を含む第一の抗原結合部分を含む、二重特異性ポリペプチド複合体を提供し、並びに第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然Fab対応物である場合の別のものよりも、誤対形成する傾向が少ない。

30

【0010】

一つの態様において、本開示は、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体の二重特異性の断片を提供する。

【0011】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、部分へコンジュゲートされた、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を含む、コンジュゲートを提供する。

40

【0012】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体をコードしている単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドを含む単離されたベクターを提供する。

【0014】

50

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供される単離されたポリヌクレオチド、又は本明細書に提供される単離されたベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0015】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供される宿主細胞を、ポリペプチド複合体、又は二重特異性ポリペプチド複合体が発現される条件下で培養することを含む、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を発現する方法を提供する。

【0016】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体を作製する方法であって、a) 宿主細胞へ、N-末端からC-末端へ、第一のTCR定常領域(C1)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン(VH)を含む第一のポリペプチドをコードしている第一のポリヌクレオチド、及びN-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域(C2)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む第二のポリペプチドをコードしている第二のポリヌクレオチド：を導入する工程であって、ここで、C1及びC2は、C1に含まれる第一の変異された残基とC2に含まれる第二の変異された残基の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、C1及びC2の二量体を安定化することが可能であり、並びに、第一の抗体は、第一の抗原特異性を有する工程；b) 宿主細胞にポリペプチド複合体を発現させる工程：を含む方法を提供する。

【0017】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を作製する方法であって、a) 宿主細胞へ、N-末端からC-末端へ、第一のTCR定常領域(C1)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン(VH)を含む第一のポリペプチドをコードしている第一のポリヌクレオチド、N-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域(C2)へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む第二のポリペプチドをコードしている第二のポリヌクレオチド、第二の抗体のVHを含む第三のポリペプチドをコードしている第三のポリヌクレオチド、及び第二の抗体のVLを含む第四のポリペプチドをコードしている第四のポリヌクレオチド：を導入する工程であって、ここで、C1及びC2は、C2間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、この二量体を安定化することが可能であり、並びに、第一の抗体は、第一の抗原特異性を有し、及び第二の抗体は第二の抗原特異性を有する工程；b) 宿主細胞に二重特異性ポリペプチド複合体を発現させる工程：を含む方法を提供する。

【0018】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を作製する方法は、ポリペプチド複合体を単離する工程を更に含む。

【0019】

一つの態様において、本開示は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を含有する組成物を提供する。

【0020】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体、及び医薬として許容し得る担体を含有する医薬組成物を提供する。

【0021】

一つの態様において、本開示は、本明細書において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、又は本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体の治療的有効量を対象へ投与することを含む、それを必要とする対象の状態を治療する方法を提供する。特定の実施態様において、この状態は、第一の抗原及び第二の抗原が両方共調節(modulate)される場合に、緩和、除去、治療、又は予防され得る。

【0022】

特定の実施態様において、非天然型鎖間結合は、C 1に含まれる第一の変異された残基と、C 2に含まれる第二の変異された残基の間に形成される。特定の実施態様において、第一及び第二の変異された残基の少なくとも1つは、システイン残基である。

【0023】

特定の実施態様において、非天然型鎖間結合は、ジスルフィド結合である。

【0024】

特定の実施態様において、第一の変異された残基は、C 1の接触境界面内に含まれ、及び／又は第二の変異された残基は、C 2の接触境界面内に含まれる。

【0025】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型システイン残基は、C 1及び／又はC 2内に存在しないか又は存在する。特定の実施態様において、操作されたC B e t aの位置C 7 4で天然型システイン残基は、存在しないか又は存在する。特定の実施態様において、天然型C 7 4は、C B e t a中には存在しない。

【0026】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型N－グリコシル化部位は、C 1及び／又はC 2内に存在しないか又は存在する。特定の実施態様において、天然型N－グリコシル化部位は、C 1及び／又はC 2内に存在しない。

【0027】

特定の実施態様において、二量体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれよりも多い非天然型鎖間結合を含む。特定の実施態様において、少なくとも1つの非天然型鎖間結合は、ジスルフィド結合である。特定の実施態様において、二量体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれよりも多いジスルフィド結合を含む。

【0028】

特定の実施態様において、a) C 1は、操作されたC B e t aを含み、且つC 2は、操作されたC A l p h aを含むか；b) C 1は、操作されたC A l p h aを含み、且つC 2は、操作されたC B e t aを含むか；c) C 1は、操作されたC B e t aを含み、且つC 2は、操作されたC P r e－A l p h aを含むか；d) C 1は、操作されたC P r e－A l p h aを含み、且つC 2は、操作されたC B e t aを含むか；e) C 1は、操作されたC G a m m aを含み、且つC 2は、操作されたC D e l t aを含むか；又はf) C 1は、操作されたC D e l t aを含み、且つC 2は、操作されたC G a m m aを含む。

【0029】

特定の実施態様において、第一のV Hは、第一の接続(conjunction)ドメインで、C 1へ機能的に連結され、及び第一のV Lは、第二の接続ドメインで、C 2へ機能的に連結される。特定の実施態様において、第一のV Hは、コネクターを介して、第一の接続ドメインでC 1へ会合し、第一のV Lは、コネクターを介して、第二の接続ドメインでC 2へ会合する。

【0030】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の接続ドメインは、抗体V／C接続のC末端断片の適切な長さ（例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基）、及びT C R V／C接続のN末端断片の適切な長さ（例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基）を含む。

【0031】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、アミノ酸残基9－35、52－66、71－86及び122－127からなる群から選択された接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含み；及び／又は、操作されたC A l p h aは、アミノ酸残基6－29、37－67、及び86－95からなる群から選択された接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含む。

【0032】

10

20

30

40

50

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、S 5 6 C、S 1 6 C、F 1 3 C、V 1 2 C、E 1 4 C、L 6 2 C、D 5 8 C、S 7 6 C、及びR 7 8 Cから選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含み、並びに／又は操作されたC A l p h aは、T 4 9 C、Y 1 1 C、L 1 3 C、S 1 6 C、V 2 3 C、Y 4 4 C、T 4 6 C、L 5 1 C、及びS 6 2 Cから選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含む。

【0033】

特定の実施態様において、操作されたC B e t a及び操作されたC A l p h aは、C B e t a中のS 1 6 C及びC A l p h a中のY 1 1 C、C B e t a中のF 1 3 C及びC A l p h a中のL 1 3 C、C B e t a中のS 1 6 C及びC A l p h a中のL 1 3 C、C B e t a中のV 1 2 C及びC A l p h a中のS 1 6 C、C B e t a中のE 1 4 C及びC A l p h a中のS 1 6 C、C B e t a中のF 1 3 C及びC A l p h a中のV 2 3 C、C B e t a中のL 6 2 C及びC A l p h a中のY 4 4 C、C B e t a中のD 5 8 C及びC A l p h a中のT 4 6 C、C B e t a中のS 7 6 C及びC A l p h a中のT 4 6 C、C B e t a中のS 5 6 C及びC A l p h a中のT 4 9 C、C B e t a中のS 5 6 C及びC A l p h a中のL 5 1 C、C B e t a中のS 5 6 C及びC A l p h a中のS 6 2 C、並びにC B e t a中のR 7 8 C及びC A l p h a中のS 6 2 Cからなる群から選択されるアミノ酸残基の対と置換する変異されたシステイン残基の対を含み、且つここでシステイン残基の対は、非天然型鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

【0034】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型グリコシル化部位は、操作されたC B e t a中及び／又は操作されたC A l p h a中に、存在しないか又は存在する。

【0035】

特定の実施態様において、操作されたC B e t a中の天然型グリコシル化部位は、N 6 9であり、及び／又は操作されたC A l p h a中の天然型グリコシル化部位（複数）は、N 3 4、N 6 8、N 7 9、及び任意のそれらの組合せから選択される。

【0036】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、天然型C B e t aのアミノ酸残基101-117を包含するF Gループ及び／又は天然型C B e t aのアミノ酸残基66-71を包含するD Eループを欠くか又は保持する。

【0037】

特定の実施態様において、操作されたC A l p h aは、配列番号：43-48のいずれかひとつを含み、及び／又は操作されたC B e t aは、配列番号：33-41及び306のいずれかひとつを含む。

【0038】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC B e t aを含み、及びC 2は、操作されたC A l p h aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：49もしくは50を含むかもしくはこれであり、並びに／又は第二の接続ドメインは、配列番号：51もしくは52を含むかもしくはこれである。

【0039】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC A l p h aを含み、及びC 2は、操作されたC B e t aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：129もしくは130を含むかもしくはこれであり、並びに／又は第二の接続ドメインは、配列番号：49もしくは50を含むかもしくはこれである。

【0040】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、アミノ酸残基9-35、52-66、71-86及び122-127からなる群から選択される接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含み；並びに／又は、操作されたC P r e - A l p h aは、アミノ酸残基7-19、26-34、56-75及び103-106からなる群から選択される接触境界面内に変異されたシステイン残基を含む。

【0041】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、S 1 6 C、A 1 8 C、E 1 9 C、F 1 3 C、A 1 1 C、S 5 6 C、及びS 7 6 Cから選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含み、並びに／又は、操作されたC P r e - A l p h aは、S 1 1 C、A 1 3 C、I 1 6 C、S 6 2 C、T 6 5 C、及びY 5 9から選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含む。

【0042】

特定の実施態様において、操作されたC B e t a及び操作されたC P r e - A l p h aは、C B e t a中のS 1 6 C及びC P r e - a l p h a中のS 1 1 C、C B e t a中のA 1 8 C及びC P r e - A l p h a中のS 1 1 C、C B e t a中のE 1 9 C及びC P r e - A l p h a中のS 1 1 C、C B e t a中のF 1 3 C及びC P r e - A l p h a中のA 1 3 C、C B e t a中のS 1 6 C及びC P r e - A l p h a中のA 1 3 C、C B e t a中のA 1 1 C及びC P r e - A l p h a中のI 1 6 C、C B e t a中のS 5 6 C及びC P r e - A l p h a中のS 6 2 C、C B e t a中のS 5 6 C及びC P r e - A l p h a中のT 6 5 C、並びにC B e t a中のS 7 6 C及びC P r e - A l p h a中のY 5 9 Cからなる群から選択されるアミノ酸残基の対と置換する変異されたシステイン残基の対を含み、並びにここで、変異されたシステイン残基の対は、非天然型鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

10

【0043】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型グリコシル化部位は、操作されたC B e t a中及び／又は操作されたC P r e - A l p h a中に存在しない。

20

【0044】

特定の実施態様において、操作されたC B e t a中の非存在又は存在のグリコシル化部位は、N 6 9であり、及び／又は操作されたC P r e - A l p h a中の非存在のグリコシル化部位は、N 5 0である。

【0045】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、天然型C B e t aのアミノ酸残基1 0 1 - 1 0 7を包含するF G ループ及び／又は天然型C B e t aのアミノ酸残基6 6 - 7 1を包含する位置のD E ループを欠くか又は保持する。

【0046】

特定の実施態様において、操作されたC P r e - A l p h aは、配列番号：8 2、8 3、及び3 1 1 - 3 1 8のいずれか一つを含み；及び／又は、操作されたC B e t aは、配列番号：8 4、3 3 - 4 1、及び3 1 9 - 3 2 4のいずれか一つを含む。

30

【0047】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC B e t aを含み、及びC 2は、操作されたC P r e - A l p h aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：4 9もしくは5 0を含み、及び／又は第二の接続ドメインは、配列番号：8 1もしくは1 3 1を含む。

【0048】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC P r e - A l p h aを含み、及びC 2は、操作されたC B e t aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：1 3 2もしくは1 3 3を含み、及び／又は第二の接続ドメインは、配列番号：4 9もしくは5 0を含む。

40

【0049】

特定の実施態様において、操作されたC D e l t aは、アミノ酸残基8 - 2 6、4 3 - 6 4、及び8 4 - 8 8からなる群から選択される接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含み；並びに／又は、操作されたC G a m m aは、アミノ酸残基1 1 - 3 5、及び5 5 - 7 6からなる群から選択される接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含む。

【0050】

特定の実施態様において、操作されたC G a m m aは、S 1 7 C、E 2 0 C、F 1 4 C

50

、T 1 2 C、M 6 2 C、Q 5 7 C、及びA 1 9 Cから選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含み、並びに／又は操作されたC D e l t aは、F 1 2 C、M 1 4 C、N 1 6 C、D 4 6 C、V 5 0 C、F 8 7 C、及びE 8 8 Cから選択された位置でアミノ酸残基と置換する変異されたシステイン残基を含む。

【0051】

特定の実施態様において、操作されたC G a m m a及び操作されたC D e l t aは、C G a m m a中のS 1 7 C及びC D e l t a中のF 1 2 C、C G a m m a中のE 2 0 C及びC D e l t a中のF 1 2 C、C G a m m a中のF 1 4 C及びC D e l t a中のM 1 4 C、C G a m m a中のT 1 2 C及びC D e l t a中のN 1 6 C、C G a m m a中のM 6 2 C及びC D e l t a中のD 4 6 C、C G a m m a中のQ 5 7 C及びC D e l t a中のV 5 0 C、C G a m m a中のA 1 9 C及びC D e l t a中のE 8 8 C、並びにC G a m m a中のA 1 9 C及びC D e l t a中のF 8 7 Cからなる群から選択されるアミノ酸残基の対と置換する変異されたシステイン残基の対を含み、並びにここで、導入されたシステイン残基の対は、鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

10

【0052】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型グリコシル化部位は、操作されたC G a m m a中及び／又は操作されたC D e l t a中に存在しないか又は存在する。

【0053】

特定の実施態様において、操作されたC G a m m a中の天然型グリコシル化部位は、N 6 5であり、及び／又は操作されたC D e l t a中の天然型グリコシル化部位（複数）は、N 1 6及びN 7 9の一方又は両方である。

20

【0054】

特定の実施態様において、操作されたC G a m m aは、配列番号：1 1 3、1 1 4、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 6、3 3 7、3 3 8、3 3 9、もしくは3 4 0を含み、及び／又は操作されたC D e l t aは、配列番号：1 1 5、1 1 6、3 1 0、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、もしくは3 3 2を含む。

【0055】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC G a m m aを含み、及びC 2は、操作されたC D e l t aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：1 1 7もしくは1 1 8を含み、及び／又は第二の接続ドメインは、配列番号：1 1 9もしくは1 2 0を含む。

30

【0056】

特定の実施態様において、C 1は、操作されたC D e l t aを含み、及びC 2は、操作されたC G a m m aを含み；並びにここで、第一の接続ドメインは、配列番号：1 2 3もしくは1 2 4を含み、及び／又は第二の接続ドメインは、配列番号：1 2 5もしくは1 2 6を含む。

【0057】

特定の実施態様において、第一のポリペプチドは、抗体C H 2ドメイン、及び／又は抗体C H 3ドメインを更に含む。

【0058】

特定の実施態様において、第一の抗原特異性及び第二の抗原特異性は、2つの異なる抗原に対し向けられるか、又は1つの抗原上の2つの異なるエピトープに対し向けられる。

40

【0059】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は、C D 3に結合する。特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、C D 1 9に結合する。特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は、C D 1 9に結合する。特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、C D 3に結合する。

【0060】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は、C T L A - 4に結合する。特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、P D - 1に結合する。特定の実施態様において

50

、第一の抗原結合部分は、P D - 1 に結合する。特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、C T L A - 4 に結合する。

【0061】

特定の実施態様において、会合は、コネクター、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、もしくは疎水性-親水性相互作用、又はそれらの組合せを介してである。

【0062】

特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、第二の抗原特異性を有する第二の抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。

【0063】

特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、F a b を含む。

10

【0064】

特定の実施態様において、第一の抗原特異性及び第二の抗原特異性は、2つの異なる抗原に対し向けられるか、又は一つの抗原上の2つの異なるエピトープに対し向けられる。

【0065】

特定の実施態様において、第一及び第二の抗原特異性の一方は、T細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK細胞）特異性受容体分子に対し向けられ、且つ他方は、腫瘍関連抗原に対し向けられる。

【0066】

特定の実施態様において、第一及び第二の抗原特異性の一方は、C D 3 に対し向けられ、且つ他方は、腫瘍関連抗原に対し向けられる。

20

【0067】

特定の実施態様において、第一及び第二の抗原特異性の一方は、C D 3 に対し向けられ、且つ他方は、C D 1 9 に対し向けられる。

【0068】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は更に、第一の二量体形成ドメインを含み、且つ第二の抗原結合部分は更に、第二の二量体形成ドメインを含み、ここで第一及び第二の二量体形成ドメインは会合されている。

【0069】

特定の実施態様において、会合は、コネクター、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、もしくは疎水性-親水性相互作用、又はそれらの組合せを介してである。

30

【0070】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の二量体形成ドメインは、任意に I g G 1、I g G 2 又は I g G 4 に由来した抗体ヒンジ領域の少なくとも一部分を含む。

【0071】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の二量体形成ドメインは、二量体形成ドメインを更に含む。特定の実施態様において、二量体形成ドメインは、抗体ヒンジ領域の少なくとも一部、抗体 C H 2 ドメイン、及び／又は抗体 C H 3 ドメインを含む。

【0072】

特定の実施態様において、第一の二量体形成ドメインは、第三の接続ドメインで第一の T C R 定常領域（C 1）へ機能的に連結される。

40

【0073】

特定の実施態様において、a) C 1 は、操作された C B e t a を含み、且つ第三の接続ドメインは、配列番号：53又は54に含まれ；b) C 1 は、操作された C A l p h a を含み、且つ第三の接続ドメインは、配列番号：134、135、140又は141に含まれ；c) C 1 は、操作された C P r e - A l p h a を含み、且つ第三の接続ドメインは、配列番号：134、135、140又は141に含まれ；d) C 1 は、操作された C G a m m a を含み、且つ第三の接続ドメインは、配列番号：121又は122に含まれるか；あるいは、e) C 1 は、操作された C D e l t a を含み、且つ第三の接続ドメインは、配列番号：127又は128に含まれる。

【0074】

50

特定の実施態様において、第二の二量体形成ドメインは、第二の抗原結合部分の重鎖可変ドメインに機能的に連結される。

【0075】

特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、異なり、且つホモ二量体形成を妨げ、及び／又はヘテロ二量体形成に有利に働く様式で会合している。

【0076】

特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、ヘテロ二量体へ、ノブイントゥホール、疎水性相互作用、静電的相互作用、親水性相互作用、又は増大した可動性を介して、会合することが可能である。

【0077】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は、キメラ定常領域へ機能的に連結されるVHを含む第一のポリペプチド、及びC2へ機能的に連結されるVLを含む第二のポリペプチドを含み、ここでキメラ定常領域及びC2は、配列番号：177/176、179/178、184/183、185/183、180/176、181/178、182/178、184/186、185/186、188/187、196/187、190/189、192/191、192/193、195/194、198/197、200/199、202/201、203/201、203/204、205/204、206/204、208/207、208/209、211/210、213/212、213/215、213/151、214/212、214/151、232/231、216/215、218/217、220/219、222/221、224/223、226/225、227/223、229/228、229/230、236/235及び238/237からなる群から選択される配列の対を含む。

【0078】

特定の実施態様において、第一の抗原性は、CD3に対し向けられ、且つ第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドは、配列番号：2/1、3/4、5/1、6/3、7/3、9/8、10/8、9/11、10/11、13/12、15/14、17/16、17/18、20/19、21/12、65/64、67/66、69/68、70/68、70/71、72/71、73/71、75/74、75/76、78/77、86/85、90/89、91/92、94/93、96/95、98/97、99/95、101/100、101/102、106/105、108/107、110/109、112/111、137/136、138/136、137/139及び138/139からなる群から選択される配列の対を含む。

【0079】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、配列番号：22/12/24/23、25/12/26/23、及び25/12/27/23からなる群から選択される4つの配列組合せを含み、ここで第一の抗原結合部分は、CD3へ結合することが可能であり、且つ第二の抗原結合部分は、CD19へ結合することが可能である。

【0080】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、Fab、(Fab)₂、ビボディ、トリボディ、トリFab、タンデム連結Fab、Fab-Fv、タンデム連結Vドメイン、タンデム連結scFv、及び他のフォーマットで作製することができる。

【0081】

別の態様において、本開示は、疾患又は状態の検出、診断、予後判定、又は治療のための、本明細書に提供されるポリペプチド複合体を含むキットを提供する。

【0082】

前記及び他の本発明の特徴及び利点は、添付図面を参照し進める以下のいくつかの実施態様の詳細な説明から、より明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0083】

【図1】図1は、試験した抗体フォーマットの概略図を表す。抗-CD3抗体T3及び抗-CD19抗体U4の両方を開発した。T3の定常領域（CL及びCH1）を、TCRの定常ドメインと置き換え、通常の抗体に直交する独自の軽鎖-重鎖境界面を設計した。Fcドメイン中の「ノブイントゥホール」変異による接続内のTCR-修飾したT3及び天然型U4を使用し、二重特異性の抗体フォーマットE17及びF16を設計した。

【図2A-2D】図2A-2Dは、抗体Fvモデル及びTCR構造の重ねたポーズを表し、抗体FvとTCR定常領域の融合の指針を提供する。図2Aは、研究室内で開発した抗-CD3抗体T3の配列を基に構築された抗体Fv構造モデルを表す。図2Bは、PDB 4L4T由来のTCR構造を表す。図2Cは、異なる配向でTCR可変領域上に重ねた抗体Fv構造モデルを表す。ラフなキメラタンパク質は、図2Dに示したように、重ねたポーズのTCR可変ドメインを除去することにより、作製した。この接続領域中の重複した残基は、接続領域の設計を補助した。抗体VL鎖及びTCRアルファ鎖は、白色で色づけした。VH鎖及びベータ鎖は、黒色に色づけした。

【図3A-3B】図3A-3Bは、TCR定常領域と抗体Fab定常領域の間の比較を示す。図3Aは、PDB 4L4T由来のTCR結晶構造を示す。図3Bは、T3モデルのFvドメイン及びPDB 5DK3由来の抗体の定常ドメインにより作製された抗体Fab構造モデルを示す。TCRの定常ドメインと抗体Fabの定常ドメインの間のFGループ及びDEループの明らかな差異は、側鎖残基全てを表示することによりマークした。

【図4】図4は、CALpha鎖及びCBeta鎖とのTCR-抗体のキメラ抗体の脱グリコシル化変異体のSDS-PAGE結果を示す。試料は、全てExpi293発現の生成物から収集した上清であった。レーン1、3、5、7及び9は、各々、Design_2-QQQQ、Design_2-AAAA、Design_2-QSKE、Design_2-ASKE及びDesign_2-QQQQQの非還元PAGEである。レーン2、4、6、8及び10は、対応する還元PAGEである。

【図5】図5は、CD3-発現したJurkat細胞に結合する全ての脱グリコシル化された変異体の用量依存的FACS結合を示す。全ての試料は、Expi293において発現された脱グリコシル化変異体の収集した上清であった。野生型抗-CD3抗体（T3-IgG1）を、陽性対照として使用した。

【図6A-6B】図6A-6Bは、IgG1（図6A）及びIgG4（図6B）アイソタイプにおける抗体T3及びU4の鎖誤対形成試験のSDS-PAGE結果を示す。レーン1-2は、各々、T3_light-U4_heavy及びT3_heavy-U4_lightの対である。レーン3-4は、レーン1-2と同じ対の順番であるが、TCR定常領域を用い修飾したT3を伴う。両方の図におけるレーン1-4は、非還元試料であり、レーン5-8は、対応する還元試料である。

【図7A-7B】図7A-7Bは、（図7A）IgG1及び（図7B）IgG4における精製された二重特異性抗体E17-Design_2-QQQQのSDS-PAGE結果を示す。IgG1アイソタイプは、3工程精製により精製した：プロテインAクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー（IEC）及びサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）。IgG4は、2工程精製後に得た：プロテインAクロマトグラフィー及びSEC。図7C-7Dは、試料の純度を決定するための、IgG1（図7C）及びIgG4（図7D）の精製した試料に関するSEC-HPLCデータを示す。

【図8】図8は、Ni Sepharose(商標)エクセルクロマトグラフィーにより精製した、6×Hisタグを持つキメラT3のFab断片のSDS-PAGE結果を示す。レーン1及び3は、T3-Fab-Design_2.his1のバンドであり、レーン2及び4は、T3-Fab-Design_2.his2のバンドである。

【図9】図9は、TCR-修飾したキメラT3のFab断片の用量依存的FACS結合を図示している。野生型T3抗体の一価型（T3-Fab-IgG4）を、陽性対照として使用した。通常のヒトIgG4抗体を、陰性対照として使用した。

【図10A-10B】図10A-10Bは、設計された二重特異性抗体E17-Desi

10

20

30

40

50

g n__2-QQQQのCD3+Jurkat細胞への用量依存的FACS結合を示す。野生型抗体T3及びU4、並びにそれらの一価型を、陽性対照として使用し（図10A）、並びに図10BはCD19+Ramos細胞に関する。IgG1及びIgG4の両方のアイソタイプを試験した。無関係のヒトIgG1又はIgG4抗体を、陰性対照として使用した。

【図11A-11B】図11A-11Bは、2種の設計された二重特異性抗体E17-Design__2-QQQQ及びF16-Design__2-QQQQの、Jurkat細胞上のCD3（図11A）及びRamos細胞上に発現されたCD19（図11B）へのFACS結合の比較を示す。IgG1及びIgG4の両方のアイソタイプにおける二重特異性抗体を、試験した。通常のヒトIgG1又はIgG4抗体を、陰性対照として使用した。

10

【図12】図12は、IgG1及びIgG4の両方において設計された二重特異性抗体E17-Design__2-QQQQにより媒介された、悪性B細胞を死滅するように方向付けられたT細胞の細胞傷害性アッセイを図示している。親の単一特異性の抗-CD3抗体（T3-IgG4）、抗-CD19（U4-IgG）抗体及び無関係のヒトIgG1抗体を、陰性対照として使用した。

【図13】図13は、T細胞エンゲージ悪性B細胞死滅の媒介における、2種の設計された二重特異性抗体E17-Design__2-QQQQ及びF16-Design__2-QQQQの活性を比較する。無関係のヒトIgG抗体を、陰性対照として使用した。

【図14A-14B】図14A-14Bは、非還元条件（図14A）及び還元条件（図14B）での、二重特異性抗体E17-Design__2-QQQQのデコンボリューションされた質量スペクトルを示す。図14Aにおける148180.53のピークは、インタクトなWuXiBodyの正確な分子量である。22877Daのピークは、図14Bの還元質量スペクトルにおいて認められた軽鎖を示している。図14Aの149128.45Daの小さいピークは、軽鎖上に配置されたO-グリコシル化（およそ（947.92Daより大きい））であると推定され、図14Bにおいて示された。

20

【図15A-15B】図15A-15Bは、SDS-PAGEにより特徴付けられたアルファ/ベータ境界面での抗体発現における鎖間ジスルフィド結合の役割を示す。図15Aは、CA lphaとCB etaの間に鎖間ジスルフィド結合を含む抗体を示し；図15Bは、CA lphaとCB etaの間に鎖間ジスルフィド結合を伴わない抗体を示し；レーン1及び3は、各々、導入されたジスルフィド結合の有及び無のDesign__2-QQQQ-IgG4の非還元PAGE結果である。レーン2及び4は、各々、導入されたジスルフィド結合の有及び無のDesign__2-QQQQ-IgG4の還元PAGE結果である。

30

【図16】図16は、プレーアルファ/ベータ境界面で設計されたジスルフィド結合のSDS-PAGEを示す。レーン1及び2は、各々、非還元条件で処理した、「Design__5__Pre__TCR__Conjunction'1__Cys13」及び「Design__6__Pre__TCR__Conjunction'1__Cys14」である。レーン4及びレーン5は、各々、還元条件で処理した、「Design__5__Pre__TCR__Conjunction'1__Cys13」及び「Design__6__Pre__TCR__Conjunction'1__Cys14」である。

40

【図17A-17B】図17A-17Bは、デルタ/ガンマ境界面で設計されたジスルフィド結合のSDS-PAGEを示す。レーン6及びレーン8は、各々、「Design__2__Cys5__no__Glyco」及び「Design__2__hypeCys2__no__Glyco」である。図17Aは、非還元SDS-PAGEである。図17Bは、還元SDS-PAGEである。

【図18A-18E】図18Aは、天然型TCRアルファ鎖配列及び変異されたシステイン残基を伴うその対応物の配列を示す。TRAC__Humanは、アルファ鎖定常領域の天然配列である。4L4T__Alpha__Crystalは、鎖間ジスルフィド結合を形成することができるS55C変異を伴う結晶構造の配列（PDBコード4L4T）である

50

。灰色領域は、本発明においてキメラタンパク質の骨格として使用した定常領域である。図18Bは、天然型TCRベータ鎖配列及び変異されたシステイン残基を伴うその対応物の配列を示す。TRBC1__Human及びTRBC2__Humanは、ベータ定常領域の天然配列である。図18Cは、天然型TCRプレールファ鎖配列を示す。PTCRA__Humanは、プレールファ鎖定常領域の天然配列である（プレールファ鎖のみは可変領域を持たない）。3OF6__PreAlpha__Crystalは、結晶構造の配列（PDBコード3OF6）である。灰色領域は、番号付けを規定するために先に使用した定常領域である。図18Dは、天然型TCRデルタ鎖の配列を示す。TRA@__Humanは、デルタ定常領域の天然配列である。4LFH__Delta__Crystalは、結晶構造のデルタ鎖配列（PDBコード4LFH）の定常領域である。灰色領域は、番号付けを規定するために先に使用した定常領域である。図18Eは、天然型TCRガンマ鎖の配列を示す。TRGC1__Human及びTRGC2__Humanは、ガンマ定常領域の天然配列である。4LFH__Gamma__Crystalは、結晶構造のガンマ鎖配列（PDBコード4LFH）の定常領域である。灰色領域は、番号付けを規定するために先に使用した定常領域である。

10

【図19A-19E】図19A-19Eは、TCR定常領域の配列及び番号付けを示す。図19Aは、TCRアルファ定常領域の配列及び番号付けを示す。図19Bは、TCRベータ定常領域の配列及び番号付けを示す。図19Cは、TCRプレールファ定常領域の配列及び番号付けを示す。図19Dは、TCRデルタ定常領域の配列及び番号付けを示す。図19Eは、TCRガンマ定常領域の配列及び番号付けを示す。

20

【図20A-20D】図20A-20Dは、IgG1及びIgG4のノブイントゥホールの配列及び番号付けを示す。図20Aは、IgG1「ノブ」変異の配列及び番号付けを示す。図20Bは、IgG4「ノブ」変異の配列及び番号付けを示す。図20Cは、IgG1「ホール」変異の配列及び番号付けを示す。図20Dは、IgG4「ホール」変異の配列及び番号付けを示す。

【図21A-21B】図21A-21Bは、ELISAによる、ヒトC1Qへの、IgG4（図21A）及び野生型IgG1（図21B）の両方のフォーマットにおけるE17-Design__2-QQQQの結合を示す。ヒトIgG1抗体を、対照として使用した。

【図22】図22は、4種の対称性のWuXiBodyフォーマットG19、G19R、G25及びG25Rの概略的説明を示す。フォーマットG19及びG25に関して、2種のTCR-含有キメラFab-様ドメインは、各々、正常抗体のC-末端及びN-末端でグラフトされた。長方形は、TCR定常ドメインを示し、且つ楕円形は、抗体の可変ドメイン及び定常ドメインを示す。フォーマットG19及びG19R又はG25及びG25Rの間の差は、正常Fab及びキメラFabのスイッチされた位置である。これらのフォーマットは、異なる抗体対からの異なる可変領域を収容することができ、通常分子量およそ240~250kDを有する。

30

【図23A-23B】図23A-23Bは、G19フォーマットの2種の精製された二重特異性抗体のSDS-PAGE（図23A）及びSEC-HPLC（図23B）の特徴を示す。SDS-PAGEにおけるレーン番号は、SEC-HPLC図中の標示番号と一致する。レーン1及び2は、各々、T1U6及びU6T1抗体対である。T1U6において、T1（抗-CTLA-4）は、このフォーマットのN-末端上にあるのに対し、U6T1においては、U6（抗-PD-1）が、このフォーマットのN-末端上にある。両方の二重特異性分子は、プロテインAクロマトグラフィーにより精製し、純度およそ90%を達成した。

40

【図24A-24B】図24A-24Bは、ヒトPD-1（図24A）及びCTLA-4（図24B）操作された細胞への、G19フォーマットの精製されたU6T1及びT1U6抗体の用量依存的FACS結合を示す。IgG4抗体を、陰性対照として使用した。

【図25A-25B】図25A-25Bは、異なる対称性フォーマットのプロテインA精製した二重特異性抗体のSDS-PAGE（図25A）及びSEC-HPLC（図25B）の特徴を示す。レーン1-3は、各々、G19R、G25、及びG25Rフォーマット

50

のU6T1抗体対である。PCは、分子量250kDを有することがわかっている対照タンパク質である。これら3種の二重特異性分子は全て、純度90%以上を有した。SDS-PAGEのレーン番号は、SEC-HPLC図の標示番号に一致している。

【図26A-26B】図26A-26Bは、ヒトPD-1（図26A）及びCTLA-4（図26B）操作された細胞への、G19R、G25、及びG25Rフォーマットの精製されたU6T1二重特異性抗体の用量依存的FACS結合を示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図27A-27B】図27A-27Bは、各々、PD-1へのヒトPD-L1結合をブロックする（図27A）及びCTLA-4へのCD80結合をブロックする（図27B）ことへの、G19R、G25、及びG25Rフォーマットの設計された二重特異性抗体のFACS競合アッセイを示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図28A-28B】図28A-28Bは、異なる対称性フォーマットの、プロテインA精製された二重特異性抗体のSDS-PAGE（図28A）及びSEC-HPLC（図28B）特徴を示す。レーン1-4は、各々、G19、G19R、G25、及びG25RフォーマットのU6T5抗体対である。PCは、分子量250kDの対照タンパク質である。これら3種の二重特異性分子は全て、純度90%以上を有した。SDS-PAGEのレーン番号は、SEC-HPLC図の標示番号と一致している。

【図29A-29B】図29A-29Bは、ヒトPD-1（図29A）及びCTLA-4（図29B）操作された細胞への、G19、G19R、G25、及びG25Rフォーマットの精製された二重特異性抗体の用量依存的FACS結合を示す。ベンチマークの二重特異性の抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図30】図30は、2種の分子U6T5、G25及びU6T1、G25RのELISAデュアル結合アッセイを示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図31A-31B】図31A-31Bは、各々、ヒトPD-L1のPD-1への結合をブロックする（図31A）、及びCD80のCTLA-4への結合をブロックする（図31B）ことへの、設計された二重特異性抗体U6T5、G25及びU6T1、G25RのFACS競合アッセイを示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図32】図32は、軽鎖-重鎖スイッチしたキメラFab-様ドメインを持つ、3種の対称性のフォーマットG26、G27、及びG26Rの概略的説明を示す。

【図33A-33B】図33A-33Bは、G27及びG26Rフォーマットの、プロテインA-精製した二重特異性抗体のSDS-PAGE（図33A）及びSEC-HPLC（図33B）の特徴を示す。レーン1-2は、各々、G27及びG26RフォーマットのT4U6抗体対である。G26Rフォーマットのもののみ、精製後に純度90%を達成した。SDS-PAGEのレーン番号は、SEC-HPLC図の標示番号と一致している。

【図34A-34B】図34A-34Bは、ヒトPD-1（図34A）及びCTLA-4（図34B）操作された細胞への、G26Rフォーマットの精製された二重特異性T4U6抗体対の用量依存的FACS結合を示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体（BMK1、IgG1）を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図35A-35B】図35A-35Bは、G26フォーマットのプロテインA-精製した二重特異性U6T4抗体対のSDS-PAGE（図35A）及びSEC-HPLC（図35B）の特徴を示す。これは、精製後に純度90%を達成した。

【図36A-36D】図36A-36Dは、ヒトPD-1（図36A）及びCTLA-4（図36B）操作された細胞への、G26フォーマットの精製された二重特異性U6T4抗体対の用量依存的ELISA結合、並びにヒトPD-1（図36C）及びCTLA-4

10

20

30

40

50

(図36D) 操作された細胞への、G26フォーマットの精製された二重特異性U6T4抗体対の用量依存的FACS結合を示す。ベンチマークの二重特異性抗-CTAL-4×PD-1抗体(BMK1.IgG1)を対照として使用し、IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図37】図37は、カニクイザル-CD19形質移入された細胞株WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9及びCHO-K1親細胞株のフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

【図38】図38は、W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPのSDS-PAGEを示す。M：タンパク質マーカー；レーン1：W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP、非還元；レーン3：W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP、還元。

10

【図39】図39は、W3438-T3U4.F16-1.uIgG4のSEC-HPLCを示す。

【図40】図40は、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのSDS-PAGEを示す。M：タンパク質マーカー；レーン1：W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP、非還元；レーン2：W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP、還元。

【図41】図41は、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのSEC-HPLCを示す。

【図42A-42B】図42A-42Bは、FACSによる、Ramos細胞(図42A)及びJurkat細胞(図42B)への、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの結合を示す。

20

【図43A-43B】図43A-43Bは、FACSによる、Ramos細胞(図43A)及びJurkat細胞(図43B)への、W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPの結合を示す。

【図44】図44は、FACSによる、カニクイザル-CD19発現細胞への、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの結合を示す。

【図45】図45は、ELISAによる、カニクイザルCD3への、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの結合を示す。

【図46A-46B】図46A-46Bは、Ramos細胞(図46A)及びJurkat細胞(図46B)への結合により測定した、ヒトCD19及びCD3への、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの親和性を示す。

30

【図47A-47B】図47A-47Bは、CD19+細胞への、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP-媒介性CD3+細胞結合を示す(図47A)。無関係のIgGを、陰性対照として使用した(図47B)。

【図48A-48B】図48A-48Bは、Raji細胞を死滅するW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP媒介性T細胞の細胞傷害性活性(図48A)、及びRaji細胞を死滅するW3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP媒介性T細胞の細胞傷害性活性(図48B)を示す。

【図49A-49D】図49A-49Dは、CD19+標的細胞の存在又は非存在下での、T細胞上のCD69及びCD25発現を示す。CD4+T細胞サブセットにおけるCD69+発現T細胞の割合(図49A)；CD8+T細胞サブセットにおけるCD69発現T細胞の割合(図49B)；CD4+T細胞サブセットにおけるCD25発現T細胞の割合(図49C)；CD8+T細胞サブセットにおけるCD25発現T細胞の割合(図49D)。

40

【図50A-50D】図50A-50Dは、CD19+標的細胞の存在又は非存在下での、T細胞のIFN-γ及びTNF-αサイトカイン放出を示す。CD4+T細胞サブセットにおけるIFN-γの放出(図50A)；CD4+T細胞サブセットにおけるTNF-αの放出(図50B)；CD8+T細胞サブセットにおけるIFN-γの放出(図50C)；CD8+T細胞サブセットにおけるTNF-αの放出(図50D)。

50

【図51A-51B】図51A-51Bは、ヒト血清中のW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの安定性を示す。指定された日でのRamosへの血清中インキュベーションしたW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP試料の結合（図51A）；指定された日でのJurkatへの血清中インキュベーションしたW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP試料の結合（図51B）。

【図52】図52は、ELISAによるC1QへのW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの結合を示す。IgG1抗体を、対照として使用した。

【図53】図53は、Raji異種移植腫瘍を有する混合型PBMCヒト化マウスへの、異なる投与量でのW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの投与後の、腫瘍容積トレースを示す。データ点は、群平均を表し、エラーバーは、その平均の標準誤差（SEM）を表す。IgG4抗体を陰性対照として使用した。

10

【図54】図54は、カニクイザルにおけるW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの薬物動態を示す。2匹のサル由来の血清試料を、ELISAにより検出した。

【図55A-55B】図55A-55Bは、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの投薬前及び投薬後の両方を含む、サル#1（図55A）及びサル#2（図55B）由来の血清試料中の抗-薬物抗体（ELISAにより検出されたADA）を示す。

【図56A-56B】図56A-56Bは、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SPのSDS-PAGE特徴（M：タンパク質マーカー、PC：およそ250kDaの二重特異性抗体の陽性対照）（図56A）、並びにW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SPのSEC-HPLC特徴（図56B）を示す。

20

【図57】図57は、W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP、及びベンチマークの二重特異性抗-CTLA-4×PD-1抗体WBP324-BMK1.uIgG1.KDLの融解温度を示す。

【図58】図58は、ヒトPD-1操作された細胞への、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SPのFACS結合を示す。WBP324-BMK1.uIgG1.KDL、W324-BMK2.uIgG4、及びW324-BMK3.uIgG4は、ベンチマークの二重特異性抗-CTLA-4×PD-1抗体の異なる型である。WBP305-BMK1.IgG4は、抗-PD-1抗体である。IgG4抗体を陰性対照として使用した。

30

【図59】図59は、カニクイザルPD-1操作された細胞への、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SPのFACS結合を示す。WBP305-1.153.7.hAb及びWBP305-BMK1.IgG4は、抗-PD-1抗体である。IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図60】図60は、ヒトCTLA-4操作された細胞への、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SPのFACS結合を示す。WBP324-BMK1.uIgG1.KDL、W324-BMK2.uIgG4、及びW324-BMK3.uIgG4は、異なるベンチマークの二重特異性抗-CTLA-4×PD-1抗体である。WBP316-BMK1.IgG4は、抗-CTLA-4-1抗体であり。IgG4抗体を陰性対照として使用した。

40

【図61】図61は、カニクイザルCTLA-4操作された細胞への、W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP及びW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SPのFACS結合を示す。WBP324-BMK1.uIgG1.KDLは、ベンチマークの二重特異性抗-CTLA-4×PD-1抗体である。W3162-1.154.8-z35-IgG1K及びWBP316-BMK1.IgG4は、抗-CTLA-4抗体である。IgG4抗体を陰性対照として使用した。

【図62】図62は、SPRにより測定した、W3248-U6T5.G25-1.uI

50

g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の、 C T L A - 4 及び P D - 1 に対する結合親和性をまとめている。 W B P 3 1 6 - B M K 1 . I g G 4 は、抗 - C T L A - 4 - 1 抗体である。抗 - P D - 1 の親抗体を、対照として使用した。

【図 6 3】図 6 3 は、 P D - 1 操作された細胞へのヒト P D - L 1 タンパク質結合をブロックすることへの、 W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の F A C S 競合アッセイを示す。 W B P 3 2 4 - B M K 1 . u I g G 1 . K D L は、ベンチマークの二重特異性抗 - C T L A - 4 × P D - 1 抗体である。 W B P 3 0 5 5 _ 1 . 1 5 3 . 7 . h A b 及び W B P 3 0 5 - B M K 1 . I g G 4 は、抗 - P D - 1 抗体である。 I g G 4 抗体を陰性対照として使用した。

【図 6 4】図 6 4 は、 C D 8 0 操作された細胞へのヒト C T L A - 4 タンパク質結合をブロックすることへの、 W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の F A C S 競合アッセイを示す。 W B P 3 2 4 - B M K 1 . u I g G 1 . K D L は、ベンチマークの二重特異性抗 - C T L A - 4 × P D - 1 抗体である。 W 3 1 6 2 _ 1 . 1 5 4 . 8 - z 3 5 - I g G 1 K 及び W B P 3 1 6 - B M K 1 . I g G 4 は、抗 - C T L A - 4 抗体である。 I g G 4 抗体を陰性対照として使用した。

【図 6 5】図 6 5 は、 C D 8 0 操作された細胞へのカニクイザル C T L A - 4 タンパク質結合をブロックすることへの、 W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の F A C S 競合アッセイを示す。 W B P 3 2 4 - B M K 1 . u I g G 1 . K D L は、ベンチマークの二重特異性抗 - C T L A - 4 × P D - 1 抗体である。 W 3 1 6 2 _ 1 . 1 5 4 . 8 - z 3 5 - I g G 1 K 及び W B P 3 1 6 - B M K 1 . I g G 4 は、抗 - C T L A - 4 抗体である。 I g G 4 抗体を陰性対照として使用した。

【図 6 6】図 6 6 は、 W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の E L I S A デュアル結合アッセイを示す。 W B P 3 2 4 - B M K 1 . u I g G 1 . K D L は、ベンチマークの二重特異性抗 - C T L A - 4 × P D - 1 抗体である。 I g G 4 抗体を陰性対照として使用した。

【図 6 7】図 6 7 は、 C T L A - 4 及び P D - 1 への、 W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P 及び W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の F A C S デュアル結合を示す。 I g G 4 抗体を陰性対照として使用した。

【図 6 8 A - 6 8 B】図 6 8 A - 6 8 B は、ヒト C T L A - 4 及び P D - 1 への E L I S A デュアル結合により測定した、 1 4 日間の血清中の W 3 2 4 8 - U 6 T 5 . G 2 5 - 1 . u I g G 4 . S P の安定性（図 6 8 A）、並びにヒト C T L A - 4 及び P D - 1 への E L I S A デュアル結合により測定した、 1 4 日間の血清中の W 3 2 4 8 - U 6 T 1 . G 2 5 R - 1 . u I g G 4 . S P の安定性（図 6 8 B）を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 4 】

（発明の詳細な説明）

本開示の以下の説明は、本開示の様々な実施態様を例証することのみを意図している。従って、考察した具体的修飾は、本開示の範囲を限定するものとしては解釈されない。様々な同等物、変更、及び修飾を、本開示の範囲を逸脱することなく行うことができ、且つそのような同等の実施態様は本明細書に含まれると理解されるべきであることは、当業者には明らかであろう。刊行物、特許及び特許出願を含む、本明細書において引用した全ての参考文献は、それらの全体が参照により本明細書中に組み込まれている。

【 0 0 8 5 】

（定義）

【 0 0 8 6 】

冠詞(a、an及びthe)は、その冠詞の文法上の対象の 1 又は 2 以上（すなわち少なくとも 1 つ）を指すように本明細書において使用される。例えば、「ある(a)ポリペプチド複合体」は、 1 つのポリペプチド複合体又は 2 以上のポリペプチド複合体を意味する。

10

20

30

40

50

【0087】

本明細書において使用される用語「約」又は「およそ」は、参照の分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量又は長さに対し、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1%の量だけ変動する、分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量又は長さを指す。特定の実施態様において、用語「約」又は「およそ」は、数値に先行する場合、プラス又はマイナス15%、10%、5%、又は1%の範囲の値を示す。

【0088】

本開示を通じて、別に状況が必要としない限りは、語句「らを含む」、「を含む」及び「を含んでいる」は、言及された一つの工程もしくは要素、又は複数の工程もしくは要素の群を包含することを暗示するが、いずれか他の一つの工程もしくは要素、又は複数の工程もしくは要素の群を排除することは暗示しないことが理解されるであろう。「からなる」は、句「からなる」に続くものを含み、かつこれらに限定されることを意味する。従って、語句「からなる」は、列挙された要素は、必要又は強制であること、並びに他の要素は存在しないことを指摘している。「から本質的になる」は、その語句の後に列挙された任意の要素を含み、且つ列挙された要素に関する開示において特定された活性又は作用と干渉しないか又はこれに寄与しない他の要素に限定されることを意味する。従って語句「から本質的になる」は、列挙された要素は、必要又は強制されるが、他の要素は、任意であるか、もしくは列挙された要素の活性又は作用に影響を及ぼすかどうかに応じて存在しなくてもよいことを指摘している。

【0089】

本開示を通じての言及「一実施態様」、「ある実施態様」、「特別な実施態様」、「関連する実施態様」、「特定の实施態様」、「追加の実施態様」、もしくは「更なる実施態様」又はそれらの組合せは、その実施態様と結びつけて説明された特別な特性、構造又は特徴が、本開示の少なくとも一つの実施態様に含まれることを意味する。従ってこの明細書を通じて様々な場所で先行する句の出現は、必ずしも同じ実施態様に言及している全てではない。更に、特別な特性、構造、又は特徴は、1以上の実施態様においていずれか好適な様式で組み合わせられてよい。

【0090】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に利用され、アミノ酸残基のポリマー、又はアミノ酸残基の複数のポリマーの集成体を指す。これらの用語は、その中の1以上のアミノ酸残基が、対応する天然に生じるアミノ酸の人工的な化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、並びに天然に生じるアミノ酸ポリマー及び天然に生じないアミノ酸ポリマーに適用される。用語「アミノ酸」は、天然に生じる及び合成のアミノ酸、並びに天然に生じるアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸アナログ及びアミノ酸模倣物を指す。天然に生じるアミノ酸は、遺伝暗号によりコードされたもの、並びにその後修飾されるそれらのアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、ガンマーカルボキシグルタメート、及びオーホスホセリンなどである。アミノ酸アナログは、天然に生じるアミノ酸と同じ基本的化学構造を有する化合物、すなわち、水素に結合しているアルファ炭素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどを指す。そのようなアナログは、修飾されたR基（例えばノルロイシン）又は修飾されたペプチド骨格を有するが、依然天然に生じるアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アルファ炭素は、カルボニルなどの官能基に結合している第一の炭素原子を指す。ベータ炭素は、アルファ炭素に連結された第二の炭素原子を指し、このシステムは、ギリシャ文字によるアルファベットの順に炭素を命名し続ける。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に生じるアミノ酸と類似の様式で機能する化合物を指す。用語「タンパク質」は典型的には、大型のポリペプチドを指す。用語「ペプチド」は典型的には、短いポリペプチドを指す。ポリペプチド配列は通常、ポリペプチド配列の左側末端は、アミノ末端（N-末端）であり；ポリペプチド配列の右側末端は、カルボキシ末

端（C-末端）であるとして、記載される。本明細書において使用される「ポリペプチド複合体」は、特定の機能を実行するように会合されている1以上のポリペプチドを含む複合体を指す。特定の実施態様において、このポリペプチドは、免疫に関連している。

【0091】

本明細書において使用される用語「抗体」は、特定の抗原に結合する任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体、又は二重特異性（二価）抗体を包含している。天然型のインタクトな抗体は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含む。各重鎖は、可変領域（“H C V R”）並びに第一、第二、及び第三の定常領域（C H 1、C H 2 及び C H 3）からなる一方で、各軽鎖は、可変領域（“L C V R”）及び定常領域（C L）からなる。哺乳動物の重鎖は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ として分類され、並びに哺乳動物の軽鎖は、 λ 又は κ として分類される。抗体は、「Y字」型を有し、Y字の幹は、ジスルフィド結合を介して一緒に結合された2本の重鎖の第二及び第三の定常領域からなる。このY字の各アームは、単独の軽鎖の可変領域及び定常領域に結合された、単独の重鎖の可変領域及び第一の定常領域を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、抗原結合に寄与する。両方の鎖の可変領域は一般に、相補性決定領域（C D R）と称される、3つの超可変ループを含む（軽（L）鎖C D Rは、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含み、重（H）鎖C D Rは、H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3を含む）。抗体のC D R境界は、Kabat、Chothia、又はAl-Lazikaniの慣習に従い規定又は同定される(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C.ら、J Mol. Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C.及びLesk, A.M., J. Mol. Biol., 196,901 (1987); Chothia, C.ら、Nature. Dec 21-28; 342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A.ら、National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。これら3種のC D Rは、フレームワーク領域（F R）として公知のランキング配列(stretch)間に挟まれ、これらはC D Rよりもより高度に保存され、且つ超可変ループを支持するためにスカフォールドを形成する。H C V R及びL C V Rの各々は、4つのF Rを含み、C D R及びF Rは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順に配置される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。重鎖及び軽鎖の定常領域は、抗原結合には関与しないが、様々なエフェクター機能を発揮する。抗体は、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列をベースにしたクラスに割り当てられる。5種の抗体の主要なクラス又はアイソタイプは、I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mであり、これらは各々、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ 重鎖の存在により特徴付けられる。主要抗体クラスのいくつかは、I g G 1（ γ 1重鎖）、I g G 2（ γ 2重鎖）、I g G 3（ γ 3重鎖）、I g G 4（ γ 4重鎖）、I g A 1（ α 1重鎖）、又はI g A 2（ α 2重鎖）などのサブクラスに分けられる。

【0092】

本明細書において使用される抗体に関する用語「可変ドメイン」は、1以上のC D Rを含む抗体可変領域又はその断片を指す。可変ドメインは、インタクトな可変領域（H C V R又はL C V Rなど）を含んでよいが、これは、抗原への結合能力又は抗原結合部位の形成能力を依然保持しているインタクト未満の可変領域を含むことも可能である。

【0093】

本明細書において使用される用語「抗原結合部分」は、1以上のC D Rを含む抗体の部分から形成された抗体断片、又は抗原に結合するがインタクトな天然型抗体構造は含まない任意の他の抗体断片を指す。抗原結合部分の例は、可変ドメイン、可変領域、ダイアボディ、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ジスルフィド安定化されたF v断片（d s F v）、（d s F v）₂、二重特異性d s F v（d s F v－d s F v'）、ジスルフィド安定化されたダイアボディ（d s ダイアボディ）、多重特異性抗体、ラクダ化された単一ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、及び二価ドメイン抗体を含むが、これらに限定されるものではない。抗原結合部分は、親抗体が結合するものと同じ抗原への結合が可能である。特定の実施態様において、抗原結合部分は、1以上の異なるヒト抗体由来のフレームワーク領域にグラフトされた特定のヒト抗体由来の1以上のC D Rを含んでよい

。抗原結合部分のより多くの詳細なフォーマットについては、Spiessらの論文（2015(前掲)）、及びBrinkmanらの論文（mAbs, 9(2), pp.182-212 (2017)）に説明されており、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている。

【0094】

抗体に関連した「Fab」は、1本の重鎖の可変領域及び第一の定常領域へ、ジスルフィド結合により会合している1本の軽鎖（可変領域及び定常領域の両方）からなる抗体の部分を目指す。特定の実施態様において、軽鎖及び重鎖の両方の定常領域は、TCR定常領域で置き換えられる。

【0095】

「Fab'」は、ヒンジ領域の部分を含むFab断片を目指す。

【0096】

「F(ab')₂」は、Fab'の二量体を目指す。

【0097】

「ビボディ」は、scFvの、軽鎖（Fab-L-scFv）又はFd（Fab-H-scFv）のいずれかのC-末端への融合により形成された融合タンパク質を目指す。

【0098】

「トリボディ」は、scFvの、軽鎖及び重鎖の両方（Fab-(scFv)₂）への融合により形成された融合タンパク質を目指す。

【0099】

「WuXiBody」は、可溶性キメラタンパク質を、抗体の可変ドメイン及びTCRの定常ドメインと共に含む、二重特異性抗体であり、ここでTCR定常ドメインのサブユニット（アルファドメイン及びベータドメインなど）は、操作されたジスルフィド結合により連結されている。

【0100】

抗体に関する「フラグメントディフィカルト（Fd）」は、軽鎖と組合せられFabを形成することができる重鎖断片のアミノ末端の半分を目指す。

【0101】

抗体に関する「Fc」は、ジスルフィド結合により、第二の重鎖の第二及び第三の定常領域に結合した、第一の重鎖の第二（CH2）及び第三の（CH3）定常領域からなる抗体の部分を目指す。抗体のFc部分は、ADCC、及びCDCなど、様々なエフェクター機能に寄与するが、抗原結合においては機能しない。

【0102】

抗体に関する「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに連結する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、およそ25個のアミノ酸残基を含み、可動性があり、従って2つのN-末端の抗原結合領域が独立して動くようにする。

【0103】

本明細書において使用される「CH2ドメイン」は、慣習的番号付けスキームを使用し、例えばIgG抗体の約244アミノ酸から360アミノ酸まで広がる、重鎖分子の部分を含むことを指す（アミノ酸244から360、Kabat番号付けシステム；及び、アミノ酸231-340、EU番号付けシステム；Kabat, E.ら、U.S. Department of Health and Human Services, (1983)参照）。

【0104】

「CH3ドメイン」は、IgG分子のCH2ドメインから、C-末端まで広がり、且つおよそ108個のアミノ酸を含む。特定の免疫グロブリンクラス、例えばIgMは、更にCH4領域を含む。

【0105】

抗体に関する「Fv」は、完全な抗原結合部位を有する抗体の最も小さい断片を目指す。Fv断片は、1本の重鎖の可変ドメインに結合した1本の軽鎖の可変ドメインからなる。数多くのFvデザインが、提供されており：2つのドメイン間の会合が、導入されたジスルフィド結合により増強されるdsFv；並びに、1つのポリペプチドとして、2つのド

10

20

30

40

50

メインと一緒に結合するためにペプチドリンカーを使用し形成することができる、 $s c F v$ を含む。対応する免疫グロブリン重鎖又は軽鎖の可変ドメイン及び定常ドメインに会合された免疫グロブリン重鎖又は軽鎖の可変ドメインを含む $F v$ 構築体もまた、作製されている。 $F v$ はまた、多量体化され、ダイアボディ及びトリボディを形成している(Maynardら、Annu Rev Biomed Eng 2 339-376 (2000))。

【0106】

「 $s c F a b$ 」は、1本鎖 $F a b$ 断片($s c F a b$)の形成を生じる、ポリペプチドリンカーを介し軽鎖に連結された $F d$ を伴う融合ポリペプチドを指す。

【0107】

「 $T r i F a b$ 」は、 $F a b$ 機能を持ち、3つのユニットで構成された、三価の二重特異性融合タンパク質を指す。 $T r i F a b$ は、非対称性の $F a b$ -様部分に融合された2つの通常の $F a b$ を収容している。

【0108】

「 $F a b - F a b$ 」は、第一の $F a b$ アームの $F d$ 鎖の、第二の $F a b$ アームの $F d$ 鎖のN-末端への融合により形成された融合タンパク質を指す。

【0109】

「 $F a b - F v$ 」は、 $H C V R$ の $F d$ 鎖のC-末端への、並びに $L C V R$ の軽鎖のC-末端への融合により形成された融合タンパク質を指す。「 $F a b - d s F v$ 」分子は、 $H C V R$ ドメインと $L C V R$ ドメインの間のドメイン間ジスルフィド結合の導入により、形成されることができる。

【0110】

「 $m A b - F v$ 」又は「 $I g G - F v$ 」は、 $H C V R$ ドメインの1本の $F c$ 鎖のC-末端への、並びに個別に発現されたか又は他方のC-末端に融合されたかのいずれかの $L C V R$ ドメインへの融合により形成された融合タンパク質を指し、二重特異性の三価の $I g G - F v$ ($m A b - F v$) 融合タンパク質を生じ、ドメイン間ジスルフィド結合により安定化された $F v$ を伴う。

【0111】

「 $s c F a b - F c - s c F v_2$ 」及び「 $s c F a b - F c - s c F v$ 」は、一本鎖 $F a b$ の、 $F c$ 及びジスルフィド-安定化された $F v$ ドメインとの融合により形成された融合タンパク質を指す。

【0112】

「付け加えられた(appende) $I g G$ 」は、二重特異性の $(F a b)_2 - F c$ のフォーマットを形成するために、 $I g G$ へ融合された $F a b$ アームを伴う融合タンパク質を指す。これは、コネクターによるか又はよらずに、 $I g G$ 分子のC-末端又はN-末端に融合された $F a b$ を伴う「 $I g G - F a b$ 」又は「 $F a b - I g G$ 」を形成することができる。特定の実施態様において、付け加えられた $I g G$ は、 $I g G - F a b_4$ のフォーマットに更に修飾されることができる(Brinkmanら、2017、前掲参照)。

【0113】

「 $D V D - I g$ 」は、第二の特異性の追加の $H C V R$ ドメイン及び $L C V R$ ドメインの、 $I g G$ 重鎖及び軽鎖への融合により形成された、デュアル-可変ドメイン抗体を指す。「 $C O D V - I g$ 」は、2つの $H C V R$ ドメイン及び2つの $L C V R$ ドメインが、可変 $H C V R - L C V R$ ドメインのクロスオーバー対形成を可能にする様式で連結されている、関連したフォーマットを指し、これは(N-末端からC-末端へ) 順番 $H C V R A - H C V R B$ 及び $L C V R B - L C V R A$ 、又は順に $H C V R B - H C V R A$ 及び $L C V R A - L C V R B$ のいずれかで配置される。

【0114】

「 $C r o s s M a b$ 」は、未修飾の軽鎖の対応する未修飾の重鎖との対形成、並びに修飾した軽鎖の対応する修飾した重鎖との対形成の技術を指し、その結果軽鎖における誤対形成が減少した抗体を生じる。

【0115】

10

20

30

40

50

「B i T E」は、H C V R－L C V R配向で第二の特異性を持つ第二のs c F vに連結された、L C V R－H C V R配向で第一の抗原特異性を持つ第一のs c F vを含む、二重特異性T細胞エンゲージャー分子である。

【0116】

アミノ酸配列（又は核酸配列）に関する「パーセント（％）配列同一性」は、最大数の同一アミノ酸（又は核酸）を達成するように、配列の整列及び必要に応じたギャップの導入後の、参照配列中のアミノ酸（又は核酸）残基と同一である候補配列中のアミノ酸（又は核酸）残基の百分率として定義される。アミノ酸残基の保存的置換は、同一の残基としてみなされてもみなされなくともよい。アミノ酸（又は核酸）配列の％同一性を決定する目的での整列は、例えば、BLASTN、BLASTp(米国立生物工学情報センター(NCBI)のウェブサイトから入手可能、同じくAltschul S.F.ら、J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990) ; Stephen F.ら、Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)参照)、ClustalW2(欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)のウェブサイトから入手可能、同じくHiggins D.G.ら、Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996) ; Larkin M.A.ら、Bioinformatics(オックスフォード、英国), 23(21): 2947-8 (2007)参照)、並びにALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの、公に入手可能なツールを用いて、達成することができる。当業者は、ツールにより提供されたデフォルトパラメータを使用してよい、又は例えば好適なアルゴリズムの選択などにより、整列に適するようにパラメータをカスタマイズしてよい。

【0117】

本明細書において使用される「抗原」又は「A g」は、細胞培養物又は動物において、抗体の産生又はT細胞反応を刺激することができる化合物、組成物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は物質を指し、細胞培養物に添加されるか（ハイブリドーマなど）、又は動物へ注入されるかもしくは吸収される組成物（癌特異性タンパク質を含むものなど）を含む。抗原は、異種抗原により誘導されたものを含む、特異的体液性又は細胞性免疫の産物（抗体など）と反応する。

【0118】

「エピトープ」又は「抗原決定基」は、それに結合体（抗体など）が結合する抗原の領域を指す。エピトープは、タンパク質の三次元フォールディングにより並置された、近接アミノ酸（線状又は連続エピトープとも称される）又は非近接アミノ酸の両方から形成されることができる（立体配置的又は高次構造的エピトープとも称される）。近接アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、タンパク質上に一次アミノ酸残基に沿って線形に配置され、且つ近接アミノ酸の小型セグメントは、主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合している抗原から消化されるか、又は変性溶媒への曝露時に保持され得るのに対し、三次元フォールディングにより形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒による処理時に失われる。エピトープは、独自の空間高次構造において、典型的には少なくとも3個、より一般には少なくとも5個、約7、又は約8～10個のアミノ酸を含む。

【0119】

本明細書において使用される用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」は、例えば抗体と抗原の間など、2つの分子間の無作為ではない結合反応を指す。特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体は、結合親和性（ K_D ） $\leq 10^{-6}$ M（例えば、 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M、又は $\leq 10^{-10}$ M）で、抗原に特異的に結合する。本明細書において使用される K_D は、解離速度の会合速度に対する比（ k_{off}/k_{on} ）を指し、これは例えばBiacoreなどの装置を使用する、表面プラズモン共鳴法を用いて決定されてよい。

【0120】

用語「機能的に連結する」又は「機能的に連結される」とは、2以上の関心対象の生物学的配列が、意図された様式でそれらが機能することを可能にする関係であるように、ス

ペーサー又はリンカーを伴う又は伴わずに、該配列が近位であることを指す。ポリペプチドに関して使用される場合、そのポリペプチド配列は、連結された生成物が、意図された生物学的機能を有することを可能にするように連結されることを意味することが意図される。例えば、抗体可変領域は、抗原-結合活性を持つ安定した生成物を提供するように、定常領域に機能的に連結されてよい。この用語はまた、ポリヌクレオチドに関しても使用される。例として、ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列など）に機能的に連結される場合、このポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド由来のポリペプチドの調節された発現を可能にするように連結されることを意味することが意図される。

【0121】

アミノ酸配列（例えばペプチド、ポリペプチド又はタンパク質）に関して使用される場合、用語「融合」又は「融合された」は、天然には存在しない、単独のアミノ酸配列への、例えば化学結合又は組換え手段による、2以上のアミノ酸配列の組合せを指す。融合アミノ酸配列は、2つのコード化ポリヌクレオチド配列の遺伝子組換えにより作製されてよく、且つ組換えポリヌクレオチドを含む構築体の宿主細胞への導入の方法により発現され得る。

【0122】

本明細書において使用される用語「スペーサー」は、ペプチド結合により結合され、且つ1以上のポリペプチドを連結するために使用される、1、2、3、4又は5個のアミノ酸残基、又は長さ5から15、20、30、50もしくはそれよりも多いアミノ酸残基を有する、人工のアミノ酸配列を指す。スペーサーは、二次構造を有しても有さなくともよい。スペーサー配列は、当該技術分野において公知であり、例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Poljakら、Structure 2:1121-1123 (1994)を参照されたい。当該技術分野において公知の任意の好適なスペーサーを、使用することができる。例えば本開示において有用なスペーサーは、グリシン及びプロリン残基がリッチであってよい。例としては、TGGGG（配列番号：266）、GGGGS（配列番号：267）又はSGGGG（配列番号：268）などの、トレオニン／セリン及びグリシンで構成された単独配列又は反復配列、又はそのタンデム反復配列（例えば、2、3、4、又はそれよりも多い反復配列）を有するスペーサーが挙げられる。あるいは、スペーサーは、アミノ酸配列GAPGGGGGAAAAAGGGGG（配列番号：269）の1以上の連続もしくはタンデム反復配列を含む長いペプチド鎖であってよい。特定の実施態様において、スペーサーは、配列番号：269の1、2、3、4又はそれよりも多い連続又はタンデム反復配列を含む。

【0123】

用語「抗原特異性」は、抗原結合分子により選択的に認識される特定の抗原又はそのエピトープを指す。

【0124】

本明細書において使用されるアミノ酸残基に関する用語「置換」は、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質における、1以上のアミノ酸の、別のアミノ酸による天然に生じるか又は誘導された置き換えを指す。ポリペプチドにおける置換は、ポリペプチドの機能の減退、増強、又は消失を生じ得る。

【0125】

置換はまた、アミノ酸配列に関して「保存的置換」であることができ、これは、アミノ酸残基の類似の物理化学的特性を持つ側鎖を有する異なるアミノ酸残基による置き換え、又はそのポリペプチドの活性にとって重要ではないそれらのアミノ酸の置換を指す。例えば、保存的置換は、非極性側鎖を持つアミノ酸残基間（例えば、Met、Ala、Val、Leu、及びIle、Pro、Phe、Trp）、非帯電の極性側鎖を持つ残基間（例えば、Cys、Ser、Thr、Asn、Gly及びGln）、酸性側鎖を持つ残基間（例えば、Asp、Glu）、塩基性側鎖を持つアミノ酸間（例えば、His、Lys、及びArg）、ベーター分岐側鎖を持つアミノ酸間（例えば、Thr、Val及びIle）

10

20

30

40

50

、イオウ含有側鎖を持つアミノ酸間（例えば、Cys及びMet）、又は芳香族側鎖を持つ残基間（例えば、Trp、Tyr、His及びPhe）で行うことができる。特定の実施態様において、置換、欠失又は付加はまた、「保存的置換」とみなすことができる。挿入又は欠失されるアミノ酸の数は、約1～5個の範囲であることができる。保存的置換は通常、タンパク質の高次構造に著しい変化を引き起こさず、その結果そのタンパク質の生物活性を保持することができる。

【0126】

本明細書において使用されるアミノ酸残基に関する用語「変異」又は「変異された」は、アミノ酸残基の置換、挿入、又は付加を指す。

【0127】

本明細書において使用される「相同体配列」及び「相同配列」は、互換的に使用され、且つ任意に整列化した場合に、別の配列に対し、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列（又はその相補鎖）又はアミノ酸配列を指す。

【0128】

本明細書において使用される「T細胞」は、細胞媒介性免疫において重要な役割を果たすリンパ球の型を指し、これはヘルパーT細胞（例えば、CD4⁺T細胞、Tヘルパー1型T細胞、Tヘルパー2型T細胞、Tヘルパー3型T細胞、Tヘルパー17型T細胞）、細胞傷害性T細胞（例えばCD8⁺T細胞）、メモリーT細胞（例えば、セントラルメモリーT細胞（TCM細胞）、エフェクターメモリーT細胞（TEM細胞及びTEMRA細胞）並びにCD8⁺又はCD4⁺のいずれかである組織常在性メモリーT細胞（TRM））、ナチュラルキラーT（NKT）細胞及び抑制性T細胞を含む。

【0129】

天然型「T細胞受容体」又は天然型「TCR」は、シグナル伝達を媒介することが可能である複合体を形成するために、変種CD3鎖に会合される、ヘテロ二量体のT細胞表面タンパク質である。TCRは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、且つ1本の重鎖及び1本の軽鎖を伴う半抗体に類似している。天然型TCRは、細胞外部分、膜貫通部分及び細胞内部分を有する。TCRの細胞外ドメインは、膜近位の定常領域及び膜遠位の可変領域を有する。

【0130】

本明細書において使用される用語「対象」又は「個体」又は「動物」又は「患者」は、疾患又は障害の診断、予後判定、改善、予防、及び／又は治療を必要とする、ヒト、又は哺乳動物もしくは霊長類を含む非ヒト動物を指す。哺乳動物の対象は、ヒト、家庭用動物、農場動物、及び動物園、スポーツ、又はペットの動物、例えばイヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ブタ、ウシ、クマなどを含む。

【0131】

（A．ポリペプチド複合体）

【0132】

第一のT細胞受容体（TCR）定常領域に機能的に連結される抗体重鎖可変ドメイン、及び第二のTCR定常領域に機能的に連結される抗体軽鎖可変ドメインを含む、新規ポリペプチド複合体が、本明細書に提供され、ここで第一のTCR定常領域及び第二のTCR定常領域は、少なくとも1つの非天然型鎖間結合を介して会合されている。ポリペプチド複合体は、少なくとも2本のポリペプチド鎖を含み、その各々は、抗体由来の可変ドメイン及びTCR由来の定常領域を含む。ポリペプチド複合体の2本のポリペプチド鎖は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの対を含み、これは各々、TCR定常領域の対に機能的に連結される。TCR定常領域の対の例は、例えば、アルファ／ベータ、プレーアルファ／ベータ、及びガンマ／デルタTCR定常領域を含む。本明細書に提供されるポリペプチド複合体中のTCR定常領域は、完全長又は断片であることができ、且つTCR定常領域の対が、互いに会合し二量体を形成することが可能である限りは、操作されることが

10

20

30

40

50

できる。

【0133】

驚くべきことに、少なくとも1つの非天然型鎖間結合（特に非天然型ジスルフィド結合）を伴う本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、組換え的に発現され且つ所望の高次構造へ集成されることができ、これはTCR定常領域二量体を安定化すると同時に、抗体可変領域の良好な抗原結合活性を提供することがわかった。更にポリペプチド複合体は、例えばグリコシル化部位の修飾、及び一部の天然配列の除去など、慣習的抗体操作に良く耐えることが分かった。更に本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、二重特異性のフォーマットへ組み込まれ得、これは容易に発現され且つ集成され、ポリペプチド複合体中のTCR定常領域の存在のために、抗原結合配列の誤対形成は最少であるか又は実質的にない。本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び構築体の追加の利点は、以下の開示においてより明白となるであろう。

10

【0134】

一つの態様において、本開示は、N-末端からC-末端へ、第一のT細胞受容体（TCR）定常領域（C1）へ機能的に連結される第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン（VH）を含む第一のポリペプチド、及びN-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域（C2）へ機能的に連結される第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、第二のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体を提供し、ここでC1及びC2は、C1とC2の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つこの非天然型鎖間結合は、二量体を安定化することが可能であり、第一の抗体は、第一の抗原特異性を有する。

20

【0135】

（i. TCR定常領域）

【0136】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、TCR由来の定常領域を含む。

【0137】

天然型TCRは、2本のポリペプチド鎖からなり、且つ一般に2つの型を有する：一方は、アルファ鎖及びベータ鎖からなり（すなわち、アルファ／ベータTCR）、他方は、ガンマ鎖及びデルタ鎖からなる（すなわち、ガンマ／デルタTCR）。これら2つの型は、構造的に類似しているが、異なる配置及び機能を有する。約95%のヒトT細胞は、アルファ／ベータTCRを有するのに対し、残り5%は、ガンマ／デルタTCRを有する。アルファ鎖の前駆体もまた認められ、プレーアルファ鎖と称される。2本のTCRポリペプチド鎖の各々は、免疫グロブリンドメイン及び膜近位領域を含む。免疫グロブリン領域は、可変領域及び定常領域を含み、且つ免疫グロブリン型フォールド(fold)の存在により特徴付けられる。各TCRポリペプチド鎖は、システイン残基を有し（例えば、定常ドメインのC末端又は膜近位領域のN末端に）、これらは一緒に、2本のTCR鎖をまとめて繋ぐジスルフィド結合を形成することができる。

30

【0138】

図18A-18Eは、TCRアルファ鎖、プレーアルファ鎖、ベータ鎖、ガンマ鎖及びデルタ鎖の天然型TCR定常領域のアミノ酸配列を示す。明確さ及び一貫性のために、これらの配列中の各アミノ酸残基は、図19A-19Eに番号付けし、かつそのような番号付けは、特定のTCR定常領域上の特定のアミノ酸残基を指すために、本開示を通じて使用される。

40

【0139】

ヒトTCRアルファ鎖定常領域は、TRACとして公知であり、NCBI寄託番号P01848、又は配列番号：254のアミノ酸配列である。

【0140】

ヒトTCRベータ鎖定常領域は、TRBC1及びTRBC2として公知の（IMGT命名法）2つの異なる変種を有し、対応する配列は、各々、配列番号：256及び配列番号：257に示す（同じくToyonaga B,ら、PNAs, Vol. 82, pp.8624-8628, Immunolog

50

y (1985)参照)。これらの2つのベータ定常ドメインは、エキソン1の4番目、5番目、及び37番目のアミノ酸残基が異なる。具体的には、TRBC1は、エキソン1に4N、5K及び37Fを有し、TRBC2は、エキソン1に4K、5N及び37Yを有する。

【0141】

具体的には、天然型TCRベータ鎖は、位置74に天然型システイン残基を含み（図19B参照）、これは対形成されず、結果的に天然型アルファ／ベータTCR中にジスルフィド結合を形成しない。特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体において、この天然型システイン残基は、存在しないか又は別の残基に変異される。これは、不正確な鎖内又は鎖間の対形成を避けるために、有用である。特定の実施態様において、天然型システイン残基は、別の残基、例えばセリン又はアラニンと置換される。特定の実施態様において、インビトロにおける、特定の実施態様での置換は、TCRリフォールディング効率を向上することができる。

【0142】

ヒトTCRガンマ鎖定常領域は、TRGC1及びTRGC2として公知の2つの変種を有し(Lefrancら、Eur. J. Immunol. 19:989-994 (1989)参照)、これらは各々、NCBI寄託番号A26659及びP03986、又は各々、配列番号：263及び配列番号：265のアミノ酸配列を有する。

【0143】

ヒトTCRデルタ鎖定常領域は、TRDCとして公知であり、NCBI寄託番号A35591、配列番号：261のアミノ酸配列を有する。

【0144】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体におけるTCRの定常領域はまた、プレート細胞抗原受容体（プレートTCR）に由来してもよい。プレートTCRは、未熟な胸腺細胞により発現され、これは早期T細胞発達において、中心的役割を有する。プレートTCRは、通常のベータ鎖を有するが、配列及び構造が通常のアルファ鎖のものとは異なる、利用可能な定常領域のみ伴う特別なプレールファ鎖を有する(Harald von Boehmer, Nat Rev Immunol, Jul;5(7):571-7 (2005)参照)。ヒトプレールファ鎖定常領域（PTCRA）の配列は、NCBI寄託番号AAF89556.1、又は配列番号：259のアミノ酸配列を有する。

【0145】

本開示において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第一及び第二のTCR定常領域は、TCR定常領域間に、二量体を安定化することが可能である少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む、二量体を形成することが可能である。

【0146】

本明細書において使用される用語「二量体」は、共有的又は非共有的相互作用を介して、ポリペプチド又はタンパク質などの、2つの分子により形成された、会合された構造を指す。ホモ二量体又はホモ二量体形成は、2つの同じ分子により形成され、且つヘテロ二量体又はヘテロ二量体形成は、2つの異なる分子により形成される。第一及び第二のTCR定常領域により形成された二量体は、ヘテロ二量体である。

【0147】

鎖間結合は、1つのTCR定常領域上の1つのアミノ酸残基と、別のTCR定常領域上の別のアミノ酸残基の間に形成される。特定の実施態様において、非天然型鎖間結合は、2つのTCR定常領域を二量体へ会合することが可能である任意の結合又は相互作用であることができる。好適な非天然型鎖間結合の例は、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、又は疎水性－親水性相互作用、ノブイントゥホール又はそれらの組合せを含む。

【0148】

「ジスルフィド結合」は、構造R-S-S-R'を持つ共有結合を指す。アミノ酸システインは、例えば別のシステイン残基由来の第二のチオール基と、ジスルフィド結合を形成することができるチオール基を含む。ジスルフィド結合は、各々、2つのポリペプチド鎖

10

20

30

40

50

に存在する、2つのシステイン残基のチオール基間に形成され、これにより鎖間架橋又は鎖間結合を形成することができる。

【0149】

静電的相互作用は、非共有相互作用であり、タンパク質のフォールディング、安定性、可動性及び機能において重要であり、イオン相互作用、水素結合及びハロゲン結合を含む。静電的相互作用は、例えば、LysとAspの間、LysとGluの間、GluとArgの間、又は第一鎖のGlu、Trpと第二鎖のArg、ValもしくはThrの間で、ポリペプチドにおいて形成されることができる。

【0150】

塩橋は、Asp又はGluのいずれかの陰イオン性カルボキシラートと、Lys由来の陽イオン性アンモニウム又はArgのグアニジニウムから主に生じる、近距離の静電的相互作用であり、これは、天然型タンパク質構造において反対に帯電された残基の空間的に近い対である。大きく疎水性の境界面内の帯電された残基及び極性残基は、結合のホットスポットとして作用することができる。中でも、His、Tyr、及びSerなどのイオン化可能な側鎖を持つ残基はまた、塩橋の形成にも関与し得る。

【0151】

疎水性相互作用は、第一鎖の1以上のVal、Tyr及びAlaと、第二鎖の1以上のVal、Leu、及びTrpの間、あるいは第一鎖のHis及びAlaと、第二鎖のThr及びPheの間に形成することができる(Brinkmannら、2017、前掲参照)。

【0152】

水素結合は、水素原子が、窒素、酸素、又はフッ素などの高度に電気陰性の原子に共有的に結合される場合の、2つの極性基間の静電引力により形成される。水素結合は、Asnの窒素基とHisの酸素基、又はAsnの酸素基とLysの窒素基など、2つの残基の、各々、骨格酸素(例えば、カルコゲン基)とアミド水素(窒素基)の間にポリペプチドで形成され得る。水素結合は、ファンデルワールス相互作用よりもより強力であるが、共有結合又はイオン結合よりも弱く、二次構造及び三次構造を維持する上で重要である。例えば、アミノ酸残基のスペーシングが*i*位と*i*+4位の間に規則的に生じる場合、アルファヘリックスが形成され、並びにベータシートは、2つのペプチドが少なくとも2又は3つの骨格水素結合により結合され、ねじれたプリーツシートを形成する場合に形成される、ペプチド鎖3〜10個のアミノ酸長の配列である。

【0153】

本明細書において使用される「ノブイントゥホール」は、2つのポリペプチド間の相互作用を指し、ここで一方のポリペプチドは、嵩高な側鎖を有するアミノ酸残基(例えばチロシン又はトリプトファン)の存在のために、突起(すなわち「ノブ」)を有し、且つ他方のポリペプチドは、小さい側鎖のアミノ酸残基(例えばアラニン又はトレオニン)が存在する空洞(すなわち「ホール」)を有し、且つ2つのポリペプチドの相互作用を促進し、ヘテロ二量体又は複合体を形成するために、突起は、空洞内に配置可能である。ノブイントゥホールでポリペプチドを作製する方法は、例えば米国特許第5,731,168号に記載されたように、当該技術分野において公知である。

【0154】

特定の実施態様において、TCR定常領域二量体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の非天然型鎖間結合を含む。任意に、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の非天然型鎖間結合の少なくとも1つは、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、又は疎水性-親水性相互作用、又は任意のそれらの組合せである。

【0155】

本明細書において使用される「非天然型」鎖間結合は、天然型対応物のTCR定常領域の天然型会合において認められない鎖間結合を指す。例えば、非天然型鎖間結合は、各々、各TCR定常領域上に存在する変異されたアミノ酸残基と天然型アミノ酸残基の間;あるいは、個々にTCR定常領域上に存在する2つの変異されたアミノ酸残基の間に形成され得る。特定の実施態様において、少なくとも1つの非天然型鎖間結合は、ポリペプチド

10

20

30

40

50

複合体の第一のTCR定常領域に含まれる第一の変異された残基と第二のTCR定常領域に含まれる第二の変異された残基の間に形成される。

【0156】

「変異された」アミノ酸残基は、置換、挿入又は付加され、且つ対応する天然型TCR定常領域において、その天然型対応物残基とは異なるものを指す。例えば、野生型のTCR定常領域における特定の位置のアミノ酸残基が、「天然型」残基として言及される場合、その変異された対応物は、天然型残基とは異なるが、TCR定常領域上の同じ位置に存在する任意の残基である。変異された残基は、同じ位置で天然型残基を置換するか、又は天然型残基の前に挿入され、従ってその当初の位置を占めている、異なる残基であることができる。

10

【0157】

特定の実施態様において、変異された残基は、天然に生じるアミノ酸残基であってよい。特定の実施態様において、第一及び第二の非天然型アミノ酸残基の少なくとも1つは、変異されたシステイン残基である。特定の実施態様において、非天然型鎖間結合の1以上は、ジスルフィド結合である。特定の実施態様において、非天然型ジスルフィド結合は、各々、第一及び第二のTCR定常領域に含まれる2つの変異されたシステイン残基の間に形成され得る。

【0158】

特定の実施態様において、第一及び第二の変異された残基の少なくとも1つは、天然に生じないアミノ酸残基である。天然に生じないアミノ酸残基は、ヒトタンパク質において天然に認められないが、コード化ポリヌクレオチドへ導入されることができる核酸コドンを通じて発現され得るアミノ酸残基を指す。例えば、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)などの、天然に生じないアミノ酸は、過ヨウ素酸が誘導した酸化により、システイン、ヒスチジン及びリジンなどの天然アミノ酸と反応し且つ架橋することができる。抗体へのL-DOPAの組込みにより、非天然アミノ酸は、抗原上の残基に効果的に架橋することができ、結果共有結合した抗体-抗原複合体を生じることが示されている(Xu, J.ら、2014,「抗体-抗原複合体を共有的に架橋するための構造ベースの非正準アミノ酸デザイン(Structure-based non-canonical amino acid design to covalently crosslink an antibody-antigen complex)」、Journal of Structural Biology, 185(2), pp.215-222.)。本明細書において、第一及び／又は第二のTCR定常領域中の変異されたアミノ酸残基は、天然アミノ酸残基(あるいは、天然に生じないアミノ酸残基)と架橋し、非天然型鎖間共有結合を形成することができる、L-DOPAなどの、天然に生じないアミノ酸残基を含んでよいことが企図されている。

20

30

【0159】

特定の実施態様において、少なくとも1つの非天然型ジスルフィド結合は、変異されたシステイン残基と天然型システイン残基の間に形成される。特定の実施態様において、非天然型ジスルフィド結合は、2つの変異されたシステイン残基の間に形成される。特定の実施態様において、非天然型ジスルフィド結合を形成するシステイン残基の少なくとも1つは、変異されたシステイン残基である。特定の実施態様において、非天然型ジスルフィド結合を形成する両方のシステイン残基は、各々、第一及び第二のTCR定常領域上の変異されたシステイン残基である。

40

【0160】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二のTCR定常領域は、非天然型鎖間結合の形成に寄与する1以上の変異されたアミノ酸残基を含むように、操作され得る。そのような変異された残基をTCR定常領域へ導入するために、TCR領域のコード配列は、例えば天然型残基をコードしているコドンを変異された残基をコードしているコドンと置換するように、又は天然型残基のコドンの前に変異された残基をコードしているコドンを挿入するように、操作されることができる。1以上の所望の変異されたアミノ酸残基は、TCR定常領域へ、例えばジスルフィド結合を形成することが可能であるか、2つのTCR定常領域の間の静電的相互作用に繋がり得るか、TCR定常領域の可動性を増大すること

50

ができるか、水素結合など、TCR定常ドメインから離れた共有結合を形成するアミノ酸の少なくとも1つを配置するか、塩橋の形成に貢献することができる、1以上のアミノ酸残基（例えばシステイン残基）；疎水性相互作用に繋がり得る疎水性アミノ酸残基；並びに、親水性相互作用に繋がり得る親水性アミノ酸残基などへ導入されることができる。

【0161】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二のTCR定常領域は、1以上の変異されたシステイン残基を含むように、操作されることができる。例えば、非システイン残基は、システイン残基と置き換えることができるか、又はシステイン残基は、2つの当初の隣接天然型非システイン残基の間に挿入されることができる。置き換えの位置は、システイン残基への置き換え後に、非天然型鎖間ジスルフィド結合が、2つのTCR定常領域の間に形成されるように決定することができる。この目的のために、複数の要因が考慮され、例えば、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が、十分に近接していること、適切なアルファベータ結合配向を有していること、システイン残基のチオール基がお互に向き合い配向されること、置き換えられるべき残基が、システインの化学特性と比較的類似している化学特性を伴う側鎖を有すること、並びに／又は置き換えが、TCR定常領域又はポリペプチド複合体それ自体の三次構造を実質的に攪乱しないことを含むことができる。

【0162】

当業者は、例えば、非限定的に、光検出による距離マップ、コンピュータモデリング、NMR分光法又はX線結晶解析などの、当該技術分野において公知の好適な方法を用い、置き換えられるべき2つのアミノ酸残基の間の距離及び角度を決定することができる。例証的实施例において、関心のあるポリペプチド（TCR定常領域など）について、そのタンパク質結晶構造は、PDBデータベースなどの、公開されたデータベースから得るか、あるいはX線結晶解析などの方法を用いて解明することができる。好適なコンピュータソフトウェアを使用し、タンパク質結晶構造データを基にアミノ酸残基間の距離及び角度を決定することができる。特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体中の、ジスルフィド結合は、この複合体が正確にフォールディングされる場合、十分に近い、例えば距離が8 Å未満、7 Å、6 Å、5 Å、4 Å、3 Å、2 Å、1 Å又はそれ未満の、各ベータ炭素を有する変異されたシステイン残基の間に形成され得る。

【0163】

第一及び／又は第二のTCR定常領域への操作に関する更なる好適な位置は、TCRアルファとベータの間(Boulter, J.M.ら、Protein Engineering, 16(9), pp.707-711 (2003))、又はガンマとデルタの間(Allison, T.J.ら、Nature, 411(6839), pp.820-824 (2001)；Uldrich, A.P.ら、Nature Immunology, 14(11), pp.1137-1145 (2013))で、この複合体について公開された結晶構造データから選び取ることができる。一旦置き換えられるべき残基が決定されたならば、当業者は、変異されるべき関心のあるコドン容易に同定し(例えば、ClustalW(EBIウェブサイト(www.ebi.ac.uk/index.html)などの現存するソフトウェアを使用する配列整列を通じて)、次にPCR変異誘発などの当該技術分野において公知の方法により、システインコドンへ、これを変異することができる。

【0164】

鎖間ジスルフィド結合の形成は、当該技術分野において公知の好適な方法により決定することができる。例えば、発現されたタンパク質生成物は、各々、還元及び非還元SDS-PAGEに供され、引き続き生じるバンドを比較し、鎖間ジスルフィド結合の存在を示す可能性のある差を同定することができる。

【0165】

非天然型鎖間結合は、ポリペプチド複合体を安定化することが可能である。安定化におけるそのような作用は、様々な様式で実施され得る。例えば、変異されたアミノ酸残基又は非天然型鎖間結合の存在は、ポリペプチド複合体を、安定して発現させ、及び／又は高レベルで発現させ、及び／又は所望の生物活性（例えば抗原結合活性）を有する安定した複合体へ会合させ、及び／又は所望の生物活性を有する所望の安定した複合体を高レベル

で発現及び集成させることができる。鎖間結合の第一及び第二のTCR定常領域を安定化する能力は、SDS-PAGE上に標示された分子量、又は示差走査熱量測定(DSC)もしくは示差走査蛍光光度(DSF)により測定された熱安定性などの、当該技術分野において公知の適切な方法を用いて評価することができる。例証的实施例において、本明細書に提供される安定したポリペプチド複合体の形成は、生成物が、第一及び第二のポリペプチドを一緒にした分子量と同等の分子量を示す場合には、SDS-PAGEにより確認され得る。特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、その熱安定性が、天然のFabの熱安定性の50%、60%、70%、80%、又は90%程大きい点で、安定している。特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、その熱安定性が、天然Fabのそれと同等である点で、安定している。

10

【0166】

何らかの理論に結びつけられることは欲しないが、ポリペプチド複合体の第一と第二のTCR定常領域間に形成された非天然型鎖間結合(ジスルフィド結合など)は、TCR定常領域のヘテロ二量体を安定化し、これにより、ヘテロ二量体の及びポリペプチド複合体の正確なフォールディングのレベル、構造安定性及び／又は発現レベルを増強することが可能であると考えられる。T細胞表面の膜にアンカーされた天然型TCRとは異なり、天然型TCR細胞外ドメインのヘテロ二量体は、3D構造における抗体Fabとのその類似性にもかかわらず、遙かに少ない安定性であることが認められる。実際に、可溶性条件下での天然型TCRの不安定性は、その結晶構造の解明を妨害する著しい障害であるように使用された(Wang、Protein Cell, 5(9), 649-652, (2014)参照)。TCR定常領域内のシステイン(Cys)変異対の導入及びこれにより可能な鎖間非天然型ジスルフィド結合の形成により、このポリペプチド複合体は、安定して発現される一方で、その間に抗体可変領域の抗原-結合能は保持される。

20

【0167】

変異された残基を含むTCR定常領域はまた、本明細書において、「操作された」TCR定常領域とも称される。特定の実施態様において、ポリペプチド複合体の第一のTCR定常領域(C1)は、操作されたTCRアルファ鎖(CAlpha)を含み、且つ第二のTCR定常領域(C2)は、操作されたTCRベータ鎖(CBeta)を含む。特定の実施態様において、C1は、操作されたCBetaを含み、且つC2は、操作されたCAAlphaを含む。特定の実施態様において、C1は、操作されたTCRプレアルファ鎖(CPre-Alpha)を含み、且つC2は、操作されたCBetaを含む。特定の実施態様において、C1は、操作されたCBetaを含み、且つC2は、操作されたCPre-Alphaを含む。特定の実施態様において、C1は、操作されたTCRガンマ鎖(CGamma)を含み、且つC2は、操作されたTCRデルタ鎖(CDelta)を含む。特定の実施態様において、C1は、操作されたCDeltaを含み、且つC2は、操作されたCGammaを含む。

30

【0168】

特定の実施態様において、操作されたTCR定常領域は、1以上の変異されたシステイン残基を含む。特定の実施態様において、1以上の変異された残基は、第一及び／又は第二の操作されたTCR定常領域の接触境界面内に含まれる。

40

【0169】

本明細書において使用される用語「接触境界面」は、そこでポリペプチドが互いに相互作用／会合しているポリペプチド上の特定の領域(複数)を指す。接触境界面は、相互作用が生じた場合に接触又は会合するように対応するアミノ酸残基(複数)と相互作用することが可能である1以上のアミノ酸残基を含む。接触境界面中のアミノ酸残基は、連続配列の中であってなくてもよい。例えば、境界面が三次元である場合、その境界面内のアミノ酸残基は、線状配列上の異なる位置に分離されてよい。

【0170】

特定の実施態様において、操作されたCBetaは、アミノ酸残基9-35、52-66、71-86、及び122-127からなる群から選択される接触境界面内に、変異さ

50

れたシステイン残基を含む。特定の実施態様において、操作されたC A l p h aは、アミノ酸残基6-29、37-67、及び86-95からなる群から選択される接触境界面内に、変異されたシステイン残基を含む。特定されない限り、本開示におけるT C R定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、図19A-19Eに示しているものである。

【0171】

特定の実施態様において、1以上のジスルフィド結合は、操作されたC A l p h aと操作されたC B e t aの間に形成され得る。C B e t a中の変異されたシステイン残基は、S56C、S16C、F13C、V12C、E14C、F13C、L62C、D58C、S76C、及びR78Cからなる群から選択される置換であることができ、並びに／又はC A l p h a中の変異されたシステイン残基は、T49C、Y11C、L13C、S16C、V23C、Y44C、T46C、L51C、及びS62Cからなる群から選択される置換であることができる。特定の実施態様において、変異されたシステイン残基の対は、C B e t a中のS16C及びC A l p h a中のY11C、C B e t a中のF13C及びC A l p h a中のL13C、C B e t a中のS16C及びC A l p h a中のL13C、C B e t a中のV12C及びC A l p h a中のS16C、C B e t a中のE14C及びC A l p h a中のS16C、C B e t a中のF13C及びC A l p h a中のV23C、C B e t a中のL62C及びC A l p h a中のY44C、C B e t a中のD58C及びC A l p h a中のT46C、C B e t a中のS76C及びC A l p h a中のT46C、C B e t a中のS56C及びC A l p h a中のT49C、C B e t a中のS56C及びC A l p h a中のL51C、C B e t a中のS56C及びC A l p h a中のS62C、並びにC B e t a中のR78C及びC A l p h a中のS62Cからなる群から選択される置換の対であることができ、且つここでシステイン残基の対は、非天然型鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

【0172】

本出願を通じて本明細書において使用される、T C R定常領域に関する「X n Y」は、T C R定常領域上のn番目のアミノ酸残基X（本明細書に提供される図19A-19Eの番号付けを基に）が、アミノ酸残基Yにより置き換えられることを意味し、ここでX及びYは各々、特定のアミノ酸残基の1文字略語であることが意図される。数値nは、単に図19A-19Eに提供された番号付けを基にしており、その実際の位置とはことなり得ることは、留意されなければならない。例証のために、配列番号：34に示したC B e t a（S56C）（N69Q）の配列を使用する。SのCへの置換は、配列番号：34の48番目の残基で起こる一方で、まさに(very)この残基は、図19A-19Eの番号付けシステムを基に56番目の残基として設計され、その結果SのCへの置換は、S56Cとして指定されるが、S48Cではない。同様に、NのQへの置換は、図19A-19Eの番号付けシステムを基にN69Qとして指定される。このアミノ酸残基置換の指定則は、別に特定しない限りは、本開示において全てのT C R定常領域に適用する。同様に、F c領域に関して使用する場合の「X n Y」は、F c定常領域上のn番目のアミノ酸残基X（本明細書に提供される図20A-20Dの番号付けを基に）が、アミノ酸残基Yにより置き換えられることを意味する。

【0173】

特定の実施態様において、操作されたC B e t aは、配列番号：33-41のいずれか一つを含むか又はこれであり、且つ操作されたC A l p h aは、配列番号：43-48のいずれか一つを含むか又はこれである。

【0174】

特定の実施態様において、1以上の非天然型ジスルフィド結合は、C P r e - A l p h aとC B e t aの間の接触境界面内に形成され得る。特定の実施態様において、C P r e - A l p h a上の接触境界面は、アミノ酸残基7-19、26-34、56-75及び103-106の位置での置換から選択される。特定の実施態様において、C B e t a上の接触境界面は、アミノ酸残基9-35、52-66、71-86及び122-127の位置での置換から選択される。

【0175】

特定の実施態様において、1以上のジスルフィド結合は、操作されたプレ-T C R アルファ定常領域 (C P r e - A l p h a) とベータ鎖定常領域 (C B e t a) の間に形成され得る。C B e t a 中の変異されたシステイン残基は、S 1 6 C、A 1 8 C、E 1 9 C、F 1 3 C、A 1 1 C、S 5 6 C、及び S 7 6 C からなる群から選択される置換であることができ、並びに／又は C P r e - A l p h a 中の変異されたシステイン残基は、S 1 1 C、A 1 3 C、I 1 6 C、S 6 2 C、T 6 5 C、及び Y 5 9 からなる群から選択される置換であることができる。特定の実施態様において、変異されたシステイン残基の対は、C B e t a 中の S 1 6 C 及び C P r e - A l p h a 中の S 1 1 C、C B e t a 中の A 1 8 C 及び C P r e - A l p h a 中の S 1 1 C、C B e t a 中の E 1 9 C 及び C P r e - A l p h a 中の S 1 1 C、C B e t a 中の F 1 3 C 及び C P r e - A l p h a 中の A 1 3 C、C B e t a 中の S 1 6 C 及び C P r e - A l p h a 中の A 1 3 C、C B e t a 中の A 1 1 C 及び C P r e - A l p h a 中の I 1 6 C、C B e t a 中の S 5 6 C 及び C P r e - A l p h a 中の S 6 2 C、C B e t a 中の S 5 6 C 及び C P r e - A l p h a 中の T 6 5 C、並びに C B e t a 中の S 7 6 C 及び C P r e - A l p h a 中の Y 5 9 C からなる群から選択される置換の対であることができ、ここで変異されたシステイン残基の対は、非天然型鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

10

【0176】

特定の実施態様において、操作された C B e t a は、配列番号：33-41のいずれか一つを含むか又はこれであり、且つ操作された C P r e - A l p h a は、配列番号：82及び83のいずれか一つを含むか又はこれである。

20

【0177】

特定の実施態様において、1以上の非天然型ジスルフィド結合は、C G a m m a と C D e l t a の間の接触境界面内に形成され得る。特定の実施態様において、C G a m m a 上の接触境界面は、アミノ酸残基 11-35 及び 55-76 の位置での置換から選択される。特定の実施態様において、C D e l t a 上の接触境界面は、アミノ酸残基 8-26、43-64、及び 84-88 の位置での置換から選択される。

【0178】

特定の実施態様において、1以上のジスルフィド結合は、操作された C G a m m a と C D e l t a の間に形成され得る。C G a m m a 中の変異されたシステイン残基は、S 1 7 C、E 2 0 C、F 1 4 C、T 1 2 C、M 6 2 C、Q 5 7 C、及び A 1 9 C からなる群から選択される置換であることができ、並びに／又は C D e l t a 中の変異されたシステイン残基は、F 1 2 C、M 1 4 C、N 1 6 C、D 4 6 C、V 5 0 C、F 8 7 C、及び E 8 8 C からなる群から選択される置換であることができる。特定の実施態様において、変異されたシステイン残基の対は、C G a m m a 中の S 1 7 C 及び C D e l t a 中の F 1 2 C、C G a m m a 中の E 2 0 C 及び C D e l t a 中の F 1 2 C、C G a m m a 中の F 1 4 C 及び C D e l t a 中の M 1 4 C、C G a m m a 中の T 1 2 C 及び C D e l t a 中の N 1 6 C、C G a m m a 中の M 6 2 C 及び C D e l t a 中の D 4 6 C、C G a m m a 中の Q 5 7 C 及び C D e l t a 中の V 5 0 C、C G a m m a 中の A 1 9 C 及び C D e l t a 中の F 8 7 C、並びに C G a m m a 中の A 1 9 C 及び C D e l t a 中の E 8 8 C からなる群から選択される置換の対であることができ、ここで導入された変異されたシステイン残基の対は、鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能である。

30

40

【0179】

特定の実施態様において、操作された C G a m m a は、配列番号：113 及び 114 のいずれか一つを含むか又はこれであり、且つ操作された C D e l t a は、配列番号：115 及び 116 のいずれか一つを含むか又はこれである。

【0180】

非天然型アミノ酸残基に加え、操作された T C R 定常領域は、特定の実施態様において、野生型 T C R 定常領域配列における 1 以上の天然型残基への追加の修飾を更に含んでよい。そのような追加の修飾の例は、天然型システイン残基への修飾、天然型グリコシル化

50

部位への修飾、及び／又は天然型ループへの修飾などを含む。

【0181】

特定の天然型TCR定常領域(CBetaなど)は、本開示の一部の実施態様において修飾(例えば除去)され得るか、あるいは一部の別の実施態様において保持され得る、天然型システイン残基を含む。特定の実施態様において、TRACとTRBC1又はTRBC2定常ドメインの間の、すなわちIMGT TCR命名法に従いTRACのエキソン2のCys4とTRBC1又はTRBC2のエキソン2のCys2の間の、アルファ／ベータヘテロ二量体性TCR上の天然型ジスルフィド結合は、存在してもしなくてもよい。

【0182】

特定の実施態様において、少なくとも1つの天然型システイン残基は、操作されたCBeta中に存在しないか又は存在する。例えば、CBetaのC74位置の天然型システイン残基は、操作されたCBeta中に存在してもしなくてもよい。特定の実施態様において、天然型システイン残基C74が存在しない操作されたCBetaは、配列番号: 32-41のいずれか一つを含むか又はこれである。

【0183】

何らかの理論に結びつけられることは欲しないが、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、CBeta上の天然型システイン残基の存在及び非存在の両方を容認する点において有利であると考えられる。可溶性TCRヘテロ二量体上の天然型システイン残基の存在は、TCRのリガンド結合能を損なうことが示唆された(例えば、米国特許第7,666,604号参照)が、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、その抗原-結合活性に負の影響を及ぼすことなく、この天然型システイン残基の存在を容認することができる。更に、TCRヘテロ二量体中の天然型ジスルフィド結合は、TCRヘテロ二量体の安定化にとって良好であるというWuらにより対立する教示(mAbs, 7(2), pp.364-376 (2005))があるにもかかわらず、天然型システイン残基が存在しない本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、高レベルで発現した。

【0184】

特定の実施態様において、天然型TCR定常領域に存在する1以上の天然型グリコシル化部位は、本開示に提供されるポリペプチド複体内で、修飾(例えば除去)されるか、又は維持される。ポリペプチド配列に関して本明細書において使用される用語「グリコシル化部位」は、それに糖部分(例えばオリゴ糖構造)が結合され得る側鎖を伴うアミノ酸残基を指す。抗体のようなポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN-結合型又はO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖、例えばアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニンなどのトリペプチド配列中のアスパラギン残基への、糖部分の結合を指し、ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である。O-結合型グリコシル化は、糖のN-アセチル(acyl)ガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つの、ヒドロキシアミノ酸への、最も一般的にはセリンもしくはトレオニンへの結合を指す。天然型グリコシル化部位の除去は、好都合なことに、前述のトリペプチド配列の1以上(N-結合型グリコシル化部位について)又はセリンもしくはトレオニン残基の1以上(O-結合型グリコシル化部位について)が置換されるような、アミノ酸配列の変更により達成され得る。

【0185】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体における、少なくとも1つの天然型グリコシル化部位は、操作されたTCR定常領域に、例えば、第一及び／又は第二のTCR定常領域中に存在しないか又は存在する。何らかの理論に結びつけられることは欲しないが、本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、タンパク質の発現及び安定性に影響を及ぼすことなく、グリコシル化部位の全て又は一部の除去を容認し得ると考えられ、これはAlpha(すなわち、N34、N68、及びN79)及びCBeta(すなわち、N69)などの、TCR定常領域上のN-結合型グリコシル化部位の存在は、タンパク質の発現及び安定性に必須であるという現存する教示(Wuら、MAbs, 7: 2, 364-376, 2015参照)とは対照的である。

10

20

30

40

50

【0186】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体における、操作されたC A l p h a中のN-グリコシル化部位、例えばN 3 4、N 6 8、N 7 9及びN 6 1の少なくとも1つは、存在しないか又は存在している。特定の実施態様において、グリコシル化部位が存在しない操作されたC A l p h a配列は、配列番号：4 4-4 8のいずれか一つを含むか又はこれである。特定の実施態様において、操作されたC B e t a中のN-グリコシル化部位、例えばN 6 9の少なくとも1つは、存在しないか又は存在する。グリコシル化部位の存在しない操作されたC B e t a配列（T R B C 1）は、配列番号：3 4-3 6のいずれか一つを含むか又はこれである。グリコシル化部位の存在しない操作されたC B e t a配列（T R B C 2）は、配列番号：3 8-4 0のいずれか一つを含むか又はこれである。

10

【0187】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体における、操作されたC P r e - A l p h a中のN-グリコシル化部位、例えばN 5 0の少なくとも1つは、存在しないか又は存在している。グリコシル化部位が存在しない操作されたC P r e - A l p h a配列は、配列番号：8 3を含むか又はこれである。

【0188】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体における、操作されたC G a m m a中のN-グリコシル化部位、例えばN 6 5の少なくとも1つは、存在しないか又は存在している。特定の実施態様において、グリコシル化部位の存在しない操作されたC G a m m a配列は、配列番号：1 1 4を含むか又はこれである。特定の実施態様において、操作されたC D e l t a配列中のN-グリコシル化部位、例えばN 1 6及びN 7 9のいずれか一つは、存在しないか又は存在する。グリコシル化部位が存在しない操作されたC D e l t a配列は、配列番号：1 1 6を含むか又はこれである。

20

【0189】

特定の実施態様において、天然型T C R定常領域中に存在する1以上の天然型二次構造は、本開示に提供されるポリペプチド複合体において修飾（例えば除去）されるか又は維持されてよい。特定の実施態様において、天然型ループ（天然型C B e t aのF G ループ及び／又はD E ループなど）は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体において修飾（例えば除去）されるか又は維持されてよい。用語「F G ループ」及び「D E ループ」は、T C Rベータ鎖定常ドメインにおいて主に認められる構造である。F G ループは、天然型C B e t aのアミノ酸残基1 0 1-1 1 7を包含し、且つC D 3に対するアルファ／ベータT C Rキャビティの一つの構成成分を形成する、通常伸長された、溶媒に曝される構造要素である。D E ループは、天然型C B e t aのアミノ酸残基6 6-7 1を包含する。T C Rベータ鎖定常領域の配列の免疫グロブリンC H 1定常領域の配列との整列は、T C Rベータ鎖定常領域のF G ループは、著しく長いことを明らかにした。図3は、T細胞ベータ鎖と抗体重鎖の間の定常領域の差を示している。特定の実施態様において、F G ループの配列（YGLSENDEWTQDRAKPVT、配列番号：7 9）は、存在しないか、及び／又はYPSN（配列番号：8 0）と置き換えられている。特定の実施態様において、天然型D E ループの配列（QPALNDSR、配列番号：8 8）は、存在しないか、及び／又はQSGR（配列番号：8 7）と置き換えられている。特定の実施態様において、天然型F G ループの存在しないC B e t a配列は、配列番号：3 7-4 0のいずれか一つを含むか又はこれである。特定の実施態様において、天然型F G ループ及び天然型D E ループの両方が存在しないC B e t a配列は、配列番号：4 1を含むか又はこれである。

30

40

【0190】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体において、T C R由来の定常領域は、抗体由来の可変領域に機能的に連結される。抗体の重鎖又は軽鎖可変領域は、スパーサーを伴い又は伴わずに、T C R定常領域へ機能的に連結され得る。

【0191】

特定の実施態様において、第一の抗体の可変ドメイン（V H）は、第一のT C R定常領

50

域（C1）へ、第一の接続ドメインで融合され、第一の抗体の可変ドメイン（VL）は、第二のTCR定常領域（C2）へ、第二の接続ドメインで融合される。

【0192】

本明細書において使用される「接続ドメイン」は、2つのアミノ酸配列が融合又は組合せられる境界又はボーダー領域を指す。特定の実施態様において、接続ドメインは、第一の融合パートナー由来のC末端断片の少なくとも一部を含み、間にスペーサーを伴い又は伴わずに、第二の融合パートナー由来のN末端断片の少なくとも一部に融合される。そのような実施態様において、接続ドメインは、両方の融合パートナーの断片を含み、且つその融合点は、例えば、直接又はスペーサーを介して、2つの断片が互いに連結される点に存在する。特定の他の実施態様において、接続ドメインは、1つの融合パートナーの断片からなる。そのような実施態様において、融合点は、接続ドメインのいずれかの端であることができる。

10

【0193】

特定の実施態様において、第一の接続ドメインは、抗体V/C接続のC末端断片の少なくとも一部、及びTCR V/C接続のN末端断片の少なくとも一部を含む。

【0194】

本明細書において使用される用語「抗体V/C接続」は、抗体の可変ドメインと定常ドメインの境界、例えば、重鎖可変ドメインとCH1ドメインの間の、又は軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインの間の境界を指す。同様に、用語「TCR V/C接続」は、TCR可変ドメインと定常ドメインの境界、例えば、TCRアルファ可変ドメインと定常ドメインの間、又はTCRベータ可変ドメインと定常ドメインの間の境界を指す。

20

【0195】

免疫グロブリンのFv領域が、TCR免疫グロブリン様ドメインと整列される場合、抗体V/C接続及びTCR V/C接続もまた整列される。例を、下記表1に示し、ここで抗体重鎖V/C接続（配列番号：270）は、TCRベータV/C接続（配列番号：271）と整列され、抗体軽鎖V/C接続（配列番号：272）は、TCRベータV/C接続（配列番号：273）と整列されている。

【0196】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第一及び／又は第二の接続ドメインは、抗体V/C接続のC末端断片の適切な長さ（例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基）、及びTCR V/C接続のN末端断片の適切な長さ（例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基）を含むように選択され得る。例えば、表1に示したように、接続ドメインは、TCR V/C接続由来の全ての配列（例えば配列番号：145参照）、又はほとんどの配列（例えば配列番号：147参照）、又はTCR V/C接続由来の一部の配列（例えば配列番号：146参照）を有するように、選択されてよい。更に例として表1を使用し、接続ドメインは、抗体V/C接続由来のものよりも、TCR V/C接続由来のより多くの残基を含んでよい（例えば配列番号：147参照）か、又はその逆が当てはまる（例えば配列番号：146参照）。

30

【0197】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第一及び／又は第二の接続ドメインは、抗体V/C接続のそれ又はTCR V/C接続のそれと同等の全長を有する。

40

【0198】

適切な接続ドメインは、構造を基に決定することができる。例えば、抗体及びTCRの三次元構造を重ね、重ねた構造上の抗体V/C接続及びTCR V/C接続の重複を決定し、抗体又はTCR V/C接続由来の配列の長さ又は比を決定する場合に考慮してよい。

【0199】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の接続ドメインは、抗体V/C接続及びTCR V/C接続の断片の間に、スペーサーを含む。任意の好適な配列又は長さのスペ

50

ーサー配列を、それがポリペプチド複合体の抗原結合又は安定性に負の影響を及ぼさない限りは、使用することができる。

【0200】

抗体可変／定常ドメイン境界、及びTCR可変／定常ドメイン境界、及び抗体可変／TCR定常領域境界の配列の例を、下記表1-6に提供している。

【0201】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCBetaを含み、且つC2は、操作されたCAlphaを含む。例証のために、表1は、TCRCBetaに融合された抗体VH、又はTCRCAlphaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH／定常ドメイン境界は、TCR可変／CBeta境界と整列され、抗体VL／定常ドメイン境界は、TCR可変／CAalpha境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：144、145、146、又は147参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：49又は50を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：51又は52を含むか又はこれである。

【0202】

【表1】

表1：VH-CBeta／VL-CAlphaに関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_VH 配列番号:270	...LVTVSS	AS--TKGPS...	Antibody_VL 配列番号:272	...KVEIK	RTVAAPSVF...
TCR_beta 配列番号:271	...RLTVLE	DLKNVFPPE...	TCR_alpha 配列番号:273	...KLIK	PDIQNPDPA...
H_Conjunction_1 配列番号:144	...LVTVSS	ASKNVFPPE...	L_Conjunction_1 配列番号:146	...KVEIK	RTVAAPDPA...
H_Conjunction_2 配列番号:145	...LVTVLE	DLKNVFPPE...	L_Conjunction_2 配列番号:147	...KVEIK	PDIQNPDPA...

【0203】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCAalphaを含み、且つC2は、操作されたCBetaを含む。表2は、TCRCAlphaに融合された抗体VH、又はTCRCBetaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH／定常ドメイン境界は、TCR可変／CAalpha境界と整列され、抗体VL／定常ドメイン境界は、TCR可変／CBeta境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：148、149、又は150参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：129又は130を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：49又は50を含むか又はこれである。

【0204】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：VH-CAIpha/VL-CBetaに関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_H 配列番号:274	…LVTVSS	--ASTKGPS…	Antibody_L 配列番号:276	…KVEIK--	RT---VAAPSVF…
TCR_alpha 配列番号:275	…KLIK--	PDIGNPDPA…	TCR_beta 配列番号:277	…RLTVLE	-DLKNVFPPE…
H_Conjunction_3 配列番号:148	…LVTVSS	ASIGNPDPA…	L_Conjunction_3 配列番号:150	…KVEIKLE	-DLKNVFPPE…
H_Conjunction_4 配列番号:149	…LVTVSS	PDIGNPDPA…	L_Conjunction_4 配列番号:150	…KVEIKLE	-DLKNVFPPE…

10

【0205】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCBetaを含み、且つC2は、操作されたCPre-Alphaを含む。表3は、TCR CBetaに融合された抗体VH、又はTCR CPre-Alphaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH/定常ドメイン境界は、TCR可変/CBeta境界と整列され、抗体VL/定常ドメイン境界は、TCR可変/CPre-Alpha境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：170、171、169、又は156参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：49又は50を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：81又は131を含むか又はこれである。

20

【0206】

【表 3】

表 3：VH-CBeta/VL-CPre-Alphaに関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_H 配列番号:283	…LVTVSS	AS--TKGPS…	Antibody_L 配列番号:285	…KVEIK	RTVAAPSVF…
TCR_beta 配列番号:284	…RLTVLE	DLKNVFPPE…	TCR_alpha 配列番号:286	…KLIK	PDIGNPDPA…
			Pre-TCR_alpha 配列番号:287	…GCPAL	PTGVGGTPF…
H_Conjunction_A 配列番号:170	…LVTVSS	ASKNVFPPE…	L_Conjunction_A 配列番号:169	…KVEIK	RTVAAGTPF…
H_Conjunction_B 配列番号:171	…LVTVLE	DLKNVFPPE…	L_Conjunction_B 配列番号:156	…KVEIK	PTGVGGTPF…

30

【0207】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCPre-Alphaを含み、且つC2は、操作されたCBetaを含む。表4は、TCR CPre-Alphaに融合された抗体VH、又はTCR CBetaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH/定常ドメイン境界は、TCR可変/CPre-Alpha境界と整列され、抗体VL/定常ドメイン境界は、TCR可変/CBeta境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：172、173、174、又は175参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：81、131、132、又は133を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：49又は50を含むか又はこれである。

40

【0208】

50

【表 4】

表 4：VH-CPre-Alpha/VL-CBetaに関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_H 配列番号:288	…LVTVSS	--ASTKGPS…	Antibody_L 配列番号:291	…KVEIK--	RTVAAPSVF…
TCR-alpha 配列番号:289	…KLIK--	PDIGNPDPA…	TCR_beta 配列番号:292	…RLTVLE	-DLKNVPPE…
Pre-TCR_alpha 配列番号:290	…GCPAL--	PTGVGGTPF…			
H_Conjunction_C 配列番号:172	…LVTVSS	<u>ASGVGGTPF</u> …	L_Conjunction_C 配列番号:174	…KVEIK <u>LE</u>	<u>-DLKNVPPE</u> …
H_Conjunction_D 配列番号:173	…LVTVSS	<u>PTGVGGTPF</u> …	L_Conjunction_D 配列番号:175	…KVEIK <u>LE</u>	<u>-DLKNVPPE</u> …

【0209】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCGammaを含み、且つC2は、操作されたCDeltaを含む。表5は、TCRCGammaに融合された抗体VH、又はTCRCDeltaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH/定常ドメイン境界は、TCR可変/CGamma境界と整列され、抗体VL/定常ドメイン境界は、TCR可変/CDelta境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：157、158、159、又は160参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：117又は118を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：119又は120を含むか又はこれである。

【0210】

【表 5】

表 5：VH-CGamma/VL-CDeltaに関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_H 配列番号:293	…LVTVSS	AS--TK-GPS…	Antibody_L 配列番号:143	…KVEIK	---RTVAAPSVF…
TCR_gamma 配列番号:142	…TLVVD	<u>KQLDADVSPK</u> …	TCR_delta 配列番号:55	…RVTVE	<u>PRSQPHTKPSVF</u> …
H_Conjunction_4 配列番号:157	…LVTVSS	<u>ASLDADVSPK</u> …	L_Conjunction_4 配列番号:159	…KVEIK	<u>PRSQPHTKPSVF</u> …
H_Conjunction_5 配列番号:158	…LVTVD	<u>KQLDADVSPK</u> …	L_Conjunction_5 配列番号:160	…KVEIE	<u>PRSQPHTKPSVF</u> …

【0211】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCDeltaを含み、且つC2は、操作されたCGammaを含む。表6は、TCRCDeltaに融合された抗体VH、又はTCRCGammaに融合された抗体VLに有用な接続ドメインに関するデザインの例を示す。抗体VH/定常ドメイン境界は、TCR可変/CDelta境界と整列され、抗体VL/定常ドメイン境界は、TCR可変/CGamma境界と整列される。接続ドメインのデザインの例も、整列形で提供され（例えば配列番号：161、162、163、又は164参照）、第一又は第二の接続ドメインは下線を付けて示した。そのような実施態様において、第一の接続ドメインは、配列番号：123又は124を含むか又はこれである。そのような実施態様において、第二の接続ドメインは、配列番号：125又は126を含むか又はこれである。

【0212】

【表 6】

表 6 : V H - C D e l t a / V L - C G a m m a に関する第一及び第二の接続ドメインデザイン

	接続(重鎖)			接続(軽鎖)	
	可変	定常		可変	定常
Antibody_H 配列番号:56	...LVTVSS	--ASTKGPS...	Antibody_L 配列番号:58	...KVEIK-RTV---	AAPSVF...
TCR_delta 配列番号:57	...RVTVEP	RSQPHTKPS...	TCR_gamma 配列番号:59	...TLVVTD	KQLDADVSPKPT...
H_Conjunction_6 配列番号:161	...LVTVSS	RSQPHTKPS...	L_Conjunction_6 配列番号:163	...KVEIKD	KQLDADVSPKPT...
H_Conjunction_7 配列番号:162	...LVTVEP	RSQPHTKPS...	L_Conjunction_7 配列番号:164	...KVEITD	KQLDADVSPKPT...

10

【0213】

特定の実施態様において、第一のポリペプチドは、式 (I) : V H - H C J - C 1 のように機能的に連結されたドメインを含む配列を含み、且つ第二のポリペプチドは、式 (I I) : V L - L C J - C 2 のように機能的に連結されたドメインを含む配列を含み、ここで：

- V H は、抗体の重鎖可変ドメインであり；
- H C J は、先に規定したような第一の接続ドメインであり；
- C 1 は、先に規定したような第一の T C R 定常ドメインであり；
- V L は、抗体の軽鎖可変ドメインであり；
- L C J は、先に規定したような第二の接続ドメインであり；
- C 2 は、先に規定したような第二の T C R 定常ドメインである。

20

【0214】

特定の実施態様において、C 1 は、配列番号：42-48 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C A l p h a であり、並びに C 2 は、配列番号：32-41 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C B e t a であり；H C J は、配列番号：49 及び 50 からなる群から選択される配列を含むか又はこれであり；L C J は、配列番号：51 及び 52 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

【0215】

30

特定の実施態様において、C 1 は、配列番号：32-41 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C B e t a であり、並びに C 2 は、配列番号：42-48 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C A l p h a であり；H C J は、配列番号：129 及び 130 からなる群から選択される配列を含むか又はこれであり；L C J は、配列番号：49 及び 50 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

【0216】

特定の実施態様において、C 1 は、配列番号：32-41、84、319、320、321、322、323、及び 324 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C B e t a であり、並びに C 2 は、配列番号：311、312、313、314、315、316、317、及び 318 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C P r e - A l p h a であり；H C J は、配列番号：49 及び 50 からなる群から選択される配列を含むか又はこれであり；L C J は、配列番号：81 及び 131 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

40

【0217】

特定の実施態様において、C 1 は、配列番号：311、312、313、314、315、316、317、及び 318 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C P r e - A l p h a であり、並びに C 2 は、配列番号：32-41 からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作された C B e t a であり；H C J は、配列番号：81、131、132、及び 133 からなる群から選択される配列を含む

50

か又はこれであり；L C Jは、配列番号：49及び50からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

【0218】

特定の実施態様において、C1は、配列番号：113、114、333、334、335、336、337、338、339、及び340からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作されたC Gammaであり、並びにC2は、配列番号：325、326、327、328、329、330、331、及び332からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作されたC Deltaであり；H C Jは、配列番号：117及び118からなる群から選択される配列を含むか又はこれであり；L C Jは、配列番号：119及び120からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

10

【0219】

特定の実施態様において、C1は、配列番号：325、326、327、328、329、330、331、及び332からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作されたC Deltaであり、並びにC2は、配列番号：113、114、333、334、335、336、337、338、339、及び340からなる群から選択される配列を含むか又はこれである、操作されたC Gammaであり；H C Jは、配列番号：123及び124からなる群から選択される配列を含むか又はこれであり；L C Jは、配列番号：125及び126からなる群から選択される配列を含むか又はこれである。

【0220】

米国特許第9,683,052号は、T C R定常領域の間の接触境界面内の特定の残基は、2本の重鎖のヘテロ二量体対形成を促進するように、F c領域へと操作され得ることを開示している。これにおいて開示されたT C R定常領域間の接触境界面内のそのような残基及び／又は対応する残基は、軽鎖と重鎖の間の対形成を促進するために、F a b領域、例えばC H 1及びC Lドメインへと操作されることもできる。

20

【0221】

(i i . 抗体可変領域)

【0222】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン（V H）及び第一の軽鎖可変ドメイン（V L）を含む。通常の天然型抗体において、可変領域は、例えば、N-末端からC-末端へ、下記式：F R 1-C D R 1-F R 2-C D R 2-F R 3-C D R 3-F R 4で示されるような、フレームワーク（F R）領域をフランキングすることにより挟まれた3つのC D R領域を含む。本明細書に提供されるポリペプチド複合体は、そのような通常の抗体可変領域を含むことができるが、これに限定されるものではない。例えば、可変ドメインは、可変ドメインが抗原に特異的に結合することが可能である限りは、抗体重鎖又は軽鎖の、合わせて3個以下のC D R、合わせて4個以下のF Rを含んでよい。

30

【0223】

第一の抗体は、第一の抗原特異性を有する。言い換えると、V H及びV Lは、抗原又はエピトープへ特異的に結合することができる抗原結合部位を形成する。抗原特異性は、任意の好適な抗原又はエピトープへ、例えば、外来性抗原、内在性抗原、自己抗原、ネオ抗原、ウイルス抗原又は腫瘍抗原であるものなどに対して向けられ得る。外来性抗原は、吸入、経口摂取又は注入により体に侵入し、且つエンドサイトーシス又はファゴサイトーシスにより、抗原提示細胞（A P C）により提示され、M H C I I複合体を形成し得る。内在性抗原は、細胞の代謝、細胞内ウイルス又は細菌感染の結果として、正常細胞内で作製され、これはM H C I複合体を形成する。自己抗原（例えば、ペプチド、D N A又はR N Aなど）は、自己免疫疾患に罹患した患者の免疫系により認識されるのに対し、正常な状態の下では、この抗原は、その免疫系の標的であってはならない。ネオ抗原は、正常な体からは全体的に存在せず、腫瘍又は癌などの特定の疾患が原因で産生される。特定の実施態様において、この抗原は、特定の疾患（例えば、腫瘍又は癌、自己免疫疾患、感染症及び寄生虫症、心臓血管疾患、神経障害、神経精神医学的状态、外傷、炎症、凝固障害

40

50

）と関連づけられている。特定の実施態様において、この抗原は、免疫系（例えば、B細胞、T細胞、NK細胞、マクロファージなどの免疫学的細胞）と関連づけられている。

【0224】

特定の実施態様において、第一の抗原特異性は、免疫関連抗原又はそのエピトープに向けられる。免疫関連抗原の例としては、T細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK細胞）特異性受容体分子が挙げられる。

【0225】

T細胞特異性受容体分子は、T細胞を結合させ、且つ追加シグナルが存在する場合には、抗原提示細胞又はAPCと称される別の細胞により提示されたエピトープ／抗原により活性化され並びにこれと反応する。T細胞特異性受容体分子は、TCR、CD3、CD28、CD134（OX40とも称される）、4-1BB、CD5、及びCD95（Fas受容体としても公知）であることができる。

【0226】

NK細胞特異性受容体分子の例は、CD16、低親和性Fc受容体及びNKG2D、及びCD2を含む。

【0227】

特定の実施態様において、第一の抗原特異性は、腫瘍関連抗原又はそのエピトープへ向けられる。用語「腫瘍関連抗原」は、腫瘍細胞表面上に提示されているか又は提示することができ、且つ腫瘍細胞上又はその中に配置されている抗原を指す。一部の実施態様において、腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞によってのみ提示され得、正常細胞、すなわち非腫瘍細胞によっては提示されない。一部の他の実施態様において、腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞上に専ら発現され得るか、又は非腫瘍細胞と比べ腫瘍特異性変異を示す。一部の他の実施態様において、腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞及び非腫瘍細胞の両方において認められるが、非腫瘍細胞と比べた場合、腫瘍細胞上で過剰発現されるか、又は非腫瘍組織と比べ腫瘍組織のコンパクトさの少ない構造のために、腫瘍細胞における抗体結合にアクセス可能である。一部の実施態様において、腫瘍関連抗原は、腫瘍の血管上に配置される。

【0228】

腫瘍関連表面抗原の例証的例としては、CD10、CD19、CD20、CD22、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CD133、Fms-様チロシンキナーゼ3（FLT-3、CD135）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4（CSPG4、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）、上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）、Her2neu、Her3、IGFR、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、CDCP1、デルリン1、テナシン、Frizzled1-10、血管抗原VEGFR2（KDR／FLK1）、VEGFR3（FLT4、CD309）、PDGFR-α（CD140a）、PDGFR-β（CD140b）、エンドグリン、CLEC14、Tem1-8、及びTie2が挙げられる。更なる例としては、A33、CAMPATH-1（CDw52）、癌胎児性抗原（CEA）、カルボアンヒドラーゼIX（MN／CAIX）、de2-7EGFR、EGFRvIII、EpCAM、Ep-CAM、葉酸-結合タンパク質、G250、Fms-様チロシンキナーゼ3（FLT-3、CD135）、c-Kit（CD117）、CSF1R（CD115）、HLA-DR、IGFR、IL-2受容体、IL3R、MCSP（メラノーマ関連細胞表面コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）、Muc-1、前立腺特異性膜抗原（PSMA）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異性抗原（PSA）、及びTAG-72が挙げられる。

【0229】

特定の実施態様において、第一の抗原特異性は、以下からなる群から選択される抗原又はそのエピトープに向けられる：CD3、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、CD16、CD47、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD123、CD133、CEA、cdH3、EpCAM、上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）、EGFRvIII（EGFR由来の変異体）、HER2、HER3、dLL3、

10

20

30

40

50

BCMA、シアリル-Lewis^x、5T4、ROR1、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、メソセリン、葉酸受容体1、VEGF受容体、EpCAM、HER2/neu、HER3/neu、G250、CEA、MAGE、プロテオグリカン、VEGF、FGFR、 α V β 3-インテグリン、HLA、HLA-DR、ASC、CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD11、CD13、CD14、CD21、CD23、CD24、CD28、CD30、CD37、CD40、CD41、CD44、CD52、CD64、c-erbB-2、CALLA、MHCII、CD44v3、CD44v6、p97、ガングリオシドGM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1b、GT3、GQ1、NY-ESO-1、NFX2、SSX2、SSX4、Trp2、gp100、チロシナーゼ、Muc-1、テロメラーゼ、サバイビン、G250、p53、CA125、MUC、Wue抗原、Lewis^y抗原、HSP-27、HSP-70、HSP-72、HSP-90、PgP、MCSP、EpHA2、及び細胞表面標的GC182、GT468又はGT512。

10

【0230】

この抗体可変ドメインは、親抗体に由来することができる。親抗体は、例えば、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、又は動物抗体（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど）を含む、任意の型の抗体であることができる。親抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であることができる。

【0231】

特定の実施態様において、親抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ技術、組換え法、ファージディスプレイなど、当該技術分野において公知の様々な方法、又は任意のそれらの組合せにより作製され得る。

20

【0232】

ハイブリドーマ技術は、抗体を発現しているB細胞を不死化B細胞株と融合し、ハイブリドーマを作製することに関与しており、これは更に、抗体産生の高い産生レベル、ハイブリドーマ細胞の良好な成長、及び抗体の強力な結合又は良好な生物活性などの所望の特徴に関して、スクリーニングされる（例えば、Harlowら、(1988) *Antibody: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版参照)）。

【0233】

組換え法は、親抗体を作製する別の方式である。簡単には、関心対象の抗体を分泌しているリンパ球などの細胞を入手し、同定し、単独の細胞が単離され、引き続き逆転写酵素PCRにより、重鎖及び軽鎖可変領域cDNAを作製する。これらの可変領域のcDNA配列を用い、本明細書に提供されるポリペプチド複合体のコード配列を構築し、その後好適な宿主細胞において発現することができる（総説については、例えば、米国特許第5,627,052号；PCT公開WO 92/02551；及び、Babcockら、(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848を参照）。

30

【0234】

抗体ライブラリーは依然、親抗体を得るための代替法である。簡単には、所望の結合特性を有する抗体を同定するために、抗体ライブラリーをスクリーニングすることができる。そのような組換え抗体ライブラリーのスクリーニングの方法は、当該技術分野において周知であり、且つ例えば、米国特許第5,223,409号；PCT公開WO 92/18619；WO 91/17271；WO 92/20791；WO 92/15679；WO 93/01288；WO 92/01047；WO 92/09690；及び、WO 97/29131；Fuchsら、(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372；Hayら、(1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85；Huseら、(1989) *Science* 246:1275-1281；McCaffertyら、(1990) *Nature* 348:552-554；Griffithsら、(1993) *EMBO J.* 12:725-734；Hawkinsら、(1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896；Clacksonら、(1991) *Nature* 352:624-628；Gramら、(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580；Garradら、(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377；Hogenboomら、(1991) *Nucl. Acid Res.* 19:4133-4137；及び、Barbasら、(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982；並びに、米国特許出願公開第20030186

40

50

374に記載された方法を含む。

【0235】

親抗体を得るための別の例証的方法は、ファージディスプレイである(例えば、Brinkmanら、(1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Amesら、(1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleboroughら、(1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persicら、(1997) Gene 187 9-18; 及び、米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号; 及び、第5,969,108号参照)。抗体ドメインをコードしているポリヌクレオチド配列を、ファージ粒子に導入し、様々な機能性抗体ドメインを提示しているファージ粒子のライブラリーを作製する。F d 及び M 1 3 は、通常使用される線維状ファージであり、且つファージ粒子上にディスプレイされる機能性抗体ドメインは、例えば、F a b、F v 又はジスルフィド安定化された F v 抗体ドメインであることができ、これは g e n e I I I I 又は g e n e V I I I によりコードされたファージタンパク質へ組換えにより融合される。ファージライブラリーは、例えば、任意に標識されるか又は固体基板(例えばビーズ)に結合もしくは捕獲された関心対象の抗原を用いてスクリーニングすることができる。選択されたファージに関して、抗体可変ドメインをコードしているそのポリヌクレオチド配列が得られ、本明細書に提供されるポリペプチド複合体の構築に使用される。同様に、抗体ドメインの酵母細胞壁への繋ぐ(例えば、米国特許第6,699,658号参照)により抗体可変ドメインをディスプレイしている酵母ライブラリーが作製され、その後結合した抗原によりスクリーニングされ、本明細書に提供されるポリペプチド複合体の構築に有用な親抗体を得ることができる。

【0236】

更に親抗体は、関心対象の抗原の、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又は全てを含むトランスジェニック非ヒト動物への注入により作製することもでき、これらの動物は例えば、O m n i R a t、O m n i M o u s e (例えば、Osborn M.ら、Journal of Immunology, 2013, 190: 1481-90; Ma B.ら、Journal of Immunological Methods 400-401 (2013) 78-86; Geurts A.ら、Science, 2009, 325:433; 米国特許第8,907,157号; 欧州特許第2152880B1号; 欧州特許第2336329B1号参照)、H u M a b マウス(詳細については、Lonberg, N.ら、Nature 368(6474): 856 859 (1994)参照)、X e n o マウス(Mendezら、Nat Genet., 1997, 15:146-156)、T r a n s C h r o m o マウス(Ishidaら、Cloning Stem Cells, 2002, 4:91-102)、及び V e l o c I m m u n e m o u s e (Murphyら、Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111:5153-5158)、K y M o u s e (Leeら、Nat Biotechnol, 2014, 32:356-363)、及びトランスジェニックウサギ(Flisikowskaら、PLoS One, 2011, 6:e21045)がある。

【0237】

本明細書記載の親抗体は、例えば、異なるフレームワーク又はスカフォールドへ C D R 配列をグラフトするように、1 以上のフレームワーク領域内の 1 以上のアミノ酸残基を置換するように、親和性成熟のため 1 以上の C D R 領域内の 1 以上の残基を置き換えるようになど、更に修飾することができる。これらは、通常の技術を使用し当業者により達成され得る。

【0238】

この親抗体はまた、例えば、治療もしくは診断用途のために F D A により承認されたもの、又は状態の治療のために臨床試験中のもの、又は研究開発中のものなど、当該技術分野において公知の治療的抗体であることができる。公知の抗体の可変領域に関するポリヌクレオチド配列及びタンパク質配列は、例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.htmlなどの、公のデータベースから得ることができる。

【0239】

10

20

30

40

50

治療用抗体の例は、以下を含むが、これらに限定されるものではない：リツキシマブ(リツキサン、IDEC/Genentech/Roche)(例えば、米国特許第5,736,137号参照)、非ホジキンリンパ腫治療に関して承認されたキメラ抗-CD20抗体；HuMax-CD20、Genmabにより現在開発中の抗-CD20、米国特許第5,500,362号記載の抗-CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immunomedics社)、HumaLYM(Intracel)、及びPRO70769(PCT出願PCT/US2003/040426)；トラスツズマブ(ハーセプチン、Genentech)(例えば、米国特許第5,677,171号参照)、乳癌治療に関して承認されたヒト化抗-Her2/neu抗体；Genentechにより現在開発中のペルツズマブ(rhumab-2C4、オムニターゲット)；米国特許第4,753,894号記載の抗-Her2抗体；セツキシマブ(エルピタックス、Imclone)(米国特許第4,943,533号；PCT公開WO 96/40210)、様々な癌について臨床試験中のキメラ抗-EGFR抗体；Abgenix-Immunex-Amgenにより現在開発中のABX-EGF(米国特許第6,235,883号)；Genmabにより現在開発中のHuMax-EGFr(米国特許第7,247,301号)；425、EMD55900、EMD62000、及びEMD72000(Merck KGaA)(米国特許第5,558,864号；Murthyら、(1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-60；Rodeckら、(1987) J. Cell. Biochem. 35(4):315-20；Kettleboroughら、(1991) Protein Eng. 4(7):773-83)；ICR62(Institute of Cancer Research)(PCT公開WO 95/20045；Modjtahediら、(1993) J. Cell Biophys. 22(1-3):129-46；Modjtahediら、(1993) Br. J. Cancer 67(2):247-53；Modjtahediら、(1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35；Modjtahediら、(2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80)；TheraCIM hR3(YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba(米国特許第5,891,996号；第6,506,883号；Mateoら、(1997) Immunotechnol. 3(1):71-81)；mAb-806(Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluthら、(2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(2):639-44)；KSB-102(KS Biomedix)；MR1-1(IVAX, National Cancer Institute)(PCT公開WO 0162931)；及び、SC100(Scancell)(PCT WO 01/88138)；アレムツズマブ(キャンパス、Millenium)、B細胞慢性リンパ球性白血病治療について現在承認されたヒト化mAb；ムロモナブ-CD3(オルトクローンOKT3)、Ortho Biotech/Johnson & Johnsonにより開発された抗-CD3抗体、イブリツモマブチウキセタン(ゼバリン)、IDEC/Schering AGにより開発された抗-CD20抗体、ゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット)、Celltech/Wyethにより開発された抗-CD33 (p67タンパク質)抗体、アレファセプト(アメピブ)、Biogenにより開発された抗-LFA-3 Fc融合体、Centocor/Lillyにより開発されたアブキシマブ(レオプロ)、Novartisにより開発されたバシリキシマブ(シムレクト)、Medimmuneにより開発されたパリビズマブ(シナジス)、インフリキシマブ(レミケード)、Centocorにより開発された抗-TNF α 抗体、アダリムマブ(ヒュミラ)、Abbottにより開発された抗-TNF α 抗体、ヒュミケード、Celltechにより開発された抗-TNF α 抗体、ゴリムマブ(CNTO-148)、Centocorにより開発された完全ヒトTNF抗体、エタネルセプト(エンブレル)、Immunex/Amgenにより開発されたp75 TNF受容体Fc融合体、レネルセプト、Rocheにより開発されたp55 TNF受容体Fc融合体、ABX-CBL、Abgenixにより開発された抗-CD147抗体、ABX-IL8、Abgenixにより開発された抗-IL8抗体、ABX-MA1、Abgenixにより開発された抗-MUC18抗体、Pemtumomab(R1549、90Y-muHMFG1)、Antisomaにより開発された抗-MUC1、Therex(R1550)、Antisomaにより開発された抗-MUC1抗体、Antisomaにより開発されたAngioMab(AS1405)、Antisomaにより開発されたHuBC-1、Antisomaにより開発されたチオプラチン(AS1407)、アンテグレン(ナタリズマブ)、Biogenにより開発された抗- α -4- β 1 (VLA-4)及び α -4- β -7抗体、VLA-1 mAb、Biogenにより開発された抗-VLA-1インテグリン抗体、LTBR mAb、Biogenにより開発された抗-リンホトキシン β 受容体(LTBR)抗体、CAT-152、Cambridge Antibody Technologyにより開発された抗-TGF- β . 2抗体、ABT 874(J695)、Abbottにより開発された抗-IL-12p40抗体、CAT-192、Cambridge Antibody Technology and Genzymeにより開発された抗-TGF- β . 1抗体、CAT-213、Cam

10

20

30

40

50

bridge Antibody Technologyにより開発された抗-エオタキシンL抗体、Cambridge Antibody Technology及びHuman Genome Sciences Inc.により開発されたリンホスタットB抗-Bly s抗体、TRAIL-R1mAb、Cambridge Antibody Technology及びHuman Genome Sciences社により開発された抗-TRAIL-R1抗体、アバスチンベバシズマブ、rhuMab-VEGF)、Genentechにより開発された抗-VEGF抗体、Genentechにより開発された抗-HER受容体ファミリー抗体、抗-組織因子(ATF)、Genentechにより開発された抗-組織因子抗体、ゾレア(オマリズマブ)、Genentechにより開発された抗-IgE抗体、ラプチバ(エファリズマブ)、Genentech及びXomaにより開発された抗-CD11a抗体、Genentech及びMillenium Pharmaceuticalsにより開発されたMLN-02抗体(以前はLDP-02)、HuMax CD4、Genmabにより開発された抗-CD4抗体、HuMax-IL15、Genmab及びAmgenにより開発された抗-IL15抗体、Genmab及びMedarexにより開発されたHuMax-Inflam、HuMax-Cancer、Genmab及びMedarex及びOxford GcoSciencesにより開発された抗-ヘパラーゼI抗体、Genmab及びAmgenにより開発されたHuMax-リンパ腫、Genmabにより開発されたHuMax-TAC、IDEC-131、並びにIDEC Pharmaceuticalsにより開発された抗-CD40L抗体、IDEC-151(クレノリキシマブ)、IDEC Pharmaceuticalsにより開発された抗-CD4抗体、IDEC-114、IDEC Pharmaceuticalsにより開発された抗-CD80抗体、IDEC-152、IDEC Pharmaceuticalsにより開発された抗-CD23、IDEC Pharmaceuticalsにより開発された抗-マクロファージ遊走因子(MIF)抗体、BEC2、Imcloneにより開発された抗-イディオタイプ抗体、IMC-1C11、Imcloneにより開発された抗-KDR抗体、DC101、Imcloneにより開発された抗-flk-1抗体、Imcloneにより開発された抗-VEカドヘリン抗体、CEA-Cide(ラベツズマブ)、Immunomedicsにより開発された抗-癌胎児性抗原(CEA)抗体、LymphoCide(エブラツズマブ)、Immunomedicsにより開発された抗-CD22抗体、Immunomedicsにより開発されたAFP-Cide、Immunomedicsにより開発されたMyelomaCide、Immunomedicsにより開発されたLkoCide、Immunomedicsにより開発されたProstaCide、MDX-010、Medarexにより開発された抗-CTLA4抗体、MDX-060、Medarexにより開発された抗-CD30抗体、Medarexにより開発されたMDX-070、Medarexにより開発されたMDX-018、Osidem(IDM-1)、並びにMedarex及びImmuno-Designed Moleculesにより開発された抗-Her2抗体、HuMax-CD4、Medarex及びGenmabにより開発された抗-CD4抗体、HuMax-IL15、Medarex及びGenmabにより開発された抗-IL15抗体、CNTO 148、Medarex及びCentocor/J&Jにより開発された抗-TNF α 抗体、CNTO 1275、Centocor/J&Jにより開発された抗-サイトカイン抗体、MOR101及びMOR102、MorphoSysにより開発された抗-細胞間接着分子-1(ICAM-1)(CD54)抗体、MOR201、MorphoSysにより開発された抗-線維芽細胞増殖因子受容体3(FGFR-3)抗体、Nuvion(ピシリズマブ)、Protein Design Labsにより開発された抗-CD3抗体、HuZAF、Protein Design Labsにより開発された抗-インターフェロン γ 抗体、Protein Design Labsにより開発された抗- α .5. β .1インテグリン、Protein Design Labsにより開発された抗-IL-12、ING-1、Xomaにより開発された抗-EpCAM抗体、ゾレア(オマリズマブ)、Genentech及びNovartisにより開発されたヒト化抗-IgE抗体、並びにMLN01、Xomaにより開発された抗- β 2インテグリン抗体。別の実施態様において、治療薬としては、KR330(Kirin); huA33抗体(A33、Ludwig Institute for Cancer Research); NT095(α Vインテグリン、Centocor); MEDI-522(α V. β .3インテグリン、Medimmune); volociximab(α V. β .1インテグリン、Biogen/PDL); ヒトmAb216(B細胞グリコシル化された(glycosolated)エピトープ、NCI); BiTE MT103(二重特異性CD19 $\times$ CD3、Medimmune); 4G7 $\times$ H22(二重特異性B細胞 $\times$ FcガンマR1、Medarex/Merck KGa); rM28(二重特異性CD28 $\times$ MALP、欧州特許第EP1444268号); MDX447(EMD 82633)(二重特異性CD64 $\times$ EGFR、Medarex); カツマキシマブ(レモマブ)(二重特異性EpCAM $\times$ 抗-CD3、Trion/Fres); エルツマキシマブ(二重特異性HER2/CD3、Fresenius Biotech); オレゴボマブ(OvaRex)(CA

10

20

30

40

50

- 125、ViRexx); Rencarex(WX G250)(カルボン酸脱水酵素IX、Willex); CNTO 888(CCL2、Centocor); TRC105(CD105 (エンドグリン)、Tracon); BMS-663513(CD137 アゴニスト、Bristol Myers Squibb); MDX-1342(CD19、Medarex); シプリツマブ(MEDI-507)(CD2、Medimmune); オファツムマブ(Humax-CD20)(CD20、Genmab); リツキシマブ(リツキサン)(CD20、Genentech); ベルツズマブ(hA20)(CD20、Immunomedics); エブラツズマブ(CD22、Amgen); ルミリキシマブ(IDEC 152)(CD23、Biogen); ムロモナブ-CD3(CD3、Ortho); HuM291(CD3 f c 受容体、PDL Biopharma); HeFi-1 (CD30、NCI); MDX-060(CD30、Medarex); MDX-1401(CD30、Medarex); SGN-30(CD30、Seattle Genentics); SGN-33(リンツズマブ)(CD33、Seattle Genentics); ザノリムバブ(HuMax-CD4)(CD4、Genmab); HCD122(CD40、Novartis); SGN-40(CD40、Seattle Genentics); カンパスlh(アレムツズマブ)(CD52、Genzyme); MDX-1411(CD70、Medarex); hLL1(EPB-1)(CD74.38、Immunomedics); ガリキシマブ(IDEC-144)(CD80、Biogen); MT293(TRC093/D93)(切断型コラーゲン、Tracon); HuLuc63(CS1、PDL Pharma); イピリムマブ(MDX-010)(CTLA4、Bristol Myers Squibb); トレメリムマブ(地知りムマブ、CP-675,2)(CTLA4、Pfizer); HGS-ETR1(マパツムマブ)(DR4 TRAIL-R1 アゴニスト、Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655(DR5、Amgen); アポマブ(DR5、Genentech); CS-1008(DR5、Daiichi Sankyo); HGS-ETR2(レクサツムマブ)(DR5 TRAIL-R2 アゴニスト、HGS); セツキシマブ(エルビタックス)(EGFR、Imclone); IMC-11F8(EGFR、Imclone); ニモツズマブ(EGFR、YM Bio); パニツムマブ(ベクタビックス)(EGFR、Amgen); ザルツムマブ(HuMaxEGFr)(EGFR、Genmab); CDX-110(EGFR v IIII、AVANT Immunotherapeutics); アデカツマブ(MT201)(Epcam、Merck); エドレコロマブ(Panorex、17-1A)(Epcam、Glaxo/Centocor); MORAb-003(葉酸受容体a、Morphotech); KW-2871(ガングリオシドGD3、Kyowa); MORAb-009(GP-9、Morphotech); CDX-1307(MDX-1307)(hCGb、Celldex); トラスツズマブ(ハーセプチン)(HER2、Celldex); ペルツズマブ(rhuMAb 2C4)(HER2 (DI)、Genentech); アポリツマブ(HLA-DRβ鎖、PDL Pharma); AMG-479(IGF-1R、Amgen); 抗-IGF-1R R1507(IGF1-R、Roche); CP 751871(IGF-R、Pfizer); IMC-A12(IGF1-R、Imclone); B1B022(IGF-1R、Biogen); Mik-β-1(IL-2Rb (CD122)、Hoffman LaRoche); CNTO 328(IL6、Centocor); 抗-KIR(1-7F9)(キラー細胞Ig-様受容体(KIR)、Novo); Hu3S193(ルイス(y)、Wyeth、Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11(LTBR、Biogen); HuHMFG1(MUC1、Antisoma/NCI); RAV12(N-結合型糖エピトープ、Raven); CAL(副甲状腺ホルモン-関連タンパク質(PTH-rP)、University of California); CT-011(PD1、CureTech); MDX-1106(オノ-4538)(PD1、Medarex/Ono); MAb CT-011(PD1、Curetech); IMC-3G3(PDGFRa、Imclone); バビツキシマブ(ホスファチジルセリン、Peregrine); huJ591(PsMA、Cornell Research Foundation); muJ591(PsMA、Cornell Research Foundation); GC1008(TGFb (pan) インヒビター(IgG4)、Genzyme); インフリキシマブ(レミケード)(TNFα、Centocor); A27.15(トランスフェリン受容体、Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3(トランスフェリン受容体、Salk Institute); ベバシズマブ(アバスチン)(VEGF、Genentech); HuMV833(VEGF、Tsukuba Research Lab)PCT公開WO/2000/034337、University of Texas); IMC-18F1(VEGFR1、Imclone); IMC-1121(VEGFR2、Imclone)が挙げられる。

【0240】

a) 抗-CD3結合部分

【0241】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分又は第二の抗原結合部分は、配列番号：342-344からなる群から選択される1、2、もしくは3つの重鎖CDR配列、及び

10

20

30

40

50

／又は配列番号：345－347から選択される1、2、もしくは3つの軽鎖CDR配列を含む、抗－CD3抗体由来の抗－CD3結合部分である。

【0242】

これらのCDR配列は、下記表Aに示した抗－CD3抗体に由来する。WBP3311__2.306.4抗体のCDR配列を、以下に提供する。

【0243】

【表7】

表A.

抗体ID:		CDR1	CDR2	CDR3
WBP3311_2.306.4	VH	配列番号：342	配列番号：343	配列番号：344
		GFAFTDYIYH	WISPGNVNTKYNNENFKG	DGYSLYYFDY
WBP3311_2.306.4	VL	配列番号：345	配列番号：346	配列番号：347
		KSSQSLLNSRTRKNYLA	WASTRQS	TQSHLTRT

10

【0244】

WBP3311__2.306.4抗体の重鎖及びκ軽鎖可変領域の配列を、以下に提供する。

【0245】

WBP3311__2.306.4－VH

アミノ酸配列（配列番号：348）：

QVQLQSQGPELVKPGASVRISCKASGFAFTDYIYHWVKQRPQGQLEWIGWISPGNVNTKYNNENFKGRATLTADLSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYYFDYWQGTTTLTVSS
核酸配列（配列番号：349）：

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCCGTGAGGAT
ATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACAGACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGA
GGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGATGGATTTCTCCTGGAAATGTTAATACTAAA
TACAATGAAAACCTTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGCAGACCTATCCTCCAGCACAGC
CTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAG
ATGGATATTCCTGTATTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
TCA

30

【0246】

WBP3311__2.306.4－VL

アミノ酸配列（配列番号：350）：

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTAFTLTISGVQAEDLAVYFCTQSHLTRTFGGGTKLEIK

核酸配列（配列番号：351）：

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCAC
TATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGG
CTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAACTACTAATCTACTGGGCATCCACT
AGGCAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGCTTTCACTCT
CACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGCACGCAATCTCATA
CTCTTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

40

【0247】

CDRは、抗原結合に寄与することはわかっているが、全てではないが6つのCDRは、必須で交換できないことはわかっている。言い換えるとWBP3311__2.306.4由来の抗－CD3結合部分において、依然CD3への特異的結合親和性を実質的に保持しつつ、1以上のCDRを置換え又は変更又は修飾することは可能である。

【0248】

特定の実施態様において、本明細書に提供される抗－CD3結合部分は、抗－CD3抗体WBP3311__2.306.4の一つの重鎖CDR3配列を含む。特定の実施態様に

50

において、本明細書に提供される抗－ＣＤ３結合部分は、配列番号：３４４を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。重鎖ＣＤＲ３領域は、抗原－結合部位の中心に位置し、従って抗原との最大の接触を生じ、且つ抗原への抗体の親和性に対する最大の自由エネルギーを提供すると考えられる。また、重鎖ＣＤＲ３は、複数の多様化の機序により、長さ、アミノ酸組成及び高次構造に関して、抗原－結合部位の圧倒的に最大の多様なＣＤＲであることも考えられる(Tonegawa S., Nature. 302:575-81 (1983))。重鎖ＣＤＲ３の多様性は、ほとんどの抗体特異性(Xu JL, Davis MM., Immunity. 13:37-45 (2000))、並びに所望の抗原結合親和性(Schier Rら、J Mol Biol. 263:551-67 (1996))を生じるのに十分である。

【０２４９】

特定の実施態様において、本明細書に提供される抗－ＣＤ３結合部分は、抗－ＣＤ３結合部分が、ＣＤ３に特異的に結合することができる限りは、好適なフレームワーク領域（ＦＲ）配列を含む。表Ａに提供されるＣＤＲ配列は、マウス抗体から得られるが、これらは組換え技術などの当該技術分野において公知の好適な方法を用い、とりわけマウス、ヒト、ラット、ウサギなどの任意の好適な種の、任意の好適なＦＲ配列にグラフトされ得る。

【０２５０】

特定の実施態様において、本明細書に提供される抗－ＣＤ３結合部分は、ヒト化されている。

【０２５１】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるヒト化抗原結合部分は、非ヒトであるＣＤＲ配列を除いて、実質的に全てヒト配列で構成される。一部の実施態様において、可変領域ＦＲ、及び存在するならば定常領域は、全面的に又は実質的にヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒトＦＲ配列及びヒト定常領域配列は、異なるヒト免疫グロブリン遺伝子に由来してよく、例えば、ＦＲ配列は１種のヒト抗体に及び定常領域は別のヒト抗体に由来してよい。一部の実施態様において、ヒト化抗原結合部分は、ヒトＦＲ１－４を含む。

【０２５２】

抗－ＣＤ３ヒト化抗体ＷＢＰ３３１１__２．３０６．４－Ｚ１の重鎖及び軽鎖可変領域の配列を、以下に提供する。

【０２５３】

ＷＢＰ３３１１__２．３０６．４－Ｚ１－ＶＨ

アミノ酸配列（配列番号：３５２）：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNT
KYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLLYYFDYWGGTLVTVS
S

核酸配列（配列番号：３５３）：

CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTGTCAAGGT
GTCATGCAAGGCTAGCGGGTTCGCCTTTACTGACTACTACATCCACTGGGTGCGGCAGG
CTCCCGGACAAGGGTTGGAGTGGATGGGATGGATCTCCCGAGGCAATGTCAACACAAAG
TACAACGAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATTACCGCCGACAAGAGCACCTCCACAGC
CTACATGGAGCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACACTGCCGTCTACTACTGTGCCAGGG
ATGGGTACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGC
TCC

【０２５４】

ＷＢＰ３３１１__２．３０６．４－Ｚ１－ＶＬ

アミノ酸配列（配列番号：３５４）：

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFSGGGTKVEIK

核酸配列（配列番号：３５５）：

GATATCGTGATGACCCAGAGCCAGACTCCCTTGCTGTCTCCCTCGGCGAAAGAGCAAC
CATCAACTGCAAGAGCTCCCAAAGCCTGCTGAACTCCAGGACCAGGAAGAATTACCTGG
CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATCTACTGGGCCTCCACC

10

20

30

40

50

CGGCAGTCTGGGGTGCCCGATCGGTTTAGTGGATCTGGGAGCGGGACAGACTTCACATT
GACAATTAGCTCACTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTACTGTACTCAGAGCCACA
CTCTCCGCACATTCGGCGGAGGGACTAAAGTGGAGATTAAG

【0255】

b) 抗-CD19抗体

【0256】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分又は第二の抗原結合部分は、配列番号：356-359からなる群から選択される1、2、もしくは3つの重鎖CDR配列、及び／又は配列番号：360-362から選択される1、2、もしくは3つの軽鎖CDR配列を含む、抗-CD19抗体由来の抗-CD19結合部分である。

10

【0257】

これらのCDR配列は、下記表Bに示した抗体に由来する。これらの抗-CD19抗体のCDR配列を、以下に提供する。

【0258】

【表8】

表B.

		CDR1	CDR2	CDR3
WBP7011_4.155.8	VH	配列番号：356	配列番号：357	配列番号：358
		GYAFTSYNMY	YIDPYNGDITYNQKFKG	TAYAMDY
W7011-4.155.8-z1-P15	VH	配列番号：356	配列番号：359	配列番号：358
		GYAFTSYNMY	YIDPYNADITYNQKFKG	TAYAMDY
WBP7011_4.155.8	VL	配列番号：360	配列番号：361	配列番号：362
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT
W7011-4.155.8-z1-P15	VL	配列番号：360	配列番号：361	配列番号：362
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT

20

【0259】

WBP7011_4.155.8抗体の重鎖及びκ軽鎖可変領域の配列を、以下に提供する。

【0260】

WBP7011-4.155.8-VH

アミノ酸配列（配列番号：363）：

EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGDIT
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCLTTAYAMDYWGQGTSTVTVSS

核酸配列（配列番号：364）：

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGT
ATCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCATTCACTAGCTACAACATGTACTGGGTGAAGCAGA
GCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAATGGTGATACTACC
TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGC
CTACATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTCTCACTA
CGGCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

40

【0261】

WBP7011-4.155.8-VL

アミノ酸配列（配列番号：365）：

QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSTVNYMHWYQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRF
SGSGSGTFYSLTIRSVEADAADYYCHQWSSYPYTFGGGTKLEIK

核酸配列（配列番号：366）：

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCAC
CCTAACCTGCAGTGCCAGCTCGACTGTAAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG
GCACTTCTCCCAAACCTTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTC

50

GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCACAATCAGAAGTGTGGAGGCT
GAAGATGCTGCCGATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCGTACACGTTTCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

【0262】

特定の実施態様において、本明細書に開示された抗-CD19結合部分は、抗-CD19抗体 WBP7011-4.155.8又はW7011-4.155.8-z1-P15の重鎖CDR3配列を含む。特定の実施態様において、本明細書に提供される抗-CD19結合部分は、配列番号：358を含む重鎖CDR3配列を含む。重鎖CDR3領域は、抗原-結合部位の中心に位置し、従って抗原との最大の接触を生じ、且つ抗原への抗体の親和性に対する最大の自由エネルギーを提供すると考えられる。また、重鎖CDR3は、複数の多様化の機序により、長さ、アミノ酸組成及び高次構造に関して、抗原-結合部位の圧倒的に最大の多様なCDRであることも考えられる(Tonegawa S., Nature. 302: 575-81 (1983))。重鎖CDR3の多様性は、ほとんどの抗体特異性(Xu JL, Davis MM., Immunity. 13:37-45 (2000))、並びに所望の抗原-結合親和性(Schier Rら、J Mol Biol. 263:551-67 (1996))を生じるのに十分である。

10

【0263】

特定の実施態様において、本明細書に開示された抗-CD19抗体は、ヒト化されている。抗-CD19ヒト化抗体W7011-4.155.8-z1-P15に関する重鎖及び軽鎖可変領域の配列を、以下に提供する。

【0264】

W7011-4.155.8-z1-P15-VH

アミノ酸配列(配列番号：367)：

QMQLVQSGPEVKKPGTTSVKVSCASGYAFTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYIDPYNADT
TYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLTTAYAMDYWGQGLVTVSS

核酸配列(配列番号：368)：

CAAATGCAGCTCGTCCAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCCGGGACATCCGTCAAGGT
CTCATGTAAGGCTAGCGGGTACGCATTCACCTCCTACAACATGTACTGGGTGCGCCAGG
CCAGAGGACAGAGGTTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCATACAACGCCGATACTACC
TACAATCAGAAGTTTAAAGGGCGGGTGACCATTACCCGGGATATGTCCACCTCCACCGC
CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCCTGACAA
CAGCCTATGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGGCACACTTGTGACTGTGAGCAGT

30

【0265】

W7011-4.155.8-z1-P15-VL

アミノ酸配列(配列番号：369)：

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHWYQQKPKAPKLLIYSTSNLASGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQWSSYPYTFGQGTKLEIK

核酸配列(配列番号：370)：

GACATCCAGCTCACCCAATCCCCTTCTTTCTCCTCTCCGCAAGTGTGCGGAGATAGGGTGAC
TATCACCTGCTCAGCTTCTTCAACCGTGAACCTACATGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCG
GGAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTACAGCACCTCCAATCTGGCCAGTGGAGTGCCAAGC
CGGTTTAGCGGGAGCGGCTCCGGCACTGAATTCACCTTTGACAATTAGCAGCCTTCAGCC
TGAGGACTTTGCCACATATTACTGTACCCAGTGGTCCAGCTACCCCTACACATTCGGGC
AGGGCACAAAGCTGGAGATTAAG

40

【0266】

(二重特異性ポリペプチド複合体)

【0267】

一つの態様において、本開示は、二重特異性ポリペプチド複合体を本明細書において提供する。本明細書において使用される用語「二重特異性」は、2つの抗原結合部分が存在し、その各々が、異なる抗原又は同じ抗原上の異なるエピトープへ特異的に結合することができることを意味する。本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、第一

50

の T C R 定常領域 (C 1) に機能的に連結された第一の重鎖可変ドメイン及び第二の T C R 定常領域 (C 2) に機能的に連結された第一の軽鎖可変ドメインを含む第一の抗原結合部分を含み、ここで C 1 及び C 2 は、C 1 と C 2 の間に少なくとも 1 つの非天然型の安定した鎖間結合を含む二量体を形成することが可能である。本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は更に、第二の抗原結合部位を含むが、T C R 定常領域由来の配列は含まない第二の抗原結合部分を含む。

【 0 2 6 8 】

特定の実施態様において、本開示は、第二の抗原結合部分に会合された第一の抗原結合部分を含む、二重特異性ポリペプチド複合体を提供し、ここで：

第一の抗原結合部分は：

N - 末端から C - 末端へ、第一の T 細胞受容体 (T C R) 定常領域 (C 1) へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン (V H) を含む、第一のポリペプチド；及び

N - 末端から C - 末端へ、第二の T C R 定常領域 (C 2) へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン (V L) を含む、第二のポリペプチド；を含み、

ここで、

C 1 及び C 2 は、C 1 に含まれる第一の変異された残基と C 2 に含まれる第二の変異された残基の間に少なくとも 1 つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ

第一の抗体は、第一の抗原特異性を有し、

第二の抗原結合部分は、第一の抗原特異性とは異なる第二の抗原特異性を有し、並びに

第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然 F a b 対応物である場合の別のものよりも、誤対形成の傾向が少ない。

【 0 2 6 9 】

本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、誤対形成された重鎖及び軽鎖可変ドメインを有する傾向が著しく少ない。何らかの理論に結びつけられることは欲しないが、第一の抗原結合部分中の安定化された T C R 定常領域は、互いに特異的に会合することができ、その結果意図された V H 1 と V L 1 の高度に特異的な対形成に寄与する一方で、V H 1 又は V L 1 の他の意図された抗原結合部位を提供しない可変領域との望ましくない誤対形成は妨げることが考えられる。

【 0 2 7 0 】

W u X i B o d y フォーマットの二重特異性ポリペプチド複合体は、他のフォーマットの二重特異性ポリペプチド複合体と比べた場合に、より長いインビボ半減期を有し、且つ製造することが比較的容易である。

【 0 2 7 1 】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体の第二の抗原結合部分は、第二の抗体の第二の重鎖可変ドメイン (V H 2) 及び第二の軽鎖可変ドメイン (V L 2) を含む。特定の実施態様において、V H 2 及び V L 2 の少なくとも一方は、抗体定常領域へ機能的に連結されるか、又は V H 2 及び V L 2 の両方は、各々、抗体重鎖及び軽鎖定常領域へ機能的に連結される。特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、V H 2 へ機能的に連結された抗体定常 C H 1 ドメイン、及び V L 2 へ機能的に連結された抗体軽鎖定常ドメインを更に含む。例えば、第二の抗原結合部分は、F a b を含む。

【 0 2 7 2 】

第一、第二、第三、及び第四の可変ドメイン (例えば、V H 1、V H 2、V L 1 及び V L 2) が、一つの細胞において発現される場合、V H 1 は V L 1 と特異的に対形成し、且つ V H 2 は V L 2 と特異的に対形成することは高度に望ましく、その結果生じる二重特異性タンパク質生成物は、正確な抗原結合特異性を有するであろう。しかし、ハイブリッド-ハイブリドーマ (又はクアドローマ) などの現存する技術において、V H 1、V H 2、V L 1 及び V L 2 のランダム対形成が起こり、結果的に最大 1 0 の異なる種の生成が生じ

10

20

30

40

50

、その中でただ一つが、機能的二重特異性抗原結合分子である。これは、生成収量を低下するのみではなく、標的生成物の精製を複雑化もする。

【0273】

本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、可変ドメインは、第一及び第二の両方の抗原結合部分が天然の Fab の対応物である場合の別のものよりも、誤対形成する傾向が少ない点で、例外的である。例証的实施例において、第一の抗原-結合ドメインは、VL1-C2 と対形成した VH1-C1 を含み、及び第二の抗原-結合ドメインは、VL2-CL と対形成した VH2-CH1 を含む。驚くべきことに、C1 及び C2 は互いに優先的に会合し、且つ CL 又は CH1 と会合する傾向が少なく、これにより C1-C1、C1-CL、C2-CH、及び C2-CL などの望ましくない対の形成は妨げられ、著しく減少されることがわかった。C1-C2 の特異的会合の結果として、VH1 は VL1 と特異的に対形成し、これにより第一の抗原結合部位とし、並びに CH1 は CL と特異的に対形成し、これにより第二の抗原結合部位を提供する VH2-VL2 の特異的対形成を可能にする。従って、第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、ミスマッチの傾向が少なく、及び例えば、VH1-VL2、VH2-VL1、VH1-VH2、VL1-VL2 の間の誤対形成は、第一及び第二の両方の抗原結合部分が、例えば VH1-CH1、VL1-CL、VH2-CH1、及び VL2-CL の形で、天然 Fab 対応物である場合別のものよりも、有意に減少される。

10

【0274】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、細胞から発現される場合、同等の条件で発現された参照分子よりも、有意に低い誤対形成生成物（例えば、少なくとも 1、2、3、4、5 それ以上、より少ない誤対形成生成物）及び／又は有意に高い生成物収率（例えば、少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60% 以上、より高い収率）を有し、ここで参照分子は、C1 の代わりに天然型 CH1 及び C2 の代わりに天然型 CL を有する以外は、二重特異性ポリペプチド複合体と同一である。

20

【0275】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の抗原結合部分は、二価、三価、四価など、多価である。本明細書において使用される用語「価数」は、所定の分子中の特定された数の抗原結合部位の存在を指す。従って、用語「二価」、「四価」及び「六価」は、各々、抗原結合分子中の、2つの結合部位、4つの結合部位、及び6つの結合部位の存在を意味する。二価の分子は、2つの結合部位が、両方共同抗原又は同じエピトープに特異的に結合する場合に、単一特異性であることができる。同様に、三価の分子は、例えば、2つの結合部位が、第一の抗原（又はエピトープ）に対し単一特異性であり、且つ第三の結合部位が、第二の抗原（又はエピトープ）に特異性である場合に、二重特異性であることができる。特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体における第一及び／又は第二の抗原結合部分は、同じ抗原又はエピトープに特異性のある少なくとも2つの結合部位を持つ、二価、三価、又は四価であることができる。これは、特定の実施態様において、一価の対応物よりも、抗原又はエピトープへのより強力な結合を提供する。特定の実施態様において、二価の抗原結合部分における第一の価数の結合部位及び第二の価数の結合部位は、構造的に同一である（すなわち同じ配列を有する）か、又は構造的に異なる（すなわち同じ特異性を持つとしても異なる配列を有する）。

30

40

【0276】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の抗原結合部分は、多価であり、且つスペーサーを伴うか又は伴わずに、一緒に機能的に連結された2以上の抗原結合部位を含む。

【0277】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の抗原結合部分は、1以上の Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ Fd、Fv、及び scFv 断片、並びに前掲の Spiessら(2015)及び前掲の Brinkmannら(2017)の論文に記載の他の断片、又はそれらの組合せを含み、これらは、重鎖及び／又は軽鎖でスペーサーを伴うか又は伴わずに連結され

50

、且つ少なくとも1つの形は、第二の抗体に結合することが可能である。

【0278】

特定の実施態様において、第二の抗原結合部分は、第二の抗体の2以上のFabを含む。2つのFabは、互いに機能的に連結され得、例えば、第一のFabは、間にスペーサーを伴うか又は伴わずに、第二のFabへ重鎖を介して、共有的に結合され得る。

【0279】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分は更に、第一の二量体形成ドメインを含み、且つ第二の抗原結合部分は、第二の二量体形成ドメインを更に含む。本明細書において使用される用語「二量体形成ドメイン」は、互いに会合し二量体を形成することが可能であるか、又は一部の例において、2つのペプチドの自発的な二量体形成ができる、ペプチドドメインを指す。

【0280】

特定の実施態様において、第一の二量体形成ドメインは、第二の二量体形成ドメインと会合され得る。この会合は、例えば、コネクター、ジスルフィド結合、水素結合、静電的相互作用、塩橋、又は疎水性-親水性相互作用、又はそれらの組合せを介して、任意の好適な相互作用又は連結又は結合を介することができる。例証的二量体形成ドメインは、抗体ヒンジ領域、抗体CH2ドメイン、抗体CH3ドメイン、並びに互いに二量体形成及び会合が可能な他の好適なタンパク質単量体を含むが、これらに限定されるものではない。ヒンジ領域、CH2及び／又はCH3ドメインは、IgG1、IgG2、及びIgG4など、任意の抗体アイソタイプに由来することができる。

【0281】

特定の実施態様において、第一及び／又は第二の二量体形成ドメインは、抗体ヒンジ領域の少なくとも一部を含む。特定の実施態様において、第一及び／又は第二の二量体形成ドメインは、抗体CH2ドメイン、及び／又は抗体CH3ドメインを更に含んでよい。特定の実施態様において、第一及び／又は第二の二量体形成ドメインは、ヒンジFc領域、すなわちヒンジCH2-CH3ドメインの少なくとも一部を含む。特定の実施態様において、第一の二量体形成ドメインは、第一のTCR定常領域のC末端へ機能的に連結され得る。特定の実施態様において、第二の二量体形成ドメインは、第二の抗原結合部分の抗体CH1定常領域のC末端へ機能的に連結される。

【0282】

特定の実施態様において、第一の二量体形成ドメインは、第三の接続ドメインで、第一のTCR定常領域(C1)へ(間にスペーサーを伴う又は伴わずに)機能的に連結される。

【0283】

免疫グロブリンのFv領域がTCR免疫グロブリン様ドメインと整列される場合、抗体ヒンジN末端及びTCRヒンジN末端も、整列される。例を下記表7に示し、ここで抗体ヒンジN末端(配列番号:278又は279)は、TCRベータヒンジN末端(配列番号:280)と整列される。

【0284】

本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体の第三の接続ドメインは、抗体ヒンジN末端の適切な長さ(例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基)、及びTCRヒンジN末端の適当な長さ(例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸残基)を含むように選択することができる。本明細書において使用される用語「ヒンジN末端」は、ヒンジ領域のN末端断片のほとんどを指す。例えば接続ドメインは、抗体ヒンジN末端由来又はTCRヒンジN末端由来の配列の全て、又はほとんど、又は一部を有するように選択されてよい、あるいはTCRヒンジN末端由来よりも、より多くの抗体ヒンジN末端由来の残基を含むか、又はその逆であってよい。

【0285】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第三の接続ドメインは、抗体ヒンジN末端の長さ又はTCRヒンジN末端の長さと同等の合計の長さを有

10

20

30

40

50

する。

【0286】

同様に、適切な第三の接続ドメインは、構造を基に決定することができる。例えば、抗体及びTCRの三次元構造を重ね、且つ抗体又はTCRヒンジのN末端由来の配列の長さ又は特性を決定する場合に、重ねた構造上の抗体ヒンジN末端とTCRヒンジN末端の重複を決定し、考慮する。

【0287】

特定の実施態様において、第三の接続ドメインは、抗体ヒンジN末端及びTCRヒンジN末端由来の断片の間にスペーサーを含む。抗原結合又はポリペプチド複合体の安定性に悪い影響を及ぼさない限りは、任意の好適な配列又は長さのスペーサー配列を使用することができる。

【0288】

抗体ヒンジN末端、TCRヒンジN末端、及び第三の接続ドメインの配列の例は、下記表7、8、9及び10に提供している。

【0289】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCBetaを含み、並びに第一の二量体形成ドメインは、IgG1又はIgG4のヒンジ及びFcを含む。表7は、抗体ヒンジに融合されたTCR CBetaに有用な接続ドメインのデザインの例を示す。抗体ヒンジN末端は、TCR BetaヒンジN末端と整列される。接続ドメインのデザインの例もまた、整列形で提供される（例えば、配列番号：152又は153参照）。そのような実施態様において、第三の接続ドメインは、配列番号：53又は54（これは第三の接続ドメイン及びヒンジC末端を含む）に含まれている。

【表9】

表7：VH-CBeta-ヒンジに関する第三の接続ドメインのデザイン

	ヒンジ	配列番号
IgG1_Antibody_H	EPKS-CDKTHTC...	278
IgG4_Antibody_H	ESK----YGPPC...	279
TCR_beta	WGRADCGFTSVS...	280
Conjunction' _1 (IgG1)	WGRA-SDKTHTC...	152
Conjunction' _1 (IgG4)	WGR----YGPPC...	153

【0290】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCAlpha又はCPre-Alphaを含み、並びに第一の二量体形成ドメインは、IgG1又はIgG4のヒンジ及びFcを含む。表8は、抗体ヒンジに融合されたTCR CAlpha又はCPre-Alphaに有用な接続ドメインのデザインの例を示す。抗体ヒンジN末端は、TCR Alpha又はCPre-AlphaヒンジN末端と整列される。そのような実施態様において、第三の接続ドメインは、配列番号：134、135、140、又は141（これは第三の接続ドメイン及びヒンジC末端を含む）に含まれている。

【0291】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 8：VH-CAlpha-ヒンジに関する第三の接続ドメインのデザイン

	ヒンジ	配列番号
IgG1_Antibody_H	EPKS-CDKTHTC…	281
IgG4_Antibody_H	ESK---YGPPC…	282
TCR_alpha又は TCR_pre-alpha	-----	
Conjunction'_2 (IgG1)	-----SDKTHTC…	154
Conjunction'_2 (IgG4)	-----YGPPC…	155

10

【0292】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCGammaを含み、並びに第一の二量体形成ドメインは、IgG1又はIgG4のヒンジ及びFcを含む。表9は、抗体ヒンジに融合されたTCRCGammaに有用な接続ドメインのデザインの例を示す。抗体ヒンジN末端は、TCRCGammaヒンジN末端と整列される。接続ドメインのデザインの例もまた、整列形で提供される（例えば、配列番号：165又は166参照）。そのような実施態様において、第三の接続ドメインは、配列番号：121又は122（これは第三の接続ドメイン及びヒンジC末端を含む）に含まれている。

【0293】

【表 11】

20

表 9：VH-CGamma-ヒンジに関する第三の接続ドメインのデザイン

	ヒンジ	配列番号
IgG1_Antibody_H	EPKSCDKTHTC…	60
IgG4_Antibody_H	ESK---YGPPC…	61
TCR_gamma	PPIKTDVITMD…	62
Conjunction'_3 (IgG1)	PPIKSDKTHTC…	165
Conjunction'_3 (IgG4)	PPI---YGPPC…	166

【0294】

特定の実施態様において、C1は、操作されたCDeltaを含み、並びに第一の二量体形成ドメインは、IgG1又はIgG4のヒンジ及びFcを含む。表10は、抗体ヒンジに融合されたTCRCDeltaに有用な接続ドメインのデザインの例を示す。抗体ヒンジN末端は、TCRCDeltaヒンジN末端と整列される。接続ドメインのデザインの例もまた、整列形で提供される。そのような実施態様において、第三の接続ドメインは、配列番号：127、又は128（これは第三の接続ドメイン及びヒンジC末端を含む）に含まれている。

30

【0295】

【表 12】

表 10：VH-CDelta-ヒンジ-Fcに関する第三の接続ドメインのデザイン

	ヒンジ及びFc	配列番号
IgG1_Antibody_H	EPKSCDKTHTC…	63
IgG4_Antibody_H	ESK---YGPPC…	103
TCR_delta	FEVKTDSTDHV…	104
Conjunction'_4 (IgG1)	EPKSSDKTHTC…	167
Conjunction'_4 (IgG4)	ESK---YGPPC…	168

40

【0296】

特定の実施態様において、第一の二量体形成ドメインは、操作されたTCR定常領域のC-末端へ機能的に連結され、且つ一緒にキメラ定常領域を形成する。言い換えると、このキメラ定常領域は、操作されたTCR定常領域と機能的に連結された第一の二量体形成

50

ドメインを含む。

【0297】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、I g G 1、I g G 2又はI g G 4由来の第一のヒンジ－F c領域に結合した操作されたC B e t aを含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表11、12、13及び14に提供している。

【0298】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、I g G 1、I g G 2又はI g G 4由来の第一のヒンジに結合された操作されたC A l p h aを含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表11、12、及び13に提供している。

【0299】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、配列番号：134、135、140又は141を含むか又はこれである第三の接続ドメインで、I g G 1、I g G 2又はI g G 4由来の第一のヒンジに結合された操作されたC P r e－A l p h aを含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表15及び16に提供している。

【0300】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、I g G 1、I g G 2又はI g G 4由来の第一のヒンジに結合された操作されたC G a m m aを含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表17、18に提供している。

【0301】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、I g G 1、I g G 2又はI g G 4由来の第一のヒンジに結合された操作されたC D e l t aを含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表17及び18に提供している。

【0302】

特定の実施態様において、キメラ定常領域は、第一の抗体C H 2ドメイン、及び／又は第一の抗体C H 3ドメインを更に含む。例えば、キメラ定常領域は、第三の接続ドメインのC－末端に結合された第一の抗体C H 2－C H 3ドメインを更に含む。そのようなキメラ定常領域の配列の例は、表19に提供している。

【0303】

特定の実施態様において、第一のキメラ定常領域及び第二のT C R定常ドメインは、表19に示したような、配列番号：177／176、179／178、184／183、185／183、180／176、181／178、182／178、184／186、185／186、188／187、196／187、190／189、192／191、192／193、195／194、198／197、200／199、202／201、203／201、203／204、205／204、206／204、208／207、208／209、211／210、213／212、213／151、214／212、214／151、234／233、232／231、216／215、218／217、220／219、222／221、224／223、226／225、227／223、229／228、229／230、236／235及び238／237からなる群から選択される配列の対を含む。

【0304】

これらのキメラ定常領域及び第二のT C R定常ドメインの対は、本明細書開示されたポリペプチド複合体を提供するように、これらが、所望の抗体可変領域へ融合するように操作され得る点で有用である。例えば、抗体重鎖可変領域は、キメラ定常領域（C1を含む）へ融合され、これにより本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第一のポリペプチド鎖とし；並びに、同様に、抗体軽鎖可変領域は、第二のT C R定常ドメイン（C2を含む）へ融合され、これにより本明細書に提供されるポリペプチド複合体の第二のポリペプチド鎖とされる。

【0305】

これらのキメラ定常領域及び第二のT C R定常ドメインの対は、明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体の第一の抗原結合部分を作製するためのプラットフォームと

10

20

30

40

50

して使用することができる。例えば、第一の抗体の可変領域を、プラットフォーム配列のN-末端で融合することができる（例えば、VHをキメラ定常ドメインへ、且つVLをTCR定常ドメインへ、各々融合する）。本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体へ会合するために、第二の抗原結合部分が設計され且つ作製され、二重特異性ポリペプチド複合体を作製することができる。

【0306】

特定の実施態様において、第二の二量体形成ドメインは、ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、又はIgG4などの抗体に由来してよい。特定の実施態様において、第二の二量体形成ドメインは、任意に更に、抗体CH2ドメイン、及び／又は抗体CH3ドメイン、例えばヒンジFc領域などを含む。ヒンジ領域は、第二の抗原結合部位（例えばFab）の抗体重鎖に結合されてよい。

10

【0307】

二重特異性ポリペプチド複合体において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、二量体に会合することが可能である。特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、異なり、且つホモ二量体形成を妨げ及び／又はヘテロ二量体形成を促進する様式で会合する。例えば、第一及び第二の二量体形成ドメインは、同一ではないよう、及びそれらの中にホモ二量体を形成するよりもむしろ互いの間で優先的にヘテロ二量体を形成するように、選択され得る。特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、ノブイントゥホールの形成、疎水性相互作用、静電的相互作用、親水性相互作用、又は増大した可動性を介して、ヘテロ二量体に会合することが可能である。

20

【0308】

特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、各々、ノブイントゥホールの形成が可能であるように変異されたCH2及び／又はCH3ドメインを含む。ノブは、第一のCH2／CH3ポリペプチドにおいて、小型のアミノ酸残基の、より大きい残基との置き換えにより得ることができ、且つホールは、大型の残基のより小さい残基との置き換えにより得ることができる。ノブのホールへの変異部位の詳細については、前掲のRidgwayら(1996)、Spiessら(2015)及びBrinkmannら(2017)の論文を参照されたい。

【0309】

特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、S139C及びT151W置換を含むIgG1アイソタイプの第一のCH3ドメイン（配列番号：295、ノブ）、並びにY134C、T151S、L153A及びY192V置換を含むIgG1アイソタイプの第二のCH3ドメイン（配列番号：296、ホール）を含む。別の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、S136C及びT148W置換を含むIgG4アイソタイプの第一のCH3ドメイン（配列番号：298、ノブ）、並びにY131C、T148S、L150A及びY189V置換を含むIgG4アイソタイプの第二のCH3ドメイン（配列番号：299、ホール）を含む。野生型Fc IgG1（配列番号：294）及びFc IgG4（配列番号：297）の配列及び番号付けは、図20A-20Dに示している。先に注記したように、XnYは、Fc領域（例えばFc領域のCH3ドメイン）に言及する場合、アミノ酸残基の番号付けは、図20A-20Dに示した番号付けを基にしている。

30

40

【0310】

特定の実施態様において、第一及び第二の二量体形成ドメインは、第一のヒンジ領域及び第二のヒンジ領域を更に含む。例えば、置換の電荷対は、IgG1及びIgG2のヒンジ領域へ導入され、ヘテロ二量体形成を促進することができる。詳細は、前掲のBrinkmannらの論文(2017)を参照されたい。

【0311】

二重特異性フォーマット

【0312】

本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、当該技術分野において公知の

50

いずれか好適な二重特異性フォーマットであることができる。特定の実施態様において、二重特異性ポリペプチド複合体は、参照二重特異性の抗体フォーマットを基にしている。二重特異性フォーマットに関して本明細書において使用される「基にしている」とは、一つの抗原結合部分が、C1に機能的に連結されるVH及びC2へ機能的に連結されるVLを含むように修飾され、ここでC1及びC2は、先に規定したように、少なくとも1つ非天然型鎖間結合により会合されていること以外は、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体が、参照二重特異性抗体と同じ二重特異性フォーマットをとることを意味する。当該技術分野において公知の参照二重特異性抗体フォーマットの例は、(i) 対称性のFcを持つ二重特異性抗体、(ii) 非対称性のFcを持つ二重特異性抗体、(iii) 追加の抗原結合部分が付け加えられた通常の抗体、(iv) 二重特異性抗体断片、(v) 追加の抗原結合部分が付け加えられた通常の抗体断片、(vi) ヒトアルブミン又はヒトアルブミン-結合ペプチドが付け加えられた二重特異性抗体を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0313】

BsIgGは、各抗原について一価であり、且つ単独の宿主細胞における2本の軽鎖及び2本の重鎖の同時-発現により作製することができる。付け加えのIgGは、操作され、軽鎖又は重鎖のいずれかのアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれかに、追加の抗原結合ユニットを付け加えることにより、二重特異性IgGを形成する。追加の抗原-結合ユニットは、DVD-Igなどの単ドメイン抗体(対形成しないVL又はVH)、対形成した抗体可変ドメイン(例えば、Fv又はscFv)又は操作されたタンパク質スカフォールドであることができる。BsIgG中のいずれかの抗原-結合ユニット、特に対形成したVH-CH1/VL-CLは、本明細書に開示されたようにCH1をC1へ及びCLをC2へ置き換えるように修飾し、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体とすることができる。

20

【0314】

二重特異性抗体断片は、抗体に由来するが、抗体定常ドメインの一部又は全てを欠いている抗原-結合断片である。そのような二重特異性抗体断片の例は、例えば、単ドメイン抗体、Fv、Fab及びダイアボディなどを含む。本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体とするために、二重特異性抗体断片中の抗原-結合部位(例えば特に対形成したVH-CH1/VL-CL)は、本明細書に開示されたポリペプチド複合体(例えば、VH-C1/CL-C2)を含むように修飾することができる。

30

【0315】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、全IgG又はIgG-様分子などの「全」抗体のフォーマット、並びにタンデム単鎖可変領域分子(taFv)、ダイアボディ(Db)、単鎖ダイアボディ(scDb)及びこれらの様々な他の誘導体などの小型の組換えフォーマットを基にしている(Byrne H.ら、(2013) Trends Biotech, 31 (11): 621-632により説明されたような二重特異性抗体フォーマットと比較)。二重特異性抗体の例は、クアドローマ、化学的にカップリングされたFab(抗原結合断片)、及びBiTE(二重特異性T細胞エンゲージャー)を含むが、これらに限定されるものではないフォーマットを基にしている。

40

【0316】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、以下から選択された二重特異性のフォーマットを基にしている：トリオマブ；ハイブリッドハイブリドーマ(クアドローマ)；多重特異性アンチカリンプラットフォーム(Pieris)；ダイアボディ；単鎖ダイアボディ；タンデム単鎖Fv断片；TandAb、三重特異性Ab(Affimed)；Darts(デュアル親和性再標的化；MacroGenics)；二重特異性Xmab(Xencor)；二重特異性T細胞エンゲージャー(Bite；Amgen；55kDa)；Triplebodies；トリボディ(Fab-scFv)融合タンパク質(Creative Biolabs)多機能性組換え抗体誘導体；デュオボディプラットフォーム(Genmab)；ドックアンドロックプラットフォーム；ノブイントゥホール(KIH)プラットフォーム；ヒト化二重特異性IgG抗体(REGN1979)(Regener

50

on); Mab₂ 二重特異性抗体(F-Star); DVD-Ig (デュアル可変ドメイン免疫グロブリン)(Abbvie); カッパーラムダボディ; TBTI(四価二重特異性タンデムIg); 並びに、CrossMab。

【0317】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、CrossMab; DAF(ツーインワン); DAF(フォーインワン); DutaMab; DT-IgG; ノブイントゥホール共通LC; ノブイントゥホール集成体; 荷電対; Fab-アーム交換; SEEDbody; トリオマブ; LUZ-Y; Fcab; カッパ-ラムダ-ボディ; 及び直交性Fabを含む、二重特異性IgG-様抗体(BsIgG)から選択された二重特異性フォーマットを基にしている。二重特異性抗体フォーマットの詳細な説明については、Spiess C., Zhai Q.及びCarter P. J.の(2015) Molecular Immunology 67: 95-106を参照し、この論文はその全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

10

【0318】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFv-(L)IgG; IgG(L, H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zybody; 及び、DVI-IgG(フォーインワン)を含む、追加の抗原結合部分を持つ、IgGが付け加えられた抗体から選択される、二重特異性フォーマットを基にしている(同文献参照)。

20

【0319】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、ナノボディ; ナノボディ-HAS; BiTE; ディアボディ; DART; TandAb; scディアボディ; sc-ディアボディ-CH3; ディアボディ-CH3; トリプルボディ; ミニ抗体; ミニボディ; TriBiミニボディ; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')₂; F(ab')₂-scFv₂; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; 四価HCAb; scディアボディ-Fc; ディアボディ-Fc; タンデムscFv-Fc; 及び、イントラボディを含む、二重特異性抗体断片から選択されたフォーマットを基にしている(同文献参照)。

30

【0320】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、ドック及びロック; ImmTAC; HSAbody; scディアボディ-HAS; 及び、タンデムscFv-毒素などの二重特異性フォーマットを基にしている(同文献参照)。

【0321】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、IgG-IgG; Cov-X-Body; 及び、scFv1-PEG-scFv2を含む、二重特異性抗体コンジュゲートから選択されたフォーマットを基にしている(同文献参照)。

【0322】

特定の実施態様において、第一の抗原結合部分及び第二の結合部分は、Ig-様構造に会合することができる。Ig-様構造は、抗原結合のための2本のアーム並びに会合及び安定化のための1本のステムを持つ、Y字型の構築体を有する天然抗体のようである。天然抗体との類似性は、良好なインビボにおける薬物動態、所望の免疫学的反応、及び安定性などの、様々な利点を提供し得る。本明細書に提供される第二の抗原結合部分に会合された本明細書に提供される第一の抗原結合部分を含むIg-様構造は、Ig(例えば、IgG)のそれと同程度の熱安定性を有することはわかっている。特定の実施態様において、本明細書に提供されるIg-様構造は、天然IgGの少なくとも70%、80%、90%、95%又は100%である。

40

【0323】

50

特定の実施態様において、二重特異性ポリペプチド複合体は、i) V H 1 - C 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 ; i i) V L 1 - C 2 ; i i i) V H 2 - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3、及び i v) V L 2 - C L の 4 つのポリペプチド鎖を有し、ここで C 1 及び C 2 は、少なくとも 1 つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ 2 つのヒンジ領域及び／又は 2 つの C H 3 ドメインは、二量体形成を促進することができる 1 以上の鎖間結合を形成することが可能である。

【 0 3 2 4 】

二重特異性複合体の抗原特異性

【 0 3 2 5 】

本明細書に提供される二重特異性複合体は、2 種の抗原特異性を有する。第一及び第二の抗原結合部分は、各々、第一及び第二の抗原特異性に向けられる。

【 0 3 2 6 】

第一及び第二の抗原特異性は、同一であってよく、言い換えると第一及び第二の抗原結合部分は、同じ抗原分子、又は同じ抗原分子の同じエピトープへ結合してよい。

【 0 3 2 7 】

あるいは、第一及び第二の抗原特異性は、異なるとよい。例えば、第一及び第二の抗原 - 結合部分は、異なる抗原に結合することができる。そのような二重特異性ポリペプチド複合体は、例えば、2 つの異なる抗原を密に近接させ、これによりそれらの相互作用を促進する（例えば、免疫学的細胞を、腫瘍抗原又は病原体抗原に密に近接させ、これにより免疫系によるそのような抗原の認識又は除去を促進する）ことにおいて有用である。別の例は、第一及び第二の抗原 - 結合部分は、1 つの抗原の異なる（及び任意に重複しない）エピトープに結合することができる。これは、標的抗原、特に変異を受けやすい抗原（例えばウイルス抗原）の認識を増強するか又はこれに結合することにおいて有用である。

【 0 3 2 8 】

一部の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性複合体の抗原特異性の一方は、T 細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK 細胞）特異性受容体分子に向けられる。一部の実施態様において、第一及び第二の抗原結合部分の一方は、C D 3、T C R、C D 2 8、C D 1 6、N K G 2 D、O x 4 0、4 - 1 B B、C D 2、C D 5 又は C D 9 5 へ特異的に結合することが可能であり、且つ他方は、腫瘍関連抗原へ特異的に結合することが可能である。

【 0 3 2 9 】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性複合体の抗原特異性の一つは、C D 3 に向けられる。特定の実施態様において、二重特異性複合体の第一の抗原結合部分は、C D 3 へ特異的に結合することが可能である。特定の実施態様において、二重特異性複合体の第二の抗原結合部分は、C D 3 へ特異的に結合することが可能である。

【 0 3 3 0 】

特定の実施態様において、二重特異性複合体の抗原結合部分は、両方共抗 - C D 3 抗体に由来した V H 1 及び V L 1 を含む。特定の実施態様において、第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドが、配列番号：2 / 1、3 / 4、5 / 1、6 / 3、7 / 3、9 / 8、10 / 8、9 / 11、10 / 11、13 / 12、15 / 14、17 / 16、17 / 18、20 / 19、21 / 12、28 / 3、29 / 3、30 / 12、31 / 12、65 / 64、67 / 66、69 / 68、70 / 68、70 / 71、72 / 71、73 / 71、75 / 74、75 / 76、78 / 77、86 / 85、90 / 89、91 / 92、94 / 93、96 / 95、98 / 97、99 / 95、101 / 100、101 / 102、106 / 105、108 / 107、110 / 109、112 / 111、137 / 136、138 / 136、137 / 139 及び 138 / 139 からなる群から選択される配列の対を含み、ここで表 20 に示したように、抗 - C D 3 抗体の可変領域（T 3）が、T C R 定常領域へ融合されている、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体が本明細書に提供される。

【 0 3 3 1 】

一部の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性複合体の抗原特異性の一方は、T細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK細胞）特異性受容体分子へ向けられ、他方の抗原特異性は、腫瘍関連表面抗原へ向けられる。特定の実施態様において、二重特異性複合体の第一の抗原結合部分は、T細胞特異性受容体分子及び／又はナチュラルキラー細胞（NK細胞）特異性受容体分子（CD3など）へ特異的に結合することが可能であり、並びに第二の抗原結合部分は、腫瘍関連抗原（CD19など）へ特異的に結合することが可能であり、又はその逆もあてはまる。

【0332】

特定の実施態様において、二重特異性ポリペプチド複合体は、実施例8及び表20に示したような、配列番号：22／12／24／23（E17、IgG1）、25／12／26／23（E17、IgG4）、及び25／12／27／23（F16）からなる群から選択される4-配列組合せを含み、ここで第一の抗原結合部分はCD3へ結合し、第二の抗原結合部分はCD19へ結合する。E17のデザインは、二重特異性の二価抗体であり、並びにF16のデザインは、抗-CD19抗体Fabの2つの反復配列を持つ二重特異性で三価の抗原-結合複合体である。

【0333】

特定の実施態様において、二重特異性ポリペプチド複合体は、CTLA-4に結合する第一の抗原結合部分、及びPD-1に結合する第二の抗原結合部分を含み、又はその逆もあてはまる。

【0334】

特定の実施態様において、二重特異性ポリペプチド複合体は、以下を含む、4つのポリペプチド鎖を含む：i) 第一のキメラ定常領域に機能的に連結されたVH1；ii) 第二のキメラ定常領域に機能的に連結されたVL1；iii) 通常の抗体重鎖定常領域に機能的に連結されたVH2、及びiv) 通常の抗体軽鎖定常領域に機能的に連結されたVL2。特定の実施態様において、第一のキメラ定常領域は、各々先に規定したようにC1-ヒンジ-CH2-CH3を含むことができる。特定の実施態様において、第二のキメラ定常領域は、先に規定したようにC2を含むことができる。特定の実施態様において、通常の抗体重鎖定常領域は、各々先に規定したようにCH1-ヒンジ-CH2-CH3を含むことができる。特定の実施態様において、通常の抗体軽鎖定常領域は、先に規定したようにCLを含むことができる。

【0335】

以下の構築体の名称を、本開示においては互換的に使用する：E17-Design-2-QQQQとW3438-T3U4、E17-1.uIgG4.SP；F16-Design-2-QQQQとW3438-T3U4、F16-1.uIgG4.SP；U6T5.G25.IgG4とW3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP；及び、U6T1.G25R.IgG4とW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP。

【0336】

調製方法

【0337】

本開示は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、及び二重特異性ポリペプチド複合体をコードしている単離された核酸又はポリヌクレオチドを提供する。

【0338】

本明細書において使用される用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖型又は二本鎖型のデオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）及びそれらのポリマーを指す。具体的に限定しない限りは、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し且つ天然に生じるヌクレオチドに類似した様式で代謝される天然ヌクレオチドの既知のアナログを含むポリヌクレオチドを包含している。別に指定しない限りは、特定のポリヌクレオチド配列はまた、それらの保存的に修飾された変種（例えば、縮重コドン置換）、アレル、オルソログ、SNPs、及び相補配列、並びに明確に指定された配列を暗示的に包含して

10

20

30

40

50

いる。具体的には、縮重コドン置換は、1以上の選択された（又は全ての）コドンの第三の位置が、混合された(mixed)-塩基及び／又はデオキシノシン残基により置換されているような配列を作製することにより、達成され得る(Batzerら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 及び、Rosso liniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)参照)。

【0339】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体をコードしている核酸又はポリヌクレオチドは、組換え技術を用いて、構築され得る。この目的のために、親抗体の抗原結合部分（CDR又は可変領域など）をコードしているDNAは通常の手順（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合することが可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）を用い、単離され、且つ配列決定される。同様に、TCR定常領域をコードしているDNAもまた得ることができる。例として、可変ドメイン（VH）をコードしているポリヌクレオチド配列及び第一のTCR定常領域（C1）をコードしているポリヌクレオチド配列を入手し、且つ宿主細胞における転写及び発現ができるように機能的に連結され、第一のポリペプチドを作製する。同様に、宿主細胞における第二のポリペプチドの発現ができるように、VLをコードしているポリヌクレオチド配列は、C1をコードしているポリヌクレオチド配列へ機能的に連結される。必要ならば、1以上のスペーサーに関するコード化ポリヌクレオチド配列もまた、他のコード配列に機能的に連結され、所望の生成物の発現ができる。

【0340】

コード化ポリヌクレオチド配列は更に、任意に発現ベクター中で、1以上の調節配列へ機能的に連結され、第一及び第二のポリペプチドの発現又は生成は、実行可能であり且つ適切な制御下にあることができる。

【0341】

コード化ポリヌクレオチド配列（複数）は、当該技術分野において公知の組換え技術を用い、更なるクローニング（DNAの増幅）又は発現のために、ベクターへ挿入することができる。別の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体は、当該技術分野において公知の相同組換えにより作製されてよい。多くのベクターが利用可能である。ベクター構成成分は一般に、シグナル配列、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）、並びに転写終結配列の1以上を含むが、これらに限定されるものではない。

【0342】

本明細書において使用される用語「ベクター」は、タンパク質をコードしているポリヌクレオチドが、そのタンパク質の発現をもたらすように、機能的に挿入されているビヒクルを指す。典型的には、この構築体はまた、適切な調節配列も含む。例えば、ポリヌクレオチド分子は、宿主細胞における所望の転写体／遺伝子の発現を可能にする様式で、コード配列へ機能的に連結された、ガイドRNAをコードしているヌクレオチド配列及び／又は位置指定されたポリペプチド修飾をコードしているヌクレオチド配列の5'-フランキン

グ領域に位置した、調節配列を含むことができる。ベクターは、宿主細胞内に保有される遺伝子エレメントの発現をもたらすように、宿主細胞を形質転換、形質導入、又は形質移入するために使用されてよい。ベクターの例は、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、又はP1-由来の人工染色体（PAC）などの人工染色体、ラムダファージ又はM13ファージなどのバクテリオファージ、並びに動物ウイルスを含む。ベクターとして使用される動物ウイルスの種類は、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス（例えば、SV40）がある。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、及びレポーター遺伝子を含む、発現を制御するための様々なエレメントを含んでよい。加えて、ベクターは

、複製起点を含んでよい。ベクターはまた、非限定的にウイルス粒子、リポソーム、又はタンパク質コーティングを含む、細胞へのその侵入を補助する物質を含んでよい。

【0343】

一部の実施態様において、ベクター系は、哺乳動物、細菌、酵母などの系統を含み、非限定的に、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2などのプラスミド、並びに他の研究室で及び商業的に入手可能なベクターを含む。好適なベクターは、プラスミド、又はウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなど）を含んでよい。

10

【0344】

本明細書に提供されるポリヌクレオチド配列（複数）を含むベクターは、クローニング又は遺伝子発現のために、宿主細胞へ導入することができる。本明細書において使用される語句「宿主細胞」は、それに外来性ポリヌクレオチド及び／又はベクターが導入される細胞を指す。

【0345】

本明細書におけるベクター内のDNAのクローニング又は発現に適した宿主細胞は、先に説明したような、原核細胞、酵母、又はより高等な真核細胞である。この目的に適した原核細胞は、グラム陰性菌又はグラム陽性菌などの真正細菌、例えば、大腸菌などのエシェリキア属、エンテロバクター属、エルウィニア属などの腸内細菌科、クレブシエラ属、プロテウス属、例えばサルモネラ・ティフィムリウスなどのサルモネラ属、例えばセラチア・マルセッセンスなどのセラチア属、及びシゲラ属、並びにB.ズブチリス及びB.リケニホルミスなどのバチルス属、P.アエルギノーサなどのシュードモナス属、及びストレプトマイセス属などを含む。

20

【0346】

原核生物に加え、糸状菌又は酵母などの真核微生物は、ポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体をコードしているベクターのクローニング又は発現の宿主に適している。サッカロミセス・セレビシアエ、又は通常のパン酵母は、より下等な真核宿主微生物の中でも最も一般的に使用される。しかし、以下の数多くの他の属、種及び株が一般に入手可能であり、且つここで有用である：シゾサッカロミセス・ポンベ；クルイベロマイセス宿主、例えばK.ラクチス、K.フラギリス(ATCC 12,424)、K.ブルガリカス(ATCC 16,045)、K.ウィケラミ(wickeramii)(ATCC 24,178)、K.ワルチ(waltii)(ATCC 56,500)、K.ドロソフィラルム(ATCC 36,906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアヌス；ヤロウイア属(EP 402,226)；ピキア・パストリス(EP 183,070)；カンジダ属；トリコデルマ・レーシア(EP 244,234)；アカパンカビ(Neurospora crassa)；シュワニオミセス属、例えばシュワニオミセス・オクシデンタリスなど；並びに、糸状菌、例えば、ニューロスボラ属、ペニシリウム属、トリボクラジウム属、並びにアスペルギルス属宿主、A.ニジュランス及びA.ニジェールなど。

30

40

【0347】

本明細書に提供されるグリコシル化されたポリペプチド複合体、二重特異性ポリペプチド複合体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物細胞及び昆虫細胞を含む。宿主由来の数多くのバキュロウイルス株及び変種並びに対応する許容状態の昆虫宿主細胞、例えばスポドブレタ・フルギペルダ（ケムシ）、アエデス・アエジプチ（蚊）、アエデス・アルボピクツス（蚊）、ドロソフィラ・メラノガステル（ミバエ）、及びボンミクス・モリガ、同定されている。形質移入のための様々なウイルス株は、公に入手可能であり、例えばオートグラファ・カリフォルニカ(Autographa californica) NPVのL-1変種及びボンミクス・モリNPVのBm-5株があり、並びにそのようなウイルスは、本発明に従い本明細書におけるウイルスとして、特にスポドブレ

50

ラ・フルギペルダ細胞の形質移入のためのウイルスとして使用される。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。

【0348】

しかし、最も興味深いのは、脊椎動物細胞であり、且つ培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、慣習的手順となりつつある。有用な哺乳動物の宿主細胞株の例は、SV40により形質転換されたサル腎CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胎児腎株（懸濁培養における成長のためにサブクローニングした293又は293細胞、Grahamら、J. Gen Virol. 36:59 (1977))、例えばExp i 293など；ベビーハムスター腎細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－DHFR（CHO、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather、Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎細胞（CV1、ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；Buffalo系ラット肝細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳癌細胞（MMT 060562、ATCC CCL51）；TRI細胞（Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及び、ヒト肝細胞癌株（Hep G2）がある。

10

【0349】

前述の発現ベクター又はクローニングベクターにより形質転換される宿主細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、又はクローニングベクターの増幅のために適切に改変された通常の栄養培地において培養され得る。

20

【0350】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体の作製のために、発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、様々な培地内で培養されてよい。Ham F10 (Sigma)、最少必須培地（MEM）（Sigma）、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（Sigma）などの市販の培地が、宿主細胞の培養に適している。加えて、Hamら、Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnesら、Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号；第4,657,866号；第4,927,762号；第4,560,655号；又は、第5,122,469号；WO 90/03430；WO 87/00195；又はU.S. Pat. Re. 30,985に記載された培地のいずれかを、宿主細胞の培養培地として使用してよい。これらの任意の培地は、必要に応じて、ホルモン及び／又は他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、又は上皮細胞増殖因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など）、緩衝液（HEPESなど）、ヌクレオチド（アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（ゲンタマイシン（商標）薬など）、微量元素（マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と規定される）、並びにグルコース又は同等のエネルギー源を補充してよい。任意の他の必要な補給物もまた、当業者に公知である適当な濃度で含んでよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞でこれまでに使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

30

【0351】

一つの態様において、本開示は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体を発現する方法を提供し、これは本明細書に提供される宿主細胞を、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体が発現される条件下で培養することを含む。

40

【0352】

特定の実施態様において、本開示は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体を作製する方法を提供し、これは、a) 宿主細胞へ：N-末端からC-末端へ、第一のTCR定常領域（C1）へ機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン（VH）を含む第一のポリペプチドをコードしている第一のポリヌクレオチド、及びN-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域（C2）に機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可

50

変ドメイン（V L）を含む第二のポリペプチドをコードしている第二のポリヌクレオチドを導入する工程であって：ここで、C 1及びC 2は、C 1とC 2の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、C 1及びC 2の二量体を安定化することが可能であり、並びに第一の抗体は、第一の抗原特異性を有する工程；b）宿主細胞にポリペプチド複合体を発現させる工程：を含む。

【0353】

特定の実施態様において、本開示は、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体を作製する方法を提供し、これは、a）宿主細胞へ：N-末端からC-末端へ、第一のTCR定常領域（C 1）機能的に連結された第一の抗体の第一の重鎖可変ドメイン（V H）を含む第一のポリペプチドをコードしている第一のポリヌクレオチド、N-末端からC-末端へ、第二のTCR定常領域（C 2）へ機能的に連結された第一の抗体の第一の軽鎖可変ドメイン（V L）を含む第二のポリペプチドをコードしている第二のポリヌクレオチド、並びに第二の抗原結合部分をコードしている1以上の追加のポリヌクレオチドを導入する工程であって：ここで、C 1及びC 2は、C 1に含まれる第一の変異された残基とC 2に含まれる第二の変異された残基の間に少なくとも1つの非天然型鎖間結合を含む二量体を形成することが可能であり、且つ非天然型鎖間結合は、C 1及びC 2の二量体を安定化することが可能であり、第一の抗原結合部分及び第二の抗原結合部分は、第一の抗原結合部分が天然Fab対応物である場合の別のものよりも、減少された誤対形成を有し、並びに第一の抗体は、第一の抗原特異性を有し、且つ第二の抗体は、第二の抗原特異性を有する工程；b）宿主細胞に二重特異性ポリペプチド複合体を発現させる工程：を含む。

【0354】

特定の実施態様において、本方法は更に、ポリペプチド複合体を単離することを含む。

【0355】

組換え技術を使用する場合、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、二重特異性ポリペプチド複合体は、細胞内、細胞膜周辺腔内で生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。生成物が細胞内で生成される場合、第一の工程として、宿主細胞又は溶解した断片のいずれかの微粒子デブリを、例えば遠心分離又は限外濾過により除去する。Carterら、Bio/Technology 10:163-167 (1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔へ分泌される抗体を単離する手順を説明している。簡単に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）の存在下で、約30分間かけて解凍する。細胞デブリは、遠心分離により除去することができる。生成物が培地へ分泌される場合、そのような発現系由来の上清を、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用い、最初に濃縮する。タンパク質分解を阻害するために、PMSFなどのプロテアーゼインヒビターを、前述の工程のいずれかにおいて含んでよく、且つ抗生物質を、偶発的な夾雑物の成長を防ぐために含んでよい。

【0356】

細胞から調製された本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、塩析、及び親和性クロマトグラフィーなどを用い精製することができ、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技術である。

【0357】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体が、免疫グロブリンFcドメインを含む場合、ポリペプチド複合体に存在するFcドメインの種類及びアイソタイプに応じて、プロテインAを、親和性リガンドとして使用することができる。プロテインAは、ヒト γ 1、 γ 2、又は γ 4重鎖を基にしたポリペプチド複合体の精製に使用することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト γ 3に推奨される(Gussら、EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。それに親和性リガンドが結合されたマトリクスは、最も頻繁には

アガロースであるが、他のマトリクスも利用可能である。制御された多孔質ガラス(CPG)又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの、機械的に安定したマトリクスは、アガロースにより達成され得るものよりも、より速い流量及びより短い処理時間が可能である。

【0358】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体がCH₃ドメインを含む場合、Bakerbond ABX樹脂(J. T. Baker、Phillipsburg、N.J.)が、精製に有用である。イオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、ヘパリン上のクロマトグラフィー、SEPHAROSE(商標)、陰イオンもしくは陽イオン交換樹脂上のクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラムなど)、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製の他の技術も、回収されるべき抗体に応じて利用可能である。

10

【0359】

任意の予備精製工程(複数)に続けて、関心対象のポリペプチド複合体及び夾雑物を含有する混合物を、好ましくは低い塩濃度で実行される(例えば、約0~0.25Mの塩)、pH約2.5~4.5の溶出緩衝液を使用し、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供する。

【0360】

特定の実施態様において、本明細書に提供される二重特異性ポリペプチド複合体は、通常の方法を用いて、高い収率で容易に精製することができる。二重特異性ポリペプチド複合体の利点の一つは、重鎖と軽鎖の可変ドメイン配列の間の誤対形成の著しい減少である。これは、望ましくない副産物の生成を減少し、且つ比較的簡単な精製プロセスを用い、高い収率で高純度の生成物を得ることを可能にする。

20

【0361】

誘導体

【0362】

特定の実施態様において、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、所望のコンジュゲートとのコンジュゲートの基本として使用することができる。

【0363】

様々なコンジュゲートは、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体に連結されることが企図される(例えば、「コンジュゲートワクチン(Conjugate Vaccines)」、Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse及びR. E. Lewis, Jr.(編集)、Carger Press, New York, (1989)参照)。これらのコンジュゲートは、他の方法の中でも、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、複合体形成、会合、配合(blending)、又は付加により、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体に連結されてよい。

30

【0364】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、1以上のコンジュゲートに結合するために利用されるエピトープ結合部分の外側に特異部位を含むように、操作されてよい。例えば、そのような部位は、コンジュゲートへの共有的連結を促進するために、例えば、システイン残基又はヒスチジン残基などの1以上の反応性アミノ酸残基を含んでよい。

40

【0365】

特定の実施態様において、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、コンジュゲートへ、間接的に、又は例えば別のコンジュゲートを通じてもしくはリンカーを通じて間接に、連結されてよい。

【0366】

例えば、システインなどの反応性残基を有するポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、その中の反応基が、例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルスルフィドなどのチオール反応性物質、又は他のチオール反応性コンジュゲーションパートナーへ連結されてよい(Haugland、2003、Molecular Probes Handbook of

50

Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley、1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman、1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means、(1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G., Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。

【0367】

別の例に関して、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、ビオチンにコンジュゲートされ、次にアビジンにコンジュゲートされている第二のコンジュゲートへ間接的にコンジュゲートされる。更に別の例に関して、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、コンジュゲートへ更に連結するリンカーに連結されてよい。リンカーの例は、二官能性カップリング剤、例えば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(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCLなど)、活性エステル(ジスクシンイミジルスヘレート(suherate)など)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアナート(トルエン2, 6-ジイソシアナートなど)、及びhis-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど)がある。特に好ましいカップリング剤は、ジスルフィド連結を提供する、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(SPD P)(Carlssonら、Biochem. J. 173:723-737 (1978))、及びN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)である。

【0368】

このコンジュゲートは、検出可能なラベル、薬物動態修飾部分、精製部分、又は細胞傷害性部分であってよい。検出可能なラベルの例は、蛍光ラベル(例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリトリン、又はテキサスレッド)、酵素-基質ラベル(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ(luciferases)、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ又はβ-D-ガラクトシダーゼ)、放射性同位体(例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、及び ^{32}P 、他のランタノイド、ルミネセンスラベル)、発色団部分、ジゴキシゲニン、ビオチン/アビジン、検出のためのDNA分子又は金を含んでよい。特定の実施態様において、コンジュゲートは、抗体の半減期の延長を助けるPEGなどの、薬物動態修飾部分であることができる。他の好適なポリマーは、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマーなどを含む。特定の実施態様において、コンジュゲートは、磁気ビーズなどの、精製部分であることができる。「細胞傷害性部分」は、細胞に有害であるか、又は細胞を損傷もしくは死滅する任意の物質であることができる。細胞傷害性部分の例は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン及びそれらのアナログ、代謝拮抗薬(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)

シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)及びドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC))、並びに有糸分裂阻害薬(例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0369】

コンジュゲートを抗体、免疫グロブリン又はそれらの断片などのタンパク質へコンジュゲーションする方法は、例えば、米国特許第5,208,020号;第6,441,163号;WO2005037992;WO2005081711;及び、WO2006/034488に認めることができ、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている。

【0370】

医薬組成物

【0371】

本開示はまた、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体、及び医薬として許容し得る担体を含有する医薬組成物も提供する。

【0372】

用語「医薬として許容し得る」は、指定された担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤(複数)、及び／又は塩が、一般に製剤を構成するその他の成分と化学的及び／又は物理的に適合可能であり、且つレシピエントと生理学的に適合可能であることを指摘する。

【0373】

「医薬として許容し得る担体」は、許容し得る生体活性があり且つ対象に対し無毒である、活性成分以外の製剤処方中の成分を指す。本明細書において開示された医薬組成物中で使用するための医薬として許容し得る担体は、例えば、医薬として許容し得る液体、ゲル、又は固形担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張化剤、緩衝液、抗酸化剤、麻酔薬、懸濁化剤／分散剤、金属イオン封鎖剤又はキレート剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤、又は無毒の補助物質、当該技術分野において公知の他の成分、又はそれらの様々な組合せを含んでよい。

【0374】

好適な成分は、例えば、抗酸化剤、充填剤、結合剤、崩壊剤、緩衝剤、保存剤、滑沢剤、香味剤、増粘剤、着色剤、乳化剤、又は糖及びシクロデキストリンなどの安定剤を含んでよい。好適な抗酸化剤は、例えば、メチオニン、アスコルビン酸、EDTA、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオソルビトール、ブチル化されたヒドロキシアニソール、ブチル化されたヒドロキシトルエン、及び／又は没食子酸プロピルを含んでよい。本明細書に開示したように、本明細書に提供される医薬組成物中のメチオニンなどの1以上の抗酸化剤の包含は、ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体の酸化を減少する。この酸化の減少は、結合親和性の喪失を防止又は減少し、これによりタンパク質安定性を向上し、且つ半減期を最大化する。従って、特定の実施態様において、本明細書開示のポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体並びにメチオニンなどの1以上の抗酸化剤を含有する組成物が提供される。

【0375】

更なる例証のために、医薬として許容し得る担体は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張ブドウ糖注射液、滅菌水注射液、又はブドウ糖加乳酸リンゲル注射液などの水性ビヒクル、植物起源の不揮発性油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、又はピーナッツ油などの非水性ビヒクル、静菌又は静真菌濃度の抗菌剤、塩化ナトリウム又はブドウ糖などの等張化剤、リン酸塩又はクエン酸塩緩衝液などの緩衝液、硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、塩酸プロカインなどの局所麻酔薬、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、又はポリビニルピロリドンなどの懸濁化剤及び分散剤、ポリソルベート80(TWEEN-80)などの乳化剤、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)又はEGTA(エチレンジアミン四酢酸)などの金属イオン封

10

20

30

40

50

鎖剤又はキレート剤、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、又は乳酸を含んでよい。担体として利用される抗菌剤は、フェノール又はクレゾール、水銀、ベンジルアルコール、クロロブタノール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル及びプロピル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム及び塩化ベンゼトニウムを含む反復投与用容器内で、医薬組成物へ添加されてよい。好適な賦形剤は、例えば、水、食塩水、ブドウ糖、グリセロール、又はエタノールを含んでよい。好適な無毒の補助物質は、例えば、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解増強剤、又は酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミノオレアート、もしくはシクロデキストリンなどの物質を含んでよい。

【0376】

本医薬組成物は、溶液の液剤、懸濁剤、乳剤、丸剤、カプセル剤、錠剤、持続放出製剤、又は散剤であることができる。経口製剤は、医薬等級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準担体を含むことができる。

【0377】

特定の実施態様において、本医薬組成物は、注射用組成物へ製剤化される。注射用医薬組成物は、通常の形状、例えば、溶液の液剤、懸濁剤、乳剤など、あるいは溶液の液剤、懸濁剤又は乳剤を作製するのに適している固形状で調製されてよい。注射用の調製品は、そのまま注射できる無菌及び／又は非発熱性の溶液、皮下注射用錠剤を含む、使用直前に溶媒とそのまま一緒にされる凍結乾燥した散剤など無菌の乾燥可溶性製品、そのまま注射できる無菌の懸濁液、使用直前にビヒクルとそのまま一緒にされる無菌の乾燥不溶性製品、並びに無菌及び／又は非発熱性の乳剤を含んでよい。これらの溶液は、水性又は非水性のいずれかであってよい。

【0378】

特定の実施態様において、単位投与量の非経口調製品は、アンプル、バイアル又は有針注射器に包装される。非経口的投与のための全ての調製品は、当該技術分野において公知で実践されるように、無菌であり非発熱性でなければならない。

【0379】

特定の実施態様において、無菌の凍結乾燥した散剤が、好適な溶媒中に本明細書に開示されたポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体を溶解することにより、調製される。溶媒は、安定性を向上する賦形剤又は散剤もしくは散剤から調製された再構成溶液の他の薬理学的成分を含んでよい。使用される賦形剤は、水、ブドウ糖、ソルビタール、フルクトース、トウモロコシシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、シヨ糖又は他の好適な物質を含むが、これらに限定されるものではない。溶媒は、一実施態様において、ほぼ中性のpHの、クエン酸塩、リン酸ナトリウムもしくはカリウムなどの緩衝液、又は他の当業者に公知のそのような緩衝液を含んでよい。この溶液の後続の滅菌濾過、それに続く当業者に公知の標準条件下での凍結乾燥は、所望の製剤を提供する。一実施態様において、生じる溶液は、凍結乾燥のためのバイアルへ分配される。各バイアルは、本明細書に提供されるポリペプチド複合体、二重特異性ポリペプチド複合体又はそれらの組成物の単回用量又は反復用量を含むことができる。1回投与量又は投与量のセットに必要とされる量を少し上回って過充填しているバイアル（例えば約10%）は、正確な試料の採取及び正確な投薬を促進するために、許容される。凍結乾燥された散剤は、約4℃～室温など、適切な条件下で貯蔵することができる。

【0380】

凍結乾燥した散剤の注射用水による再構成は、非経口的投与に使用するための製剤を提供する。一実施態様において、再構成のために、無菌及び／又は非発熱性の水又は他の液体の好適な担体が、凍結乾燥された散剤へ添加される。正確な量は、行われる選択された療法によって決まり、経験的に決定することができる。

【0381】

治療方法

【0382】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体の治療的有効量を、それを必要とする対象へ投与し、これにより状態又は障害を治療又は予防することを含む、治療方法もまた提供される。特定の実施態様において、対象は、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体に恐らく反応する障害又は状態を有するとして確定されている。

【0383】

本明細書において使用される状態を「治療する」又は「治療」は、状態を予防又は緩和、状態の発生又は発達速度を遅延、状態の発達リスクを減少、状態に関連した症状の発達を予防又は遅延、状態に関連した症状を軽減又は終結、状態の完全な又は部分的な退行を発生、状態を治癒すること、又はそれらのいくつかの組合せを含む。

10

【0384】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体及び二重特異性ポリペプチド複合体の治療的有効量は、例えば、体重、年齢、病歴、現在の服薬、対象の健康状態、並びに交差一反応、アレルギー、過敏及び有害副作用の可能性、更には、投与経路及び疾患発達の程度など、当該技術分野において公知の様々な要因によって決まるであろう。用量は、これら及び他の状況又は必要要件により指摘されるように、当業者（例えば、医師又は獣医師）により、比例して増減されてよい。

【0385】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、約0.01mg/kg～約100mg/kg（例えば、約0.01mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kg、約80mg/kg、約85mg/kg、約90mg/kg、約95mg/kg、又は約100mg/kg）の治療的有効量で投与されてよい。特定のこれらの実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、約50mg/kg以下の用量で投与され、並びに特定のこれらの実施態様において、用量は、10mg/kg以下、5mg/kg以下、1mg/kg以下、0.5mg/kg以下、又は0.1mg/kg以下である。特定の実施態様において、投与量は、治療過程にわたり変化してよい。例えば、特定の実施態様において、初回投与量は、その後の投与量よりも多いことがある。特定の実施態様において、投与量は、対象の反応に応じて治療過程にわたり変動してよい。

20

30

【0386】

投薬計画は、最適な所望の反応（例えば治療的反応）を提供するように調節されてよい。例えば、単回投与量が投与されるか、又は数回の分割量が時間をかけて投与されてよい。

【0387】

本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、例えば、非経口経路（例えば、皮下、腹腔内、静脈内点滴を含む静脈内、筋肉内、又は皮内注射）又は非経口でない(non-parenteral)経路（例えば、経口、鼻腔内、眼球内、舌下、直腸内、又は局所）など、当該技術分野において公知の任意の経路で投与されてよい。

40

【0388】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体により治療される状態又は障害は、癌又は癌性状態、自己免疫疾患、感染症及び寄生虫症、心臓血管疾患、神経障害、神経精神医学的状态、外傷、炎症、又は凝固障害である。

【0389】

本明細書において使用される「癌」又は「癌性状態」は、新生物形成性又は悪性の細胞の成長、増殖、又は転移により媒介される任意の医学的状态を指し、固形癌及び白血病な

50

どの非固形癌の両方を含む。本明細書において使用される「腫瘍」は、新生物形成性及び／又は悪性の細胞の固形塊を指す。

【0390】

癌に関して、「治療する」又は「治療」は、新生物形成性又は悪性の細胞の成長、増殖、又は転移の阻害もしくは緩慢化、新生物形成性又は悪性の細胞の成長、増殖、又は転移の発達の予防又は遅延、又はいくつかのそれらの組合せを指す。腫瘍に関して、「治療する」又は「治療」は、全て又は一部の腫瘍を根絶、腫瘍の成長及び転移を阻害又は緩慢化、腫瘍の発達を予防又は遅延すること、又はそれらのいくつかの組合せを含む。

【0391】

例えば、癌を治療するための本明細書開示のポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体の使用に関して、治療的有効量は、全て又は一部の腫瘍を根絶、腫瘍の成長を阻害又は緩慢化、癌性状態を媒介する細胞の成長又は増殖を阻害、腫瘍細胞転移を阻害、腫瘍又は癌性の状態に関連した任意の症状又はマーカーを改善、腫瘍又は癌性状態の発達を予防又は延期すること、又はそれらのいくつかの組合せが可能であるポリペプチド複合体の用量又は濃度である。

【0392】

特定の実施態様において、状態及び障害は、腫瘍及び癌、例えば、非－小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、中皮腫、メラノーマ、頭頸部癌、甲状腺癌、肉腫、前立腺癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、胸腺癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、菌状息肉腫、メルケル細胞癌など、及び他の血液系悪性疾患、例えば古典的ホジキンリンパ腫（CHL）、原発性縦隔大細胞型B－細胞リンパ腫、T－細胞／組織球豊富型B－細胞リンパ腫、EBV－陽性及び－陰性PTLD、並びにEBV－関連びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、形質芽球性リンパ腫、節外性NK／T細胞リンパ腫、鼻咽頭癌、及びHHV8－関連原発性滲出性リンパ腫、ホジキンリンパ腫など、中枢神経系（CNS）の新生物形成、例えば原発性CNSリンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫などがある。

【0393】

特定の実施態様において、状態及び障害は、CD19－関連疾患又は状態、例えばB細胞リンパ腫、任意にホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫などがあり、ここで非ホジキンリンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫（MZL）、粘膜－関連リンパ組織リンパ腫（MALT）、小リンパ球性リンパ腫（慢性リンパ球性白血病、CLL）、又はマントル細胞リンパ腫（MCL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、又はヴァルデンストレームマクログロブリン血症（WM）などを含む。

【0394】

特定の実施態様において、状態及び障害は、CTLA－4及び／又はPD－1による免疫応答の調節を介して治療することができる、高増殖性状態又は感染症を含む。高増殖性状態の例は、固形癌、血液癌、軟組織腫瘍、及び転移性病巣を含むが、これらに限定されるものではない。

【0395】

本ポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、単独で、又は1以上の追加の治療的手段もしくは物質と組合せて投与されてよい。

【0396】

特定の実施態様において、癌又は腫瘍又は増殖性疾患の治療に使用される場合、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、化学療法、放射線治療、癌治療のための手術（例えば腫瘍切除）、化学療法から生じる合併症の治療のための1以上の制吐薬もしくは他の治療、又は癌もしくは関連した医学的障害の治療における使用のための任意の他の治療薬と組合せて、投与されてよい。本明細書において使用される「組合せて投与された」とは、同じ医薬組成物の一部として同時に、個別の組成物として同時に、又は個別の組成物として異なる時点で投与することを含む。別の物質の前

10

20

30

40

50

後に投与される組成物は、組成物及び第二の物質が異なる経路を介して投与されるとしても、その語句が本明細書において使用されるように物質と「組合せ」て投与されると考えられる。可能であるならば、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体と組合せて投与される追加の治療薬は、追加の治療薬の添付文書に列挙されたスケジュールに従い投与されるか、又は「医師用医薬品便覧」(Physicians' Desk Reference、第70版(2016))又は当該技術分野において周知のプロトコールに従い投与される。

【0397】

特定の実施態様において、本治療薬は、癌に対する免疫応答を誘導又はブーストすることができる。例えば、腫瘍ワクチンは、特定の腫瘍又は癌に対する免疫応答を誘導するために、使用することができる。サイトカイン療法もまた、免疫系に対する腫瘍抗原提示を増強するために使用することができる。サイトカイン療法の例は、インターフェロン α 、 β 及び γ などのインターフェロン、マクロファージ CSF 、顆粒球マクロファージ CSF 、及び顆粒球 CSF などのコロニー刺激因子、 IL-1 、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 IL-2 、 IL-3 、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 、 IL-7 、 IL-8 、 IL-9 、 IL-10 、 IL-11 、及び IL-12 などのインターロイキン、 $\text{TNF-}\alpha$ 及び $\text{TNF-}\beta$ などの腫瘍壊死因子を含むが、これらに限定されるものではない。免疫抑制性標的を失活する物質、例えば、 $\text{TGF-}\beta$ ベータインヒビター、 IL-10 インヒビター、及び Fas リガンドインヒビターなども、使用することができる。別の物質のグループは、腫瘍細胞又は癌細胞に対する免疫反応を活性化するもの、例えば、 T 細胞活性化を増強するもの（例えば、 CTLA-4 、 ICOS 及び OX-40 などの T 細胞共刺激分子のアゴニスト）、並びに樹状細胞機能及び抗原提示を増強するものを含む。

【0398】

キット

【0399】

本開示は更に、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体を含むキットを提供する。一部の実施態様において、キットは、生物学的試料中の1以上の関心対象の標的の存在もしくはレベルを検出、又はこれを捕獲もしくは濃縮するのに有用である。生物学的試料は、細胞又は組織を含むことができる。

【0400】

一部の実施態様において、キットは、検出可能な標識とコンジュゲートされた本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体を含む。特定の他の実施態様において、キットは、標識されない本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体を含み、並びに更に標識されない本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体へ結合することが可能である標識された二次抗体を含む。このキットは更に、使用説明書、及びキット中の各成分を分ける包装を含んでよい。

【0401】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるポリペプチド複合体又は二重特異性ポリペプチド複合体は、基板又は装置に会合されている。有用な基板又は装置は、例えば、磁気ビーズ、マイクロタイタープレート、又は試験片であることができる。それらは、結合アッセイ（ ELISA など）、イムノグラフアッセイ、生物学的試料中の標的分子の捕獲又は濃縮に有用であり得る。

【0402】

以下の実施例は、請求された発明をより良く例証するために提供され、本発明の範囲を限定するものとして解釈されてはならない。以下に説明する全ての具体的組成物、材料、及び方法は、全部又は一部において、本発明の範囲内に収まる。これらの具体的組成物、材料、及び方法は、本発明を限定することは意図しないが、単に本発明の範囲内に収まる具体的実施態様を例証する。当業者は、発明的能力の行使を伴わず及び本発明の精神から逸脱することなく、同等の組成物、材料、及び方法を開発してよい。本明細書記載の手順

において多くの変更を行うことができる一方で、依然本発明の境界内に保持されることは理解されるであろう。そのような変更は本発明の範囲内に含まれることは、本発明者らの意図である。

【0403】

【表13】

表11：カメラ定常領域（CBeta/Calpha）のデザイン及び名称

表16を基にした鋳型デザイン	配列番号： (重鎖(HC)/軽鎖(LC))-IgG1
Design_1	177/176
Design_2	179/178
Design_3	184/183
Design_4	185/183
Design_5	180/176
Design_6	181/178
Design_6a	182/178
Design_7	184/186
Design_8	185/186

【0404】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1 2：キメラ定常領域（C B e t a / C A l p h a）のドメイン及び配列番号

キメラ定常領域の 名称及び鎖配列番号：	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号			
	第一又は第二の 接続ドメイン(CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン +ヒンジ(CJ')	二量体形成ド メイン(D)
Design_1 HC	HCJ1	Cbeta(S58C)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：177	配列番号：49	配列番号：33	配列番号：53	配列番号：302
Design_1 LC	LCJ1	CAIpha(T49C)		
配列番号：176	配列番号：51	配列番号：43		
Design_2 HC	HCJ2	Cbeta(S58C)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：179	配列番号：50	配列番号：33	配列番号：53	配列番号：302
Design_2 LC	LCJ2	CAIpha(T49C)		
配列番号：178	配列番号：52	配列番号：43		
Design_3 HC	HCJ3	CAIpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号：184	配列番号：129	配列番号：43	配列番号：134	配列番号：302
Design_3 LC	LCJ3	Cbeta(S58C)		
配列番号：183	配列番号：308	配列番号：33 + NO:308		
Design_4 HC	HCJ4	CAIpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号：185	配列番号：130	配列番号：43	配列番号：134	配列番号：302
Design_4 LC	LCJ3	Cbeta(S58C)		
配列番号：183	配列番号：308	配列番号：33 + NO:308		
Design_5 HC	HCJ1	Cbeta(S58C) (FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：180	配列番号：49	配列番号：37	配列番号：53	配列番号：302
Design_5 LC	LCJ1	CAIpha(T49C)		
配列番号：176	配列番号：51	配列番号：43		
Design_6 HC	HCJ1	Cbeta(S58C) (FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：181	配列番号：50	配列番号：37	配列番号：53	配列番号：302
Design_6 LC	LCJ2	CAIpha(T49C)		
配列番号：178	配列番号：52	配列番号：43		
Design_6a HC	HCJ2	Cbeta(S58C) (DE-FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：182	配列番号：50	配列番号：41	配列番号：53	配列番号：302
Design_6a LC	LCJ2	CAIpha(T49C)		
配列番号：178	配列番号：52	配列番号：43		
Design_7 HC	HCJ3	CAIpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号：184	配列番号：129	配列番号：43	配列番号：134	配列番号：302
Design_7 LC	LCJ3	Cbeta(S58C) (FG-)		
配列番号：186	配列番号：308	配列番号：37 + NO:308		
Design_8 HC	HCJ4	CAIpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号：185	配列番号：130	配列番号：43	配列番号：134	配列番号：302
Design_8 LC	LCJ3	Cbeta(S58C) (FG-)		
配列番号：186	配列番号：308	配列番号：37 + NO:308		

【0 4 0 5】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 13：グリコシル化部位を持たないDesign_2 (CBeta/CAIpha) のデザイン及び名称

試料	配列番号：(HC-CBeta/LC-CAIpha) HC/LC
Design_2-QQQQ	188/187 (IgG1) 196/187 (IgG4)
Design_2-AAAA	190/189 (IgG1)
Design_2-QSKE	192/191 (IgG1)
Design_2-ASKE	192/193 (IgG1)
Design_2-QQQQQ	195/194 (IgG1)

10

【0406】

【表 16】

表 14：グリコシル化部位を持たないDesign_2 (CBeta/CAIpha) のドメイン及び配列番号

複合体名及び 鎖配列番号：	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号			
	第一又は第二の 接続ドメイン(CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン +ヒンジ(CJ')	二量体形成ド メイン(D)
Design_2-QQQQ (IgG1) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：188	配列番号：50	配列番号：34	配列番号：53	配列番号：302
Design_2-QQQQ (IgG1) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68 Q+ N79Q)		
配列番号：187	配列番号：52	配列番号：44		
Design_2-QQQQ (IgG4) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G4	FcG4
配列番号：196	配列番号：50	配列番号：34	配列番号：54	配列番号：303
Design_2-QQQQ (IgG4) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68 Q+ N79Q)		
配列番号：187	配列番号：52	配列番号：44		
Design_2-AAAA (IgG1) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69A)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：190	配列番号：50	配列番号：35	配列番号：53	配列番号：302
Design_2-AAAA (IgG1) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34A+N68 A+ N79A)		
配列番号：189	配列番号：52	配列番号：45		
Design_2-QSKE (IgG1) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：192	配列番号：50	配列番号：36	配列番号：53	配列番号：302
Design_2-QSKE (IgG1) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68 S+ N79K)		
配列番号：191	配列番号：52	配列番号：46		
Design_2-ASKE (IgG1) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：192	配列番号：50	配列番号：36	配列番号：53	配列番号：302
Design_2-ASKE (IgG1) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34A+N68 S+ N79K)		
配列番号：191	配列番号：52	配列番号：47		
Design_2-QQQQQ (IgG1) HC	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号：195	配列番号：50	配列番号：34	配列番号：53	配列番号：302
Design_2-QQQQQ (IgG1) LC	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68 Q+ N79Q+N61Q)		
配列番号：194	配列番号：52	配列番号：48		

20

30

40

50

【 0 4 0 7 】

【表 1 7】

表 1 5 : キメラ定常領域 (C B e t a / C p r e - A l p h a) のデザイン及び名称

表16を基にした 鋳型(IgG1)	配列ファイル	配列番号：
PreTCR_Design_B	Design_1_Pre_TCR_Conjunction' 1	198/197
	Design_2_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys10	200/199
	Design_3_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys11	202/201
	Design_4_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys12	203/201
	Design_5_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys13	203/204
	Design_6_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys14	205/204
	Design_7_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys15	206/204
	Design_8_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys1_4L4T_1	208/207
	Design_9_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys2_4L4T_2	208/209
	Design_10_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys4	211/210
PreTCR_Design_C	PreTCR_Design_5_crossed_1	213/212
	PreTCR_Design_6_crossed_1	213/215
PreTCR_Design_D	PreTCR_Design_5_crossed_2	214/212
	PreTCR_Design_6_crossed_2	214/215

【 0 4 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 18-1】

表 16: キメラ定常領域 (C B e t a / C p r e - A l p h a) のドメイン及び配列番号

複合体名称及び鎖配列番号:	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号 第一又は第二の 接続ドメイン (CJ)	TCR定常ドメイン(C1又はC2)	第三の接続 ドメイン+ ヒンジ(CJ')	二量体形成 ドメイン(D)
Design_1_Pre_TCR_Conjunction' 1 HC	HCJB	CBeta(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:198	配列番号:50	配列番号:84	配列番号:53	配列番号:302
Design_1_Pre_TCR_Conjunction' 1 LC	LCJB	CPreAlpha(N50Q)		
配列番号:197	配列番号:309	配列番号:83		
Design_2_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys10 HC	HCJB	Cbeta(S78C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:200	配列番号:50	配列番号:319	配列番号:53	配列番号:302
Design_2_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys10 LC	LCJB	CPreAlpha (Y59C)(N50Q)		
配列番号:199	配列番号:309	配列番号:311		
Design_3_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys11 HC	HCJB	Cbeta(F13C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:202	配列番号:50	配列番号:320	配列番号:53	配列番号:302
Design_3_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys11 LC	LCJB	CPreAlpha (A13C)(N50Q)		
配列番号:201	配列番号:309	配列番号:312		
Design_4_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys12 HC	HCJB	Cbeta(S16C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:203	配列番号:50	配列番号:321	配列番号:53	配列番号:302
Design_4_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys12 LC	LCJB	CPreAlpha (A13C)(N50Q)		
配列番号:201	配列番号:309	配列番号:312		
Design_5_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys13 HC	HCJB	Cbeta(S16C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:203	配列番号:50	配列番号:321	配列番号:53	配列番号:302
Design_5_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys13 LC	LCJB	CPreAlpha (S11C)(N50Q)		
配列番号:204	配列番号:309	配列番号:313		
Design_6_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys14 HC	HCJB	Cbeta(A18C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:205	配列番号:50	配列番号:322	配列番号:53	配列番号:302
Design_6_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys14 LC	LCJB	CPreAlpha (S11C)(N50Q)		
配列番号:204	配列番号:309	配列番号:313		
Design_7_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys15 HC	HCJB	Cbeta(E19C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:206	配列番号:50	配列番号:323	配列番号:53	配列番号:302
Design_7_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys15 LC	LCJB	CPreAlpha (S11C)(N50Q)		
配列番号:204	配列番号:309	配列番号:313		
Design_8_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys1_4L4T_1 HC	HCJB	Cbeta(S56C)(N89Q)	CJ'1GI	FcGI
配列番号:208	配列番号:50	配列番号:34	配列番号:53	配列番号:302
Design_8_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys1_4L4T_1 LC	LCJB	CPreAlpha (S62C)(N50Q)		
配列番号:207	配列番号:309	配列番号:314		

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

Design_9_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys2_4L4T_2 HC	HCJB	Cbeta(S58C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 207	配列番号:50	配列番号:34	配列番号:53	配列番号:302
Design_9_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys2_4L4T_2 LC	LCJB	CPreAlpha (T85C)(N50Q)		
配列番号: 209	配列番号:309	配列番号:315		
Design_10_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys4 HC	HCJB	Cbeta(A11C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 211	配列番号:50	配列番号:324	配列番号:53	配列番号:302
Design_10_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys4 LC	LCJB	CPreAlpha (I18C)(N50Q)		
配列番号: 210	配列番号:309	配列番号:316		
PreTCR_Design_5_crossed_1 HC				
配列番号: 213	HCJC	CPreAlpha (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FcG1
PreTCR_Design_5_crossed_1 LC	配列番号:132	配列番号:313	配列番号:134	配列番号:302
配列番号: 212	LCJC	Cbeta (N69Q, S18C)		
PreTCR_Design_6_crossed_1 HC	配列番号:50	配列番号:321+ 306		
配列番号: 213				
PreTCR_Design_6_crossed_1 LC	HCJC	CPreAlpha (S11C)(N50Q)	CJ'2G4	FcG4
配列番号:215	配列番号:132	配列番号:313	配列番号:134	配列番号:303
PreTCR_Design_5_crossed_2 HC	LCJC	Cbeta(N69Q, A18C)		
配列番号: 214	配列番号:50	配列番号:322+ 306		
PreTCR_Design_5_crossed_2 LC				
配列番号: 212	HCJD	CPreAlpha (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FcG1
PreTCR_Design_6_crossed_2 HC	配列番号:133	配列番号:313	配列番号:134	配列番号:302
配列番号: 214	LCJC	Cbeta (N69Q, S18C)		
PreTCR_Design_6_crossed_2 LC	配列番号:50	配列番号: NO:321+ 306		
配列番号: 215	HCJD	CPreAlpha (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FcG1

【0409】

【表 19】

表 17: キメラ定常領域 (C Gamma / C Delta) のデザイン及び名称

表13を基にした鋳型(IgG1)	デザインの構築体	HC/LCの配列番号
dg_Design_1	dg_Design_1	234/233
dg_Design_2	dg_Design_2	232/231
	dg_Design_2_no_Glyco	216/215
	dg_Design_2_hypeCys1_no_Glyco	218/217
	dg_Design_2_hypeCys2_no_Glyco	220/219
	dg_Design_2_hypeCys3_no_Glyco	222/221
	dg_Design_2_Cys2_no_Glyco	224/223
	dg_Design_2_Cys1_no_Glyco	226/225
	dg_Design_2_Cys3_no_Glyco	227/223
	dg_Design_2_Cys4_no_Glyco	229/228
	dg_Design_2_Cys5_no_Glyco	229/230
dg_Design_3	dg_crossed_Design_1	236/235
dg_Design_4	dg_crossed_Deisng_2	238/237

10

20

30

40

50

【 0 4 1 0 】

【 表 2 0 - 1 】

表 1 8 : キメラ定常領域 (C G a m m a / C D e l t a) のドメイン及び配列番号

複合体名及び鎖配列番号 :	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号			
	第一又は第二の 接続ドメイン (CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続 ドメイン+ ヒンジ(CJ')	二量体形成 ドメイン(D)
dg_Design_1_HC	HCJ4	CGamma	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 234	配列番号:117	配列番号:113	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_1_LC	LCJ4	CDelta		
配列番号 : 233	配列番号:119	配列番号:310		
dg_Design_2_HC	HCJ5	CGamma	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 232	配列番号:118	配列番号:113	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_LC	LCJ5	CDelta		
配列番号 : 231	配列番号:120	配列番号:115		
dg_Design_2_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号:216	配列番号:118	配列番号:114	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta(N16Q+N79Q)		
配列番号 : 215	配列番号:120	配列番号:116		
dg_Design_2_hypeCys1_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma(T12C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 218	配列番号:118	配列番号:333	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_hypeCys1_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta (N16C) (N79Q)		
配列番号:217	配列番号:120	配列番号:325		
dg_Design_2_hypeCys2_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma (Q57C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 220	配列番号:118	配列番号:334	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_hypeCys2_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta (V50C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 219	配列番号:120	配列番号:326		
dg_Design_2_hypeCys3_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma (M62C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号:222	配列番号:118	配列番号:335	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_hypeCys3_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta (D46C) (N16Q + N79Q)		
配列番号:221	配列番号:120	配列番号:327		
dg_Design_2_Cys2_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma(S17C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号:224	配列番号:118	配列番号:336	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_Cys2_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta (F12C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 223	配列番号:120	配列番号:328		
dg_Design_2_Cys1_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma(F14C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号:226	配列番号:118	配列番号:337	配列番号:121	配列番号:302
dg_Design_2_Cys1_no_Glyco_LC	LCJ5	CDelta(M14C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 225	配列番号:120	配列番号:329		
dg_Design_2_Cys3_no_Glyco_HC	HCJ5	CGamma (E20C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 227	配列番号:118	配列番号:338	配列番号:121	配列番号:302

10

20

30

40

【表 2 0 - 2】

dg_Design_2_Cys3_no_Gl yco LC	LCJ5	CDelta (F12C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 223	配列番号 : 120	配列番号 : 328		
dg_Design_2_Cys4_no_Gl yco HC	HCJ5	CGamma (A18C) (N85Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 229	配列番号 : 118	配列番号 : 339	配列番号 : 121	配列番号 : 302
dg_Design_2_Cys4_no_Gl yco LC	LCJ5	CDelta(F87C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 228	配列番号 : 120	配列番号 : 330		
dg_Design_2_Cys5_no_Gl yco HC	HCJ5	CGamma (A18C) (N85Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号 : 229	配列番号 : 118	配列番号 : 339	配列番号 : 121	配列番号 : 302
dg_Design_2_Cys5_no_Gl yco LC	LCJ5	CDelta (E88C) (N16Q + N79Q)		
配列番号 : 230	配列番号 : 120	配列番号 : 331		
dg_crossed_Design_1 HC	HCJ6	CDelta	CJ'4G1	FcG1
配列番号 : 236	配列番号 : 123	配列番号 : 332	配列番号 : 127	配列番号 : 302
dg_crossed_Design_1 LC	LCJ6	CGamma		
配列番号 : 235	配列番号 : 125	配列番号 : 340		
dg_crossed_Design_2 HC	HCJ7	CDelta	CJ'4G1	FcG1
配列番号 : 238	配列番号 : 124	配列番号 : 332	配列番号 : 127	配列番号 : 302
dg_crossed_Design_2 LC	LCJ7	CGamma		
配列番号 : 237	配列番号 : 126	配列番号 : 340		

【 0 4 1 1】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 1】

表 1 9 : 例証的キメラ定常領域の配列

鋳型デザイン	鋳型	配列番号		配列
CAIpha/CBeta	LC	176	LCJ1 - CAIpha (T49C)	KRTVAAPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNISAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDITFFPSPESS
Design_1 (IgG1) 正常	HC	177	HCJ1 - CBeta (S56C) - C _J ' 1G1 - Fc (G1)	SSASKNVFPPEVAFEPSEAEISHTGKATLVCLATGFPDHYVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALND5R YALSSRLRVSA TFQWNRNHFRCQVQFYGLSENDEMTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPQAPAEAAAGG PSVFLFPKPKDGLMISRTPEVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	178	LCJ2 - CAIpha (T49C)	KPDIQNPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNISAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDITFFPSPESS
Design_2 (IgG1) 正常	HC	179	HCJ2 - CBeta (S56C) - C _J ' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAFEPSEAEISHTGKATLVCLATGFPDHYVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALND5R YALSSRLRVSA TFQWNRNHFRCQVQFYGLSENDEMTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPQAPAEAAAGG PSVFLFPKPKDGLMISRTPEVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_5 (IgG1) 正常	LC	176	LCJ1 - CAIpha (T49C)	KRTVAAPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNISAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDITFFPSPESS
	HC	180	HCJ1 - CBeta (S56C) (FG-DE+) - C _J ' 1G1 - Fc (G1)	SSASKNVFPPEVAFEPSEAEISHTGKATLVCLATGFPDHYVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALND5R YALSSRLRVSA TFQWNRNHFRCQVQFYPSNQIVSAEAWGRASDKTHTCPPQAPAEAAAGPSVFLFPKPKDGL MISRTPEVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_6 (IgG1) 正常	LC	178	LCJ2 - CAIpha (T49C)	KPDIQNPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNISAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDITFFPSPESS
	HC	181	HCJ2 - CBeta (S56C) (FG-DE+) - C _J ' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAFEPSEAEISHTGKATLVCLATGFPDHYVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALND5R YALSSRLRVSA TFQWNRNHFRCQVQFYPSNQIVSAEAWGRASDKTHTCPPQAPAEAAAGPSVFLFPKPKDGL MISRTPEVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_6a (IgG1)	LC	178	LCJ2 - CAIpha (T49C)	KPDIQNPDPAYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQSDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNISAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDITFFPSPESS

10

20

30

40

【表 2 1 - 2】

正常	HC	182	HCJ2- CBeta (S5 6C) (FG-DE+) -C J' 1G1-Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS SRLRVSATFWQNRNHFRCQVQFYPSNQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAGGSPVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCWVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKYSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Desi gn_3 (I gG1) 交差	LC	183	LCJ3- CBeta (S5 6C)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS RYALSSRLRVSATFWQNRNHFRCQVQFYGLSENDEWTDQRAKPYTQIVSAEAWGRA
Desi gn_4 (I gG1) 交差	HC	184	HCJ2- CBeta (S5 6C) (FG-DE-) -C J' 1G1-Fc (G1)	SSASIONPDPVAYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSQVYITDKCYLDMRSMDFKSNSAVAVWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSDKTHTCPPCPAPEAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	183	LCJ4- CBeta (S5 6C)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS RYALSSRLRVSATFWQNRNHFRCQVQFYGLSENDEWTDQRAKPYTQIVSAEAWGRA
Desi gn_7 (I gG1) 交差	HC	185	HCJ4- CAI pha (T4 9C)-CJ' 2G1- F c (G1)	SSPDIONPDPVAYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSQVYITDKCYLDMRSMDFKSNSAVAVWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSDKTHTCPPCPAPEAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	186	LCJ3- CBeta (S5 6C) (FG-DE+)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS RYALSSRLRVSATFWQNRNHFRCQVQFYPSNQIVSAEAWGRA
Desi gn_8 (I gG1) 交差	HC	184	HCJ3- CAI pha (T4 9C)-CJ' 2G1- F c (G1)	SSASIONPDPVAYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSQVYITDKCYLDMRSMDFKSNSAVAVWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSDKTHTCPPCPAPEAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	186	LCJ4- CBeta (S5 6C) (FG-DE+)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS RYALSSRLRVSATFWQNRNHFRCQVQFYPSNQIVSAEAWGRA
Desi gn_2-000Q (I gG1)	LC	187	LCJ2- CAI pha (T 49C) (N34Q+N68 Q+ N78Q)	SSPDIONPDPVAYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSQVYITDKCYLDMRSMDFKSNSAVAVWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSDKTHTCPPCPAPEAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNKGEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

Des i gn _2 - AAAA (I gG1)	HC	188	HCJ2 - CBeta (S5 6C) (N69Q) - C J' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEYAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPYDPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAIFWQPNRNHRCQWQFYGLSENDEWTQDRAKPVQIIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDITLMSRTPVTCWVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTOKLSLSLSPGK
	LC	189	LCJ2 - CAIpha (T 49C) (N34A+N68 A+ N79A)	KPDIQNPDPAPVYOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSSAKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
Des i gn _2 - OSKE (I gG1)	HC	190	HCJ2 - CBeta (S5 6C) (N69A) - C J' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEYAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPYDPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAIFWQPNRNHRCQWQFYGLSENDEWTQDRAKPVQIIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDITLMSRTPVTCWVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTOKLSLSLSPGK
	LC	191	LCJ2 - CAIpha (T 49C) (N34Q+N6 8S+ N79K)	KPDIQNPDPAPVYOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSSAKSDFA CANAFKNSIIPEDTFFPSPESS
Des i gn _2 - ASKE (I gG1)	HC	192	HCJ2 - CBeta (S5 6C) (N69E) - C J' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEYAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPYDPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAIFWQPNRNHRCQWQFYGLSENDEWTQDRAKPVQIIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDITLMSRTPVTCWVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTOKLSLSLSPGK
	LC	193	LCJ2 - CAIpha (T 49C) (N34A+N 68S+ N79K)	KPDIQNPDPAPVYOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSSAKSDFA CANAFKNSIIPEDTFFPSPESS
Des i gn _2 - QQQQ (I gG1)	HC	192	HCJ2 - CBeta (S5 6C) (N69E) - C J' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEYAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPYDPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAIFWQPNRNHRCQWQFYGLSENDEWTQDRAKPVQIIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDITLMSRTPVTCWVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTOKLSLSLSPGK
	LC	194	LCJ2 - CAIpha (T 49C) (N34Q+N68 Q+ N79Q+ N61Q)	KPDIQNPDPAPVYOLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSSAKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
Des i gn _2 - QQQQQ (I gG1)	HC	195	HCJ2 - CBeta (S5 6C) (N69Q) - C J' 1G1 - Fc (G1)	LEDLKNVFPPEYAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPYDPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAIFWQPNRNHRCQWQFYGLSENDEWTQDRAKPVQIIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDITLMSRTPVTCWVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKYSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTOKLSLSLSPGK

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

Design_2-0000 (Isg4)	LC	187		HCJ2- CBeta (S56C) (N69Q)-C J* 1G4- Fc (G4)	KPDIQNPDPAYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSGTQWSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNVAWWSQKSDFA CANAFQNSIIPEDITFFSPRESS
ブレアルファ-ベータデザイン	顔名称	配列番号			LEDLKNVFPPEVAVPEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYDHYVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAFTWONPRNHFRQVQFYGLSENDEMTQDRAKPVTOIVSAEAWGRYPGPPCPAPEFLGGPSYFLPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSDGQDEPEVGFNNVYDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRVQGQGNVFCSSYMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_1_Pre_TOR_Conjunction' 1	LC	197		LCJB-CPreAlpha (N50Q)	KPTGYGGTTPPSLAPPIMLLYDQGQOMVYVCLVLDVAPPGLDSPINWFSAGGGSALDAFTYGPSPA TDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEHGRSTQPMHLSGEASTART
	HC	198		HCJB-CBeta (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVPEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYDHYVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAFTWONPRNHFRQVQFYGLSENDEMTQDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRVQGQGNVFCSSYMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_2_Pre_TOR_Conjunction' 1_Cys10	LC	199		LCJB-CPreAlpha (Y59C) (N50Q)	KPTGYGGTTPPSLAPPIMLLYDQGQOMVYVCLVLDVAPPGLDSPINWFSAGGGSALDAFTYGPSPA TDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEHGRSTQPMHLSGEASTART
	HC	200		HCJB-CBeta (S76C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVPEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYDHYVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALCSRLRVSAFTWONPRNHFRQVQFYGLSENDEMTQDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRVQGQGNVFCSSYMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_3_Pre_TOR_Conjunction' 1_Cys11	LC	201		VL (CD3)-LCJB-C PreAlpha (A13C) (N50Q)	KPTGYGGTTPPSLAPPIMLLYDQGQOMVYVCLVLDVAPPGLDSPINWFSAGGGSALDAFTYGPSPA TDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEHGRSTQPMHLSGEASTART
	HC	202		HCJB-CBeta (F13C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVPEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPYDHYVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAFTWONPRNHFRQVQFYGLSENDEMTQDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRVQGQGNVFCSSYMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_4_Pre_TOR_Conjunction' 1_Cys12	LC	201		VL (CD3)-LCJB-C PreAlpha (A13C) (N50Q)	KPTGYGGTTPPSLAPPIMLLYDQGQOMVYVCLVLDVAPPGLDSPINWFSAGGGSALDAFTYGPSPA TDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEHGRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 5】

	HC	203	HCJB- α (S16) C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTOKATLVCLATGFPDHYVLSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAFTWONPRNHERCQVGYLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGYEVHNAKTTPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYCKYKSNKALPAPIEKTISKAGGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTKLSLSLSPGK
Design_5_Pre_TOR _Conjunction' 1_ Cys13	LC	204	VL (C03)-LCJB-C PreAlpha (S11) C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPTIMLLVDGKQMVVCLVLDVAPPLDSPAIFWFAAGGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLA HLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	203	HCJB- α (S16) C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTOKATLVCLATGFPDHYVLSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAFTWONPRNHERCQVGYLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGYEVHNAKTTPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYCKYKSNKALPAPIEKTISKAGGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTKLSLSLSPGK
Design_6_Pre_TOR _Conjunction' 1_ Cys14	LC	204	VL (C03)-LCJB-C PreAlpha (S11) C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPTIMLLVDGKQMVVCLVLDVAPPLDSPAIFWFAAGGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLA HLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	205	HCJB- α (A18) C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSECEISHTOKATLVCLATGFPDHYVLSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAFTWONPRNHERCQVGYLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGYEVHNAKTTPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYCKYKSNKALPAPIEKTISKAGGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTKLSLSLSPGK
Design_7_Pre_TOR _Conjunction' 1_ Cys15	LC	204	VL (C03)-LCJB-C PreAlpha (S11) C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPTIMLLVDGKQMVVCLVLDVAPPLDSPAIFWFAAGGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLA HLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	206	HCJB- α (E19) C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPDHYVLSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAFTWONPRNHERCQVGYLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGYEVHNAKTTPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYCKYKSNKALPAPIEKTISKAGGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTKLSLSLSPGK
Design_8_Pre_TOR _Conjunction' 1_ Cys1_4L4T_1	LC	207	VL (C03)-LCJB-C PreAlpha (S82) C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPTIMLLVDGKQMVVCLVLDVAPPLDSPAIFWFAAGGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLA HLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	208	HCJB- α (S56) C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFPDHYVLSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALQDSR YALSSRLRVSAFTWONPRNHERCQVGYLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPKPKDLMISRTPVTCYVVDVSHEDPEVKFNWYVDGYEVHNAKTTPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQ DWLNGKEYCKYKSNKALPAPIEKTISKAGGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSYMHAEALHNHYTKLSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 6】

Design_9_Pre_TCR_Conjunction' 1_Cys2_4LAT_2	LC	209	VL (CD3)-LCJB-C PreAlpha (165 C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGQOMVVVCLVDVAPPGLDSPWFSAGGGSALDAFTYGPSPACDGTWTLAHLSPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	208	HCJB-CBeta (S56 C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVAFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWVNGKEYHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQPNRHFRQVQFVGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRASDKHTCPPOPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Design_10_Pre_TCR_Conjunction' 1_Cys4	LC	210	VL (CD3)-LCJB-C PreAlpha (116 C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPCMILLVDGQOMVVVCLVDVAPPGLDSPWFSAGGGSALDAFTYGPSPATDGTWTLAHLSPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	211	HCJB-CBeta (A11 C) (N89Q)-CJ' 1G1- Fc (G1)	LEDLKNVFPPEVCFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWVNGKEYHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQPNRHFRQVQFVGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRASDKHTCPPOPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PreTCR_Design5_crossed_1	Light	212	VL (CD3)-HCJB-CBeta (N69Q, S160)-CJ' 1G	KLEDLKNVFPPEVAFEPCEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWVNGKEYHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQPNRHFRQVQFVGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRA
	Heavy (C onjunction on more antibody)	213	HCJC-CPreAlpha (S11C, N50Q)-CJ' 2G1- Fc	SSASGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGQOMVVVCLVDVAPPGLDSPWFSAGGGSALDAFTYGPSPATDGTWTLAHLSPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTARISDKHTCPPOPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PreTCR_Design_5_crossed_2	Light	212	VL (CD3)-HCJB-CBeta (N69Q, S160)-CJ' 1G	KLEDLKNVFPPEVAFEPCEAEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWVNGKEYHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQPNRHFRQVQFVGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRA
	Heavy (C onjunction on more PreTCR)	214	HCJD-CPreAlpha (S11)-CJ' 2G1- Fc	SSPTGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGQOMVVVCLVDVAPPGLDSPWFSAGGGSALDAFTYGPSPATDGTWTLAHLSPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTARISDKHTCPPOPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PreTCR_Design_6_crossed_1	Light	215	VL (CD3)-LCJC-CBeta (A18C, N69Q)	KLEDLKNVFPPEVAFEPSECEISHTQKATLVCLATGFPDHYVLSWVNGKEYHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQPNRHFRQVQFVGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRA

10

20

30

40

【表 2 1 - 7】

	Heavy (C onjunction more 抗体)	213			
PreTCR_Design_6_ crossed_2	Light	215			KLEDKNVFPEVAVFEPSECEISHTKATLVCLATGYPDHVELSWYNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDS RYALSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVGFGLSENDEWTQDR AKPYT QIYSAEAWGRA
	Heavy (C onjunction more TCR)	214			
デルタ-ガンマデザイン	鎖名称	配列 番号			配列
dg_Design_2_no_G lyco	LC	215	WL (C03)-LCJ5-C Delta (N160+N7 90)		EPRSQPHTKPSVFVMKQGTNVACLKVEFPKDIRINLVSSKKITTEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTWHSDFE
	HC	216	HCJ5-CGamma-C J' 3G1- Fc (G1) (N650)		TDKQLDADVSPKPTIFLPISIAETKLOKAGTVLCLLEKFFPDVVIKHWEKKSNITILGSEQNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENKNGVDOEIIFFPPIKSDKHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQSLTOLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFF LYSKLTIYDKSRWQQGNVFSQSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK
dg_Design_2_hype Cys1_no_Glyco	LC	217	WL (C03)-LCJ5-C Delta (N160) (N790)		EPRSQPHTKPSVFVMKQGTNVACLKVEFPKDIRINLVSSKKITTEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTWHSDFE
	HC	218	HCJ5-CGamma (T 12C) (N650)-C J' 3G1- Fc (G1)		TDKQLDADVSPKPCIFLPISIAETKLOKAGTVLCLLEKFFPDVVIKHWEKKSNITILGSEQNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENKNGVDOEIIFFPPIKSDKHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQSLTOLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFF LYSKLTIYDKSRWQQGNVFSQSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK
dg_Design_2_hype Cys2_no_Glyco	LC	219	WL (C03)-LCJ5-C Delta (V50C) (N160 + N790)		EPRSQPHTKPSVFVMKQGTNVACLKVEFPKDIRINLVSSKKITTEFDPAICISPSGKYNAYKLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTWHSDFE
	HC	220	HCJ5-CGamma (Q 57C) (N650)-C J' 3G1- Fc (G1)		TDKQLDADVSPKPTIFLPISIAETKLOKAGTVLCLLEKFFPDVVIKHWEKKSNITILGSEQNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENKNGVDOEIIFFPPIKSDKHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQSLTOLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSFF LYSKLTIYDKSRWQQGNVFSQSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 8】

dg_Design_2_hype Cys3_no_Glyco	LC	221	WL(CD3)-LCJ5-C Delta (D48C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFVMKOGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAV KLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTVHSTDFE
	HC	222	HCJ5-Cgamma (M 62C) (N65Q)-C J' 3G1- Fc(G1)	TDKOLDADVSPKPTIFLP SI AETKLOKAGTYLLEKFFPDV I KHWQEKSN TILGSQEGNTMK TQDTYMKFS WLTVPESL DKEHRC I VRHNNKNGVDQET I FPIKSDKTH TCPPAPEAAGG P SVFLFPKPKD TLMISRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	223	WL(CD3)-LCJ5-C Delta (F12C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFVMKOGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAV KLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTVHSTDFE
dg_Design_2_Cys2 _no_Glyco	HC	224	HCJ5-Cgamma (S 17C) (N65Q)-C J' 3G1- Fc(G1)	TDKOLDADVSPKPTIFLP SI AETKLOKAGTYLLEKFFPDV I KHWQEKSN TILGSQEGNTMK TQDTYMKFS WLTVPESL DKEHRC I VRHNNKNGVDQET I FPIKSDKTH TCPPAPEAAGG P SVFLFPKPKD TLMISRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	225	WL(CD3)-LCJ5-C Delta (M14C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFVMKOGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAV KLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTVHSTDFE
	HC	226	HCJ5-Cgamma (F 14C) (N65Q)-C J' 3G1- Fc(G1)	TDKOLDADVSPKPTIFLP SI AETKLOKAGTYLLEKFFPDV I KHWQEKSN TILGSQEGNTMK TQDTYMKFS WLTVPESL DKEHRC I VRHNNKNGVDQET I FPIKSDKTH TCPPAPEAAGG P SVFLFPKPKD TLMISRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
dg_Design_2_Cys3 _no_Glyco	LC	223	WL(CD3)-LCJ5-C Delta (F12C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFVMKOGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAV KLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTVHSTDFE
	HC	227	HCJ5-Cgamma (E 20C) (N65Q)-C J' 3G1- Fc(G1)	TDKOLDADVSPKPTIFLP SI AETKLOKAGTYLLEKFFPDV I KHWQEKSN TILGSQEGNTMK TQDTYMKFS WLTVPESL DKEHRC I VRHNNKNGVDQET I FPIKSDKTH TCPPAPEAAGG P SVFLFPKPKD TLMISRTP EVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	228	WL(CD3)-LCJ5-C Delta (F87C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFVMKOGTNVACLKVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAV KLGKYE DSN SVTC SVQHDQKTVHSTDFE

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 9】

dg_Design_2_Cys5 _no_Glyco	HC	229	HCJ5-C δ Gamma (A 19C) (N85Q)-C J' 3G1- Fc (G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKSDKHTTOPCPAPEAAGPSVFLFPPPKDITLWISRTIP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAP IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTYDKSRWQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	230	WL (C03)-LCJ5-C Delta (E88C) (N16Q + N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYFKDTRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKGKYEDSNSVTC SVQHDKITVHSDFE
dg_Design_2	HC	229	HCJ5-C δ Gamma (A 19C) (N85Q)-C J' 3G1- Fc (G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKSDKHTTOPCPAPEAAGPSVFLFPPPKDITLWISRTIP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAP IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTYDKSRWQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	231	WL (C03)-LCJ5-C Delta	EPRSQPHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYFKDTRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKGKYEDSNSVTC SVQHDKITVHSDFE
dg_Design_1	HC	232	HCJ5-C δ Gamma-C J' 3G1- Fc (G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKSDKHTTOPCPAPEAAGPSVFLFPPPKDITLWISRTIP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAP IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTYDKSRWQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	233	WL (C03)-LCJ4-C Delta	KPRSQPHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYFKDTRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKGKYEDSNSVTC SVQHDKITVHSDFE
dg_crossed_Design n_1	HC	234	HCJ4-C δ Gamma-C J' 3G1- Fc (G1)	SSASLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKSDKHTTOPCPAPEAAGPSVFLFPPPKDITLWISRTIP EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVGVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAP IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTYDKSRWQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	235	WL (C03)-LCJ6- C δ Gamma	KDKQLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD
dg_crossed_Design n_2	HC	236	HCJ6-C δ Delta-C J' 4G1- Fc (G1)	SSRSQPHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYFKDTRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAVKGKYEDSNSVTC SVQHDKITVHSDPEKSCDKTHTCPCPAPEAAGPSVFLFPPPKDITLWISRTPEVTGVVVDVSHEDPEVKFN WYDGVGVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFS CSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	237	WL (C03)-LCJ7- C δ Gamma	KDKQLDADVSPKPTIFLPSTCETKLOKAGTYLQLEKFFPDVVIKIHWEKKSNITILGSGEGNTMKTDQTYMKFS WLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 1 0】

	HC	238	HCJ7- cDelta-C J' 4G1- Fc (G1)	EPSPHTKPSFVHMQGNTVACLYKEFVKDIRINLYSSKKITEEDPAICISPSGKYNAVKLGKYEDESNTIC SVQHDQKTVHSTDEPKSCKTHTCPCPAPEAAGPSVFLFPKPKDITLMSRTEPTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTYLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYIT LPDSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
--	----	-----	-----------------------------------	---

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1】

表 2 0 : 例証的ポリペプチド複合体の配列

アルファベータ デザイン	綴名称	配列 番号	配列
T3-Design_1 (IgG1) 正常	LC	1	DI VMTQSPDLSAVSLGERAT INCKSSQLLNSRTRKN YLAWYQKPGGPPKLLIYWASTRQSGVPRF SGSGSGDTFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRFGGGTKVEIKRTVAAPDPAYYQLRDSKSDKSVG LFTDFDSQT MWSSGKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWS M KSDFAACANAF M NSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGF AFTDYIYIHVYRQAPGGGLE M GWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGTLYTVYSSASKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPOP LKEQPAL M DSRYALSSRLRVSATF WQNPRNHFRQGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWVSVLTVLHSD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKITPPVYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SYMHAEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	3	DI VMTQSPDLSAVSLGERAT INCKSSQSLNSRTRKN YLAWYQKPGGPPKLLIYWASTRQSGVPRF SGSGSGDTFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRFGGGTKVEIKPDIGNPDPAAYYQLRDSKSDKSVG LFTDFDSQT MWSSGKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWS M KSDFAACANAF M NSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGF AFTDYIYIHVYRQAPGGGLE M GWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGTLYTVYLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPOP LKEQPAL M DSRYALSSRLRVSATF WQNPRNHFRQGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWVSVLTVLHSD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKITPPVYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SYMHAEALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_5 (IgG1) 正常	LC	1	DI VMTQSPDLSAVSLGERAT INCKSSQSLNSRTRKN YLAWYQKPGGPPKLLIYWASTRQSGVPRF SGSGSGDTFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRFGGGTKVEIKRTVAAPDPAYYQLRDSKSDKSVG LFTDFDSQT MWSSGKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWS M KSDFAACANAF M NSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGF AFTDYIYIHVYRQAPGGGLE M GWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGTLYTVYSSASKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPOP LKEQPAL M DSRYALSSRLRVSATF WQNPRNHFRQGVQFYPSNQIYSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPE VTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWVSVLTVLHSDWLNKGEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGPENNYKIT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SYMHAEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

T3-Design_6 (1 gG1) 正常	LC	3	VL (CD3)- LCJ 2- CA1pha (T4 9C)	DI VMTGSPD SLAVSLGERAT INCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKP GQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLT I TSSLOAEDVAVYYCTOSHILRTFGGKTVEIKPD IONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQT MWSSQKSDVY ITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFMNSIIPEDITFFPSP ESS
	HC	6	VH (CD3) - HC J2- CBeta (S5 6C) (Fg-DE+) - CJ* 1G1 -Fc (G 1)	QVQLVSGSAEVKKPGSSVKVYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSLRSEDITAVYVYCARDGYSLYYFDYWGQGLT VT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQALND SRYALSSRLRVSA TF WQNP RNHFRCQVQFYPNOI VSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGPSVFLFPKP KDTLMISRTPE VTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_6a (1 gG1) 正常	LC	3	VL (CD3)- LCJ 2- CA1pha (T4 9C)	DI VMTGSPD SLAVSLGERAT INCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKP GQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLT I TSSLOAEDVAVYYCTOSHILRTFGGKTVEIKPD IONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQT MWSSQKSDVY ITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFMNSIIPEDITFFPSP ESS
	HC	7	VH (CD3) - HC J2- CBeta (S5 6C) (Fg-DE-) - CJ* 1G1 -Fc (G 1)	QVQLVSGSAEVKKPGSSVKVYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSLRSEDITAVYVYCARDGYSLYYFDYWGQGLT VT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ--SG--RYALSRLRVSA TF WQNP RNHFRCQVQFYPNOI VSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGPSVFLFPKP KDTLMISRTPE VTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_3 (1 gG1) 交差	LC	8	VL (CD3)- LCJ 3- CBeta (S56 C)	DI VMTGSPD SLAVSLGERAT INCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKP GQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLT I TSSLOAEDVAVYYCTOSHILRTFGGKTVEIKLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQALND SRYALSSRLRVSA TFWQNP R NHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPTQIVSAEAWGRA
	HC	9	VH (CD3) -HCJ 3-CA1pha (T49 C)-CJ* 2G1-F c (G1)	QVQLVSGSAEVKKPGSSVKVYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSLRSEDITAVYVYCARDGYSLYYFDYWGQGLT VT VSSASIQNPDPAPVYQLRDSK SSDKSVCLF TDFDQT MWSSQKSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFMNSI IPE DTFFSPSSSSDKTHTCPCPAPEAAGPSVFLFPKP KDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGSFELYSKLTVD KSRWQGGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_4 (1 gG1) 交差	LC	8	VL (CD3)- LCJ 4- CBeta (S56 C)	DI VMTGSPD SLAVSLGERAT INCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKP GQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLT I TSSLOAEDVAVYYCTOSHILRTFGGKTVEIKLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQALND SRYALSSRLRVSA TFWQNP R NHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPTQIVSAEAWGRA

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

HC	10	10	HC 4- CA lpha (T49) C)-CJ* 2G1 - Fc (G1)	QHVLVSGAEVKKPGSSVKYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVSSPDIONPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTWVSGSKSDSYITDKCYLDMRSMDFKNSAYAWMSKSDACANAFMNSIIE DTFFSPESSSDKTHTOPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPVTCVWVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LC T3-Des ign_7 (1 gG1) 交差	11	11	VL (CD3)- LCJ 3- CBeta (S56) C) (FG-DE+)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKLEDLKNVFPPEVAVFEFPESEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHLVLSWVWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALNDSRYALSSRLRYSATFWQNPR NHFRCCVQFYP SNQIVSAEAWGRA
HC	9	9	HC 3- CA lpha (T49) C)-CJ* 2G1 - Fc (G1)	QHVLVSGAEVKKPGSSVKYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVSSASIONPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTWVSGSKSDSYITDKCYLDMRSMDFKNSAYAWMSKSDACANAFMNSIIE DTFFSPESSSDKTHTOPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPVTCVWVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LC T3-Des ign_8 (1 gG1) 交差	11	11	VL (CD3)- LCJ 4- CBeta (S56) C) (FG-DE+)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKLEDLKNVFPPEVAVFEFPESEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHLVLSWVWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALNDSRYALSSRLRYSATFWQNPR NHFRCCVQFYP SNQIVSAEAWGRA
HC	10	10	HC 4- CA lpha (T49) C)-CJ* 2G1 - Fc (G1)	QHVLVSGAEVKKPGSSVKYSCASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVSSPDIONPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTWVSGSKSDSYITDKCYLDMRSMDFKNSAYAWMSKSDACANAFMNSIIE DTFFSPESSSDKTHTOPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPVTCVWVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LC T3-Des ign_2-0 G00 (1 gG1)	12	12	VL (CD3)- LCJ 2- CA lpha (T4 9C) (N34Q+N6 80+ N78Q)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSYC LFTDFDSQTQVSGSKSDSYITDKCYLDMRSMDFKNSAYAWMSQKSDACANAFQNSIIPEDTFFPSP ESS

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 4】

T3-Des ign_2-A AAA (1 gG1)	HC	13	WH (C03)- HCJ 2- CBeta (S56 C) (N69Q)-C J' 1G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
				DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTAWQSQKSDSYVITDKCYLDWRSMDFKNSAVAWSAKSDFACANAFKNSIIPEDTFFPSP ESS	
				QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
T3-Des ign_2-Q SKE (1 gG1)	LC	14	WL (C03)- LCJ 2- CA1pha (T4 9C) (N34A+N6 9A+ N79A)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
				DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTQWSQKSDSYVITDKCYLDWRSMDFKNSAVAWSAKSDFACANAFKNSIIPEDTFFPSP ESS	
				QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
T3-Des ign_2-A SKE (1 gG1)	LC	15	WH (C03)- HCJ 2- CBeta (S56 C) (N69A)-C J' 1G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
				DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTQWSQKSDSYVITDKCYLDWRSMDFKNSAVAWSAKSDFACANAFKNSIIPEDTFFPSP ESS	
				QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
T3-Des ign_2-A SKE (1 gG1)	LC	16	WL (C03)- LCJ 2- CA1pha (T4 9C) (N34Q+N 98S+ N79K)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
				DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTQWSQKSDSYVITDKCYLDWRSMDFKNSAVAWSAKSDFACANAFKNSIIPEDTFFPSP ESS	
				QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
T3-Des ign_2-A SKE (1 gG1)	LC	17	WH (C03)- HCJ 2- CBeta (S56 C) (N69E)-C J' 1G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
				DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTAWQSQKSDSYVITDKCYLDWRSMDFKNSAVAWSAKSDFACANAFKNSIIPEDTFFPSP ESS	
				QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSRLRYSATF WQNP RHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 5】

T3-Design_2-0000 (1gG1)	HC	17	WH (CD3)- HcJ 2- Cβeta (S56 C) (N69E)-C J' 1G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPQGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGTLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVOLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVQFVGLSENDEWTDQRAKPTQIVSAEAWGRASDKTHTCPQCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLDHOD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_2-0000 (1gG1)	LC	19	WL (CD3)- LCJ 2- Cα1pha (T4 9C) (N34Q+N6 8Q+ N79Q+ N6 1Q)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPDIQNPDPAYYQLRDSKSKDSKSYC LFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCYLDMRSMDFKSNASAVWSQKSDFAACANAFQNSIIPEDITFFPSP ESS
T3-Design_2-0000 (1gG4)	HC	20	WH (CD3)- HcJ 2- Cβeta (S56 C) (N69Q)-C J' 1G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPQGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGTLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVOLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVQFVGLSENDEWTDQRAKPTQIVSAEAWGRASDKTHTCPQCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLDHOD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
T3-Design_2-0000 (1gG4)	LC	12		DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPDIQNPDPAYYQLRDSKSKDSKSYC LFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCYLDMRSMDFKSNASAVWSQKSDFAACANAFQNSIIPEDITFFPSP ESS
E17-Design_2-0000 (1gG1)	HC	21	WH (CD3)- HcJ 2- Cβeta (S56 C) (N69Q)-C J' 1G4- Fc (G 4)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPQGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGTLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVOLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVQFVGLSENDEWTDQRAKPTQIVSAEAWGRYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLDHODWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES N6QPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
E17-Design_2-0000 (1gG1)	T3-LC	12	WL (CD3)- LCJ 2- Cα1pha (T4 9C) (N34Q+N6 8Q+ N79Q)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAYVYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPDIQNPDPAYYQLRDSKSKDSKSYC LFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCYLDMRSMDFKSNASAVWSQKSDFAACANAFQNSIIPEDITFFPSP ESS

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 6】

E17-Design_2-0000 (IgG4)	T3-HC	22	WH (CD3) - HCJ 2- CBeta (S56 C) (NB8Q) - C J' 1G1- Fc (G 1) (Knob)	QHQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFVGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKHTCPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNQYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNKGEYKCKYSNKPALPAIEKTIISKAKGPREPQVYTLPPQREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	U4-LC	23	WL (CD19) - CL	DIQLTQSPFSLASVGDRTITCSASTSNYMHVYQOKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSPRFGSGSGT EFTLTISLLOPEDFATYYCHQWSSYPYTFGGGTKEITKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLN NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPY TKSFNRGEC
	U4-HC	24	WH (CD19) - CH1 -Fc (G1) (Ho1 e)	QHQLVQSGPEVKKPGTSVKYSCKASGYAFTSYNMVYVRQARGORLEWIGTIDPYNGDITTYNQKFKGRV TITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLITAYAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSG GTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTICNVNHNK PSNTKYDKRVEPKSCDKHTCTCPQPAPEAAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNKGEYKCKYSNKPALPAIEKTIISKAKG OPREPVCTILPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	T3-LC	12	WL (CD3) - LCJ 2- CA1pha (T4 9C) (N34Q+N6 90+ N79Q)	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTKRYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF S6SGSGTDFLTITISLLOAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGTKEIKKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSYC LFTDFDSQTQVQSQSKDSYVITDKCYLDMRSMDFKNSAVAWSQKSDFAACANAFQNSIIPEDTTFPSP ESS
	T3-HC	25	WH (CD3) - HCJ 2- CBeta (S56 C) (NB8Q) - C J' 1G4- Fc (G 4) (Knob)	QHQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFVGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRYPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTAPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN KGEYKCKYSNKPALPAIEKTIISKAKGPREPQVYTLPPQREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	U4-LC	23	WL (CD19) - CL	DIQLTQSPFSLASVGDRTITCSASTSNYMHVYQOKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSPRFGSGSGT EFTLTISLLOPEDFATYYCHQWSSYPYTFGGGTKEITKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLN NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPY TKSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 7】

	U4-HC	28	VH (CD19) -CH1 -Fc (G4) (Hol e)	QMLVQSGREVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMVYVRQARGORLEWIGYIDPYNGDTTYNQKFKGRV TITRDMSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCLITTA YANDYWGOGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLYKDYFPEPVTYSWNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSSVTVPSSSLGKTITCTONVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLPPKPDITMISRTPEVTCVVDVSDQDEPEVQFN WYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSKGKLPSSTIEKTIISAKGQPR EPOVCTLPPSDEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
F16-Design_2- 0000 (1gG4)	T3-LC	12		DI VMTQSPDLSAYSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTRSGVPPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLOAEDEVAYYCTQSHTLRTEGGGTKEIKPDIQMPDPAYYQLRDSKSSDKSYC LFTDFDSQTQVSSGKSDSYITDKCLDMRSMDFKSNAYAWSQKSDFCANAFQNSITIPEDTFFSP ESS
	T3-HC	25		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGEAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCARDGYSLYYFYWGOGTLVTYLEDLKNVFPPEVAVVFPESE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WONPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGRYGPPOPPAPPEFLGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSDQDEPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSKGKLPSSTIEKTIISAKGQPREPQVYTLPPCQDEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	U4-LC	23	VL (CD19) -CL	DIQLTQSPSFLSASVGRVYITTCASSTVYNMHWYQOKPKAPKLLIYSTSNLASGVPSSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCHQWSYPYTFGGGSKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLN NFYPREAKYQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKHVAACEVTHGSLSPV TKSFNRGEC
	U4-HC	27	VH (CD19) -CH1 - Spacer-VH (CD19) -CH1- Fc (G4) (Hol e)	QMLVQSGREVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMVYVRQARGORLEWIGYIDPYNGDTTYNQKFKGRV TITRDMSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCLITTA YANDYWGOGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLYKDYFPEPVTYSWNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSSVTVPSSSLGKTITCTONVDHK PSNTKYDKRYGGSGSGGSGSQMLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMVYVRQARGORLEW GYIDPYNGDTTYNQKFKGRVITITRDMSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCLITTA YANDYWGOGTLVTYSS ASTKGSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSSV VTPSSSLGKTITCTONVDHKPSNKTVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPKPKDITLMISRT PEVTCVVDVSDQDEPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSK NGKLPSSIEKTIISAKGQPREPQVCTLPPSDEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPNYK TTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
Fc-1gG1 (ノブ)		304		SYFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSDQDEPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYCKVSKNKAAPAEKTIISAKGQPREPQVYTLPPCQDEMTKNQVSLWCLVKGFY SDIAVEWESNGQPNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 8】

Fc-1sg4 (ノブ)		305		SVFLFPPKQDTLMISRTPEVTCVWVDVSQDEPEVQFNWYVDGVEYVHNAKTKPREEQFNSTYRVYSVL TYLHQDWLNGKEYKCKVSKGKLSPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPYLDSDGSFLYSRLTVKSRWQEGNVFSGVSMHEALHNHYTQKSLS LSLGK
T3-Fab-Design _2.his1	LC	3	VL (CD3)- LCJ 2- CAlpha (T4 9C)	DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDSDQTNWSSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	28	WH (CD3)- HCJ 2- CBeta (S56 C)Conjunctio n'	QYQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYTHWVRQAPGGGLEWMTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYCARDGSLYYFDYWGGTLVTILEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALMDSRYALSSRLRYSATF WQNPRHFRCCGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGR
T3-Fab-Design _2.his2	LC	3		DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDSDQTNWSSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	29	WH (CD3)- HCJ 2- CBeta (S56 C)Conjunctio n'	QYQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYTHWVRQAPGGGLEWMTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYCARDGSLYYFDYWGGTLVTILEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALMDSRYALSSRLRYSATF WQNPRHFRCCGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGR
T3-Fab-Design _2-Q000.his1	LC	12	VL (CD3)- LCJ 2- CAlpha (T4 9C) (N34Q+N6 8Q+ N79Q)	DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDSDQTQWSSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVWSNKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	30	WH (CD3)- HCJ 2- CBeta (S56 C) (N59Q)-Hi s1	QYQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYTHWVRQAPGGGLEWMTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYCARDGSLYYFDYWGGTLVTILEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNPRHFRCCGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGR
T3-Fab-Design _2-Q000.his2	LC	12		DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIONPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDSDQTQWSSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVWSNKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSP ESS
	HC	31	WH (CD3)- HCJ 2- CBeta (S56 C) (N59Q)-Hi s2	QYQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYTHWVRQAPGGGLEWMTSPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYCARDGSLYYFDYWGGTLVTILEDLKNVFPPEVAVEPSE AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDQPLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNPRHFRCCGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGR
	CBeta_1_noCys	32	CBeta (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDFQPLKEQPALMDSRYALS SRLRYSATFWQNPRHFRCCGVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQIYSAEAWGR

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 9】

CBeta	CBeta_1	33	CBeta(S56C) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALMDSRYALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVGLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEA
	CBeta_1-Q	34	CBeta(S56C) (N69Q) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVGLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEA
	CBeta_1-A	35	CBeta(S56C) (N69A) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALADSRVALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVGLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEA
	CBeta_1-E	36	CBeta(S56C) (N69E) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALEDSRVALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVGLSENDEWTQDRAKPYTQIVSAEA
	CBeta_2	37	CBeta(S56C) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALMDSRYALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVPSN-----QIVSAEA
	CBeta_2-Q	38	CBeta(S56C) (N69Q) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVPSN-----QIVSAEA
	CBeta_2-A	39	CBeta(S56C) (N69A) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALADSRVALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVPSN-----QIVSAEA
	CBeta_2-E	40	CBeta(S56C) (N69E) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALEDSRVALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVPSN-----QIVSAEA
	CBeta_3	41	CBeta(S56C) (FG-DE-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ---S-GRYALS SRLRVSAFWMQPNRHHFRCCVQFVPSN-----QIVSAEA
	CAIpha_1_noCys	42	CAIpha	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSMKSDFACAN AFNNSTIPEDTFFSPSS
CAIpha	CAIpha_1	43	CAIpha(T49C)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSMKSDFACAN AFNNSTIPEDTFFSPSS
	CAIpha_1-QQ	44	CAIpha(T49C) (N34Q+N68Q+N79Q)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFACAN AFQNSTIPEDTFFSPSS
	CAIpha_1-AA	45	CAIpha(T49C) (N34A+N68A+N79A)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSAKSDFACAN AFANSTIPEDTFFSPSS

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 0】

	CAIpha_1-QSK	46	CAIpha(T49C) (N34Q+N68S+N79K)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVA WSSKSDFA CAN AFKNSIIPEDTFFSPESP
	CAIpha_1-ASK	47	CAIpha(T49C) (N34H+N68S+N79K)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTAVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVA WSSKSDFA CAN AFKNSIIPEDTFFSPESP
	CAIpha_1-QQQQ	48	CAIpha(T49C) (N34Q+N68Q+N79Q+N61Q)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVA WSSKSDFA CAN AFQNSIIPEDTFFSPESP
ConjunctionX	H_Conjunction_1	49	WH-CBetaCJ1	SSASKNVFPP
	H_Conjunction_2	50	WH-CBetaCJ2	LEDLKNVFP
ConjunctionZ	L_Conjunction_1	51	WL-CAIphaCJ1	KRTVAAPDP
	L_Conjunction_2	52	WL-CAIphaCJ2	KPDIQNPDP
Conjunction'Y	Conjunction'_IgG1	53	CBeta-Conjunction' (IgG1)CJ1	WGRSDKTHTCPPCPAPEAAGP
	Conjunction'_IgG4	54	CBeta-Conjunction' (IgG4)CJ1	WGR---YGPCCPPCPAPEFLGGP
		307		FE
		308	WH-CBetaCJ2	KLEDLKNVFP
		309	WL-Cpre-AIphaCJ1	KPTGVGGTP
		306	Cter (交差軽鎖 cter)	WGRA
プレアルファ-ベータデザイン	鎖名称	配列番号	Sequences	
	LC	64	VL(CD3)-LCJB-CPreAIpha(N50Q)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKVEIKPTIGVGGTPEPSLAPPIMLLYDGKQ QM VVVCVLVDVAPPGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL AHSLSPEELASWEPLYCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 1】

Design_1_Pre- TCR_Conjuncti on_1	HC	85	WH (CD3)-HCJB -CBeta (N69Q) -CJ' 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAIF WQNPRNHFRCQGVFGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTQPPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRYVSVLTVLHOD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	86	WL (CD3)-LCJB -CPreAlpha (Y59C) (N50 Q)	DI VMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEFSLPPIMLLVGKGQ QM VVVCVLVDVAPPGLDSPWFSGAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNHLSPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
Design_2_Pre- TCR_Conjuncti on_1_Cys10	HC	87	WH (CD3)-HCJB -CBeta (\$78C) (N69Q)-CJ' 1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAIF WQNPRNHFRCQGVFGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTQPPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRYVSVLTVLHOD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	88	WL (CD3)-LCJB -CPreAlpha (A13C) (N50 Q)	DI VMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEFSLPPIMLLVGKGQ QM VVVCVLVDVAPPGLDSPWFSGAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNHLSPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
Design_3_Pre- TCR_Conjuncti on_1_Cys11	HC	89	WH (CD3)-HCJB -CBeta (F13C) (N69Q)-CJ' 1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSDTPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAIF WQNPRNHFRCQGVFGLSENDEWTDQRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTQPPCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRYVSVLTVLHOD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	88	WL (CD3)-LCJB -CPreAlpha (A13C) (N50 Q)	DI VMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEFSLPPIMLLVGKGQ QM VVVCVLVDVAPPGLDSPWFSGAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNHLSPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 2】

Design_4_Pre- TCR_Conjuncti on' 1_Cys12	HC	70	WH (C03)-HCJB -CBeta (S18C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWITSPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPC AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYYDVSHEDPEVKFNWYVDGVEYHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFYPYSDIAVE WESNGGPENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	71	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (S11C) (N50 Q)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEPCAPPIMLLVDGKQ QM VV VCLVLDVAPPGLDSPFWFSAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
Design_5_Pre- TCR_Conjuncti on' 1_Cys13	HC	70	WH (C03)-HCJB -CBeta (S18C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWITSPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPC AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYYDVSHEDPEVKFNWYVDGVEYHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFYPYSDIAVE WESNGGPENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	71	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (S11C) (N50 Q)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEPCAPPIMLLVDGKQ QM VV VCLVLDVAPPGLDSPFWFSAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
Design_6_Pre- TCR_Conjuncti on' 1_Cys14	HC	72	WH (C03)-HCJB -CBeta (A18C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWITSPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPC CEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYYDVSHEDPEVKFNWYVDGVEYHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLYKGFYPYSDIAVE WESNGGPENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	71	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (S11C) (N50 Q)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPTIGVGGTPEPCAPPIMLLVDGKQ QM VV VCLVLDVAPPGLDSPFWFSAGQGSALDAFTYGPSPATDGTWTLNLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 3】

Design_7_Pre- TCR_Conjuncti on'_1_Cys15	HC	73	WH (C03)-HCJB -CBeta (E19C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS ACISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPQCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNQGEYKCKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	74	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (S82C) (N50 Q)	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTKVEIKPTIGYGGTPEPSLAPPIMLLVGKQ QMVVVCLVDVAPPGLDSPWFWSAGQGSALDAFTYGPSPACDGTWNTLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEHRSRSTQPMHLSGEASTART
Design_8_Pre- TCR_Conjuncti on'_1_Cys1_4L4 T_1	HC	75	WH (C03)-HCJB -CBeta (S56C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPQCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNQGEYKCKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	76	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (T65C) (N50 Q)	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTKVEIKPTIGYGGTPEPSLAPPIMLLVGKQ QMVVVCLVDVAPPGLDSPWFWSAGQGSALDAFTYGPSPACDGTWNTLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEHRSRSTQPMHLSGEASTART
Design_9_Pre- TCR_Conjuncti on'_1_Cys2_4L4 T_2	HC	75	WH (C03)-HCJB -CBeta (S56C) (N69Q)-CJ* 1G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS AEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRYSATF WQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRASDKTHTCPQCPAPEAAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVYSVLTVLHQD WLNQGEYKCKVSNKALPAIEKTIISKAGGPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	77	WL (C03)-LCJB -CPreAlpha (I16C) (N50 Q)	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTKVEIKPTIGYGGTPEPSLAPPIMLLVGKQ QMVVVCLVDVAPPGLDSPWFWSAGQGSALDAFTYGPSPACDGTWNTLAHLSLPSEELASWEPLVCHT GPGAEHRSRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 4】

Design_10_Pre_TCR_Conjunction' 1_Cys4	HC	78	VH (C03)-HCJB-CBeta (A11C) (N69Q)-CJ' I61- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTDYTHHWVRAAPGGGLEWNGWISPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVGFYGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKD TLMISRTEPTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV WESNGQPENNYKTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	58		DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTRSGVDPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRFTFGGGTKVEIKPTIGYGGTPEFSLAPPIWLLVDGKQ QM VYVCLYLDVAPPGLDSPWFSAQSGSALDAFTYGSPATDGTWTLAHL SLPSEELASWEPLYCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGG
Design_11_Pre_TCR_Conjunction' 2_Termin al	HC	79		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTDYTHHWVRAAPGGGLEWNGWISPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVGFYGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKD TLMISRTEPTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQ WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV WESNGQPENNYKTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	83		DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTRSGVDPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHLTRFTFGGGTKVEIKPTIGYGGTPEFSLAPPIWLLVDGKQ QM VYVCLYLDVAPPGLDSPWFSAQSGSALDAFTYGSPATDGTWTLAHL SLPSEELASWEPLYCHT GPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTC
Design_12_Pre_TCR_Conjunction' 3_C	HC	80		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTDYTHHWVRAAPGGGLEWNGWISPGNVNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYFDYWGOGTLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNP RNHFRCQVGFYGLSENDEWTDRAKPYTQIVSAEAWGRADCKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKD TLMISRTEPTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQ WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV WESNGQPENNYKTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Conjunction#	L_Conjunction_3	81	VL-Cpre-Alpha aCJB	PTGVGGTP
	CPreAlpha	82		FPSLAPPIWLLVDGKQMVVVCVLVDVAPPGLDSPWFSAAGNGSALDAFTYGSPATDGTWTLAHL S LPSEELASWEPLYCHTGP GAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco (Design1)	83	(N500)	FPSLAPPIWLLVDGKQMVVVCVLVDVAPPGLDSPWFSAAGNGSALDAFTYGSPATDGTWTLAHL S LPSEELASWEPLYCHTGP GAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design2)	311	(N500, Y59C)	FPSLAPPIWLLVDGKQMVVVCVLVDVAPPGLDSPWFSAAGNGSALDAFTYGSPATDGTWTLAHL S LPSEELASWEPLYCHTGP GAEGHSRSTQPMHLSGEASTART

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 5】

CPreAlpha	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design3)	312	(N500, A13C)	FPSLCPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design4)	312	(N500, A13C)	
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design5)	313	(N500, S11C)	FPCAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design6)	313	(N500, S11C)	
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design7)	313	(N500, S11C)	
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design8)	314	(N500, S62C)	FPSLAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design9)	315	(N500, T65C)	FPSLAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPACDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco-Cys (Design10)	316	(N500, I16C)	FPSLAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	CPreAlpha-noGlyco (Design11)	317	(N500, ter_残基s)	FPSLAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQELRGTPGG
	CPreAlpha-noGlyco (Design12)	318	(N500, Cter_only)	FPSLAPPIMLLVDGKQOMVVVCLVDYAPPGGLDSPWFSAQGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL A H L S LPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTARTC
	CBeta_for PreAlpha	84	N690	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL S SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
	Design_1	84	N690	
	Design_2	319	N690, S76C	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL C SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
	Design_3	320	N690, F19C	EVAVCEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL S SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
	Design_4	321	N690, S16C	EVAVFEPCEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL S SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
	Design_5	321	N690, S16C	
	Design_6	322	N690, A18C	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL S SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
	Design_7	323	N690, E19C	EVAVFEPSEAEISHTOKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYAL S SRLRYSAFVQWPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEA
CBeta_for_PreAlpha	Design_8	34	N690, S56C	
	Design_9	34	N690, S56C	

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 6】

デルタ-ガンマデザイン	Design_10	324	M69Q, A11C	EVCFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGVEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALS SRLRYSATFWQPNRHFRCQVQFYGLSENDEMTQDRAKPTQIYSHEA
	Design_11	84	M69Q	
	Design_12	84	M69Q	
	読名称 配列 番号			Sequences
dg_Design_2_no_61yco	LC	85	VL (C03) - LCJ5 -Cdelta (N16 Q+N79Q)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVDPDRF SGSGSGTDFLTISSLQAEDEVVYCTGSHTLRTFGGTVKEIERPSQHTKPSVFMKQGTWVACL KEYPKDIRINLYSSKKITEFDPALVITSPSGYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
	HC	86	VH (C03) - HCJ5 -CGamma-CJ* 3G1 - Fc (G1) (N65Q)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISP GNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVITVDKQLDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIKHWQEKSNITLGSCEGNTMKTDITYMKFSWLTWPEESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVY DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNGVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGOPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKLSLSPGK
	LC	89	VL (C03) - LCJ5 -Cdelta (N16 C) (N79Q)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVDPDRF SGSGSGTDFLTISSLQAEDEVVYCTGSHTLRTFGGTVKEIERPSQHTKPSVFMKQGTWVACL KEYPKDIRINLYSSKKITEFDPALVITSPSGYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
	HC	90	VH (C03) - HCJ5 -CGamma (T12 C) (N65Q) - C J* 3G1 - Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISP GNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVITVDKQLDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIKHWQEKSNITLGSCEGNTMKTDITYMKFSWLTWPEESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVY DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNGVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGOPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKLSLSPGK
dg_Design_2_hypeOys2_no_61yco	LC	91	VL (C03) - LCJ5 -Cdelta (V50 C) (N16Q + N 79Q)	DI VMTGSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSTRKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVDPDRF SGSGSGTDFLTISSLQAEDEVVYCTGSHTLRTFGGTVKEIERPSQHTKPSVFMKQGTWVACL KEYPKDIRINLYSSKKITEFDPALVITSPSGYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
	HC	92	VH (C03) - HCJ5 -CGamma (Q57 C) (N65Q) - C J* 3G1 - Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTDYIHWVRQAPGGGLEWMGWISP GNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVITVDKQLDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIKHWQEKSNITLGSCEGNTMKTDITYMKFSWLTWPEESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVY DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNGVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGOPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHHEALHNHYTQKLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 7】

	LC	93	WL (CD3)-LCJ5 -Cdelta (D48 C) (N16Q + N 79Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQKPGOPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLTIISSLOAEDVAVYYCTQSHLTRFGGKTVEIEPRSQPHTKPSVFCVKQGTNVAACL V KEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
dg_Des ign_2_h ypeCys3_no_Gl yco	HC	94	WH (CD3)-HCJ5 -CGamma (M62 C) (N65Q)-C J* 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGLTVITDQKQDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIHWQEKSNITILGSGEANTKTQDYMFKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPITKSDKHTHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKKCVSNKALPAP1 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK
	LC	95	WL (CD3)-LCJ5 -Cdelta (F12 C) (N16Q + N 78Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQKPGOPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLTIISSLOAEDVAVYYCTQSHLTRFGGKTVEIEPRSQPHTKPSVFCVKQGTNVAACL V KEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
dg_Des ign_2_C ys2_no_Glyco	HC	96	WH (CD3)-HCJ5 -CGamma (S17 C) (N65Q)-C J* 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGLTVITDQKQDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIHWQEKSNITILGSGEANTKTQDYMFKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPITKSDKHTHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKKCVSNKALPAP1 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK
	LC	97	WL (CD3)-LCJ5 -Cdelta (M14 C) (N16Q + N 79Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQKPGOPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLTIISSLOAEDVAVYYCTQSHLTRFGGKTVEIEPRSQPHTKPSVFCVKQGTNVAACL V KEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE
dg_Des ign_2_C ys1_no_Glyco	HC	98	WH (CD3)-HCJ5 -CGamma (F14 C) (N65Q)-C J* 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDVWGQGLTVITDQKQDADVSPKPTICLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVVIHWQEKSNITILGSGEANTKTQDYMFKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFPPITKSDKHTHTOPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKKCVSNKALPAP1 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK
	LC	99	WL (CD3)-LCJ5 -Cdelta (F12 C) (N16Q + N 79Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQKPGOPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFLTIISSLOAEDVAVYYCTQSHLTRFGGKTVEIEPRSQPHTKPSVFCVKQGTNVAACL V KEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAYKLGKVEDNSVTCVQHDQKTVHSTDFE

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 8】

dg_Des ign_2_C ys3_no_Gl yco	HC	99	WH (CD3) -HCJ5 -CGamma (E20 C) (N65Q) -C J' 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TIITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVTVDKQLDADVSPKPTIFLPS IACTKLQKAGTYLQLEKFFPDVVIKHQEEKSNITLGSQEGNTMKTDQTYMKFSWLTYPPEESLDKEH RCIVRHENNNKGVDOEITFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVWHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	100	WL (CD3) -LCJ5 -CDelta (F87 C) (N16Q + N 78Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF S6SGSGTDFLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTYEIERPSQPHTKPSVFMKQGTNWACLY KEFYPKDIRINLVSSKKITTEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKVEDNSVTCVQHDQKTYHSTDFE
dg_Des ign_2_C ys4_no_Gl yco	HC	101	WH (CD3) -HCJ5 -CGamma (A19 C) (N65Q) -C J' 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TIITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVTVDKQLDADVSPKPTIFLPS ICETKLQKAGTYLQLEKFFPDVVIKHQEEKSNITLGSQEGNTMKTDQTYMKFSWLTYPPEESLDKEH RCIVRHENNNKGVDOEITFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVWHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	102	WL (CD3) -LCJ5 -CDelta (E88 C) (N16Q + N 78Q)	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF S6SGSGTDFLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTYEIERPSQPHTKPSVFMKQGTNWACLY KEFYPKDIRINLVSSKKITTEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKVEDNSVTCVQHDQKTYHSTDFE
dg_Des ign_2_C ys5_no_Gl yco	HC	101	WH (CD3) -HCJ5 -CGamma (A19 C) (N65Q) -C J' 3G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TIITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTYVTVDKQLDADVSPKPTIFLPS ICETKLQKAGTYLQLEKFFPDVVIKHQEEKSNITLGSQEGNTMKTDQTYMKFSWLTYPPEESLDKEH RCIVRHENNNKGVDOEITFPPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKYSNKKALPAPI EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGPENNYKTTTPVLD DGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVWHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	105	WL (CD3) -LCJ5 -CDelta	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF S6SGSGTDFLTITSSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTYEIERPSQPHTKPSVFMKQGTNWACLY KEFYPKDIRINLVSSKKITTEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKVEDNSVTCVQHDQKTYHSTDFE

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1 9】

d _g _Des i gn_2	HC	106	WH (C03)-HCJ5 -CGamma-CJ* 3G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYVTHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVTNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTVDKQLDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVTKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKINDTYMKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYMSYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKCKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVWMEALHNHYTQKSLSLSPGK
d _g _Des i gn_1	LC	107	WL (C03)-LCJ4 -CDe lta	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQKPGQPKLLIYWASTRQSGVPDFR SGSGGTDFTLTISSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTVEIKPRSQPHTKPSVFMKNGTNAACLV KEFPKDIRINLYSSKKTIEFPAIVISPSGKNAYKLGYEDSNSTVCSVQHDNKTIVHSTDFE
	HC	108	WH (C03)-HCJ4 -CGamma-CJ* 3G1- Fc (G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYVTHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVTNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTSSASLDADVSPKPTIFLPS IAETKLQAGTYLCLLEKFFPDVTKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKINDTYMKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYMSYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKCKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVWMEALHNHYTQKSLSLSPGK
d _g _crossed_De s i gn_1	LC	109	WL (C03)-LCJ6 - CGamma	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQKPGQPKLLIYWASTRQSGVPDFR SGSGGTDFTLTISSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTVEIKDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKL QKAGTYLCLLEKFFPDVTKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTIQDTYMKFSWLTVPESLDKEHRCIVRH ENKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD
	HC	110	WH (C03)-HCJ6 - CDe lta-C J* 4G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCKASGFAFTDYVTHWVRQAPGGGLEWMGWISPGNVTNTKYNENFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLSRSEDITAVYYCARDGYSLYYFDYWGOGTLVTSSRSQPHTKPSVFMKQGI NWACLYKEEYPKDIRINLYSSKKTIEEDPAICISPSGKYNAVKLGKVEDSNISYICSVQHDQKTVHSTID EPKSDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVYVDYSHEDPEVKFNWYVDGVE WHNAKTKPREEQYMSYRVVSVLTVLHQQDLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVWMEALHNHYTQKSLSLSPGK
	LC	111	WL (C03)-LCJ7 - CGamma	DIYMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQKPGQPKLLIYWASTRQSGVPDFR SGSGGTDFTLTISSLAQEDVAVYYCTQSHTLRTFGGKTVEIKDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKL QKAGTYLCLLEKFFPDVTKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTIQDTYMKFSWLTVPESLDKEHRCIVRH ENKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2 0】

dg_crossed_Design_2	HC	112	VH (C03)-HCJ7 - Cdelta-C J' 4G1- Fc (G 1)	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGF AFTDYYIHVVRRQAPGGGLEWMGI SPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTAYMELSSLSEDTAVYVCARDGYSLYYFDYWGQGLTYTVEPRSQPHTKPSYFVWKQGT NVAOLVKEFYPKDIRINLVSSKAITIEFPAICISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCVQHDQKTVHSTD EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEYKFNWYVDGVE VHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPRFPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSGVHHEALHNHYTQKSLSLSPGK	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGF AFTDYYIHVVRRQAPGGGLEWMGI SPGNVNTKYNEFKGRV TITADKSTAYMELSSLSEDTAVYVCARDGYSLYYFDYWGQGLTYTVEPRSQPHTKPSYFVWKQGT NVAOLVKEFYPKDIRINLVSSKAITIEFPAICISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCVQHDQKTVHSTD EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEYKFNWYVDGVE VHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPRFPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSGVHHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cgamma	Cgamma_1	113	Cgamma	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	Cgamma_1_no_Glyco	114	Cgamma (N65 Q)	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_1	113	No 変異s		
	dg_Design_2	113	No 変異s		
	dg_Design_2_no_Glyco	114	N65Q		
	dg_Design_2_hypeOy s1_no_Glyco	333	N65Q, T12C	KPCTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPCTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_hypeOy s2_no_Glyco	334	N65Q, Q57C	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_hypeOy s3_no_Glyco	335	N65Q, M62C	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_Cys2_n o_Glyco	336	N65Q, S17C	KPTIFLPCTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLD-KEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPCTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLD-KEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_Cys1_n o_Glyco	337	N65Q, F14C	KPTICLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTICLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
1	dg_Design_2_Cys3_n o_Glyco	338	N65Q, E20C	KPTIFLPSTACTKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTACTKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_Cys4_n o_Glyco	339	N65Q, A19C	KPTIFLPSTCETKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF	KPTIFLPSTCETKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIF
	dg_Design_2_Cys5_n o_Glyco	339	N65Q, A19C		
	dg_crossed_Design_1	340		KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD	KPTIFLPSTAEKLOKAGTYLCLLEKFFPDVVIKIHWOEKKSNITLGSQEGNTMKTQDTYMKFSWLTVP EESLQKEHRCIVRHENKNGVDQEIIFPPIKTDVITMD
	dg_crossed_Design_2	340			

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2 1】

Cdelta	Cdelta_1	115	Cdelta	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DNKTVHSTDFE
	Cdelta_1_no_Glyco	118	Cdelta (N18Q + N79Q)	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
		310	Cdelta	KS FVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQ HDNKT VHSDFE
	dg_Design_1	115	No 変異s	
	dg_Design_2	115	No 変異s	
	dg_Design_2_no_Gly co	118	N18Q, N79Q	
	dg_Design_2_hypeCy s1_no_Glyco	325	N18Q, N79Q	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_hypeCy s2_no_Glyco	328	N18Q, N79Q, V50C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_hypeCy s3_no_Glyco	327	N18Q, N79Q, D46C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_Cys2_n o_Glyco	328	N18Q, N79Q, F12C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_Cys1_n o_Glyco	329	N18Q, N79Q, M14C	SVFVCKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_Cys3_n o_Glyco	328	N18Q, N79Q, F12C	
	dg_Design_2_Cys4_n o_Glyco	330	N18Q, N79Q, F87C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_Design_2_Cys5_n o_Glyco	331	N18Q, N79Q, E88C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_crossed_Design_ 1 (重鎖上のデルタ)	332	N18Q, N79Q, V50C	SVFVWKNGTNVACLWKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYESNSVTCSVQH DQKTVHSTDFE
	dg_crossed_Design_ 2 (重鎖上のデルタ)	332		
ConjunctionR	H_Conjunction_4	117	HCJ4	SSASLDADVSP
	H_Conjunction_5	118	HCJ5	TDKLDADVSP
ConjunctionT	L_Conjunction_4	119	LCJ4	PRSQPHTKP
	L_Conjunction_5	120	LCJ5	EPRSQPHTKP
Conjunction'S	Conjunction' 3_IgG1	121	CJ' 3G1	PPIKSDKTHTCPPCPAPEAAGGP
	Conjunction' 3_IgG4	122	CJ' 3G4	PPI---YGPPOPPCPAPEFLGGP

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2 2】

ConjunctionH	H_Conjunction_6	123	HCJ6	SSRSQPHTKP	
	H_Conjunction_7	124	HCJ7	EPRSQPHTKP	
ConjunctionJ	L_Conjunction_6	125	LCJ6	KDKLDADVSP	
	L_Conjunction_7	126	LCJ7	TDKLDADVSP	
Conjunction' I	Conjunction' 4_IgG1	127	CJ' 4G1	EPKSSDKHTCPCPAPEAAGGP	
	Conjunction' 4_IgG4	128	CJ' 4G4	ESK---YGPPOPCPAPEFLGGP	
Conjunction	H_Conjunction_3	129	HCJ3	SSASIQNPDP	
(アルファ-ベータ、交差、より抗体)	L_Conjunction_3	50	LCJ3		
Conjunction	H_Conjunction_4	130	HCJ4	SSPDIQNPDP	
(アルファ-ベータ、交差、よりT OR)	L_Conjunction_3	50	LCJ3		
Conjunction	軽鎖 Conjunction	131	LCJA	RTVAAGTP	
(ブレアルファ-ベータ、正常、より抗体)					
Conjunction	軽鎖 Conjunction	50	LCJC		
(ブレアルファ-ベータ、交差、より抗体)	重鎖 Conjunction	132	HCJC	SSASGVGGTP	
Conjunction	軽鎖 Conjunction	50	LCJD		
(ブレアルファ-ベータ、交差、よりTCR)	重鎖 Conjunction	133	HCJD	SSPTGVGGTP	
Conjunction'	Conjunction'	134	CJ' 2G1	SDKHTCPCPAPEAAGGP	
(アルファ-ベータ、ブレアルファ-ベータ、交差)	Conjunction'	135	CJ' 2G4	--YGPPOPCPAPEFLGGP	
PreTCR_Design 5_crossed_1	軽鎖	138	WL (C03)-HCJ8 - OBeta (M89 Q, S16C)-C J' 1G	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNVLAWYQOKPGOPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SSGSGSGTDFLTITSSLOAEDVAVYYCTQSHLTRFGGGTKVEIKLEDLKNVFPPEVAVFECEAEIISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGYSTDQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPR NHFRQVQFYGLSENDEWTDQRAKPYTQIVSAEAWGRA	

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2 3】

	重鎖 (より抗体と接続)	137	VH (CD3)-HCJG - CPreAlpha (S11C, N50Q) - CJ' 2G1 - F c	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGFAFTDYYIHVVRRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLSRSEDYAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVSSASGVGGTFFPCLAPPIIM LLVDGKQOMVWVCLVLDVAPGLDSPWFAGSGSALDAFTYGPSPATDGTWNLHLNLSLSEELASW EPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTARTSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMSR TPEVTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR ~~EE~~ MTKNQVSLTCLYKGFPSPDI AVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PreTCR_Design _5_crossed_2	軽鎖	138	VL (CD3)-HCJB - CBeta (N69 Q, S16C)-C J' 1G	
	重鎖 (よりPreTCRと接 続)	138	VH (CD3)-HCJD - CPreAlpha (S11) -CJ' 2 G1 - Fc Conju nction	QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGFAFTDYYIHVVRRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLSRSEDYAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVSSPTGVGGTFFPCLAPPIIM LLVDGKQOMVWVCLVLDVAPGLDSPWFAGSGSALDAFTYGPSPATDGTWNLHLNLSLSEELASW EPLVCHTGPAGHRSRSTQPMHLSGEASTARTSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMSR TPEVTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR ~~EE~~ MTKNQVSLTCLYKGFPSPDI AVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PreTCR_Design _6_crossed_1	軽鎖	139	VL (CD3)-LCJC - CBeta (A18 C, N69Q)	DI VMTQSPSLAVSLGERATINCKSSGSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCTQSHLRTFGGGLKVEIKLEDLKNVFPPEVAVFEPSECEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAITFWQMPR NHFRGVQVFYGLSENDEWTDRAKPYTQIVSNAEWGRA
PreTCR_Design _6_crossed_2	重鎖 (より抗体と接続)	137		
	軽鎖	139		
	重鎖 (よりTCRと接続)	138		
Conjunction' (アルファ-ベ ータ、交差、IgG 1)	IgG1	140	CJ' 2G1	SDKTHTCPPCPAPEAAGGP
Conjunction' (アルファ-ベ ータ、交差、IgG 4)	IgG4	141	CJ' 2G4	YGPPCFPCPAPEFLGGP
抗-CD3抗体VH		300		QVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGFAFTDYYIHVVRRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNEFKGRV TI TADKSTSTAYMELSSLSRSEDYAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTV
抗-CD3抗体VL		301		DI VMTQSPSLAVSLGERATINCKSSGSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCTQSHLRTFGGGLKVEI

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2 4】

F _c (G1)		302		SVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTRPEEQVNSTYRVVSVL TVLHQQWLNKGKEYCKYSNKA LPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
F _c (G4)		303		SVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTRPEEQVNSTYRVVSVL TVLHQQWLNKGKEYCKYSNKG LPSSEIKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLS LSLGK

10

20

30

40

【実施例】
【0 4 1 2】
（実施例 1：抗体及び T C R キメラタンパク質のデザイン及び操作）
（T C R 配列）
【0 4 1 3】

T C R は、2 本鎖で作製されたヘテロ二量体タンパク質である。約 9 5 % のヒト T 細胞は、アルファ鎖及びベータ鎖からなる T C R を有するのに対し、残りの 5 % は、ガンマ鎖及びデルタ鎖で構成される T C R を有する。ヒトアルファ鎖の定常領域は、1 つの遺伝子 T R A C のみを有する。ヒトベータ鎖の定常領域は、2 つのサブクラス、遺伝子 T R B C

50

1 及び T R B C 2 を有する。タンパク質データベース (P D B) において、T R B C 1 の結晶構造の数は、T R B C 2 のものよりも比較的多く、そのため T R B C 1 配列を、本明細書に開示されたポリペプチド複合体 (“ W u X i B o d y ”) をデザインするための主要骨格として選択した。T R B C 1 の典型的アミノ酸配列は、P D B 構造 4 L 4 T で認めることができる。

【 0 4 1 4 】

(T C R の鎖間ジスルフィド結合)

【 0 4 1 5 】

T C R 結晶構造を用い、本発明者らの W u X i B o d y デザインを導いた。T 細胞表面の膜上にアンカーされた天然型 T C R とは異なり、可溶性 T C R 分子は、安定性は低いが、その 3 D 構造は抗体 F a b に非常に類似している。実際のところ、使用される可溶性条件での T C R の不安定性は、その結晶構造の解明を妨げる大きい障害である (Wang、2014、前掲)。本発明者らは、C y s 変異の対を T C R 定常領域に導入する戦略を採用し、且つこれが鎖集成を著しく改善し及び発現を増強することができることを認めた。

【 0 4 1 6 】

鎖間ジスルフィド結合の抗体発現に対する作用

【 0 4 1 7 】

ジスルフィド結合が、W u X i B o d y 構造の維持において役割を果たすかどうかを決定するために、本キメラ抗体の T C R 定常領域内にジスルフィド結合を持つ及び／又は持たない構築体を、発現させた。発現された W u X i B o d y の S D S - P A G E 結果を、図 1 5 - 1 7 に示した。全ての発現された W u X i B o d y は、2 つの同一アームを伴う、全 I g G - 様構築体であった。C B e t a の S 5 6 と C A l p h a の T 4 9 の間にシステイン変異を持つ及び持たない構築体の発現、C B e t a の S 1 6 又は A 1 8 と C P r e - A l p h a の S 1 1 の間、C G a m m a の Q 5 7 と C D e l t a の V 5 0 の間、及び C G a m m a の A 1 9 と C D e l t a の E 8 8 の間にシステイン変異を持つ構築体の発現を、試験した。

【 0 4 1 8 】

C B e t a / C A l p h a にジスルフィド結合が存在しない構築体 (配列番号：3 2 / 4 2) 発現の結果は、ジスルフィド結合が存在しない構築体は、抗体構造を維持することができないことを示している (図 1 5 B 参照)。C B e t a / C P r e - A l p h a 及び C G a m m a / C D e l t a にジスルフィド結合が存在しない構築体の発現もまた試験し、且つ同様の結果を示している。対照的に、変異されたシステイン残基を含む構築体は、鎖間ジスルフィド結合を形成することができ、これは、I g - 様構造を維持することが可能であった (図 1 5 A 参照)。

【 0 4 1 9 】

W u X i b o d y のキメラドメインのデザイン

【 0 4 2 0 】

T C R 定常領域のシステイン対変異 (図 1 9 A - 1 9 E の配列に準拠した番号付け) を、T C R キメラ抗体の異なる構築体デザインに導入し、これを表 2 1 に示した。

【 0 4 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 1 : 鎖間ジスルフィド結合導入のための対形成した C y s 変異

アルファ- ベータ	ブレアルファ-ベータ		デルタ-ガンマ	
Cys対変異	Cys対変異	対応するタンパク質名 配列番号: HC/LC中	Cys対変異	対応するタンパク質名 配列番号: HC/LC中
Y11-S16	S11-S16	Design_5_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys13 配列番号: 70/71	F12-S17	Design_2_Cys2_no_Glyco 配列番号: 96/95
L13-F13	S11-A18	Design_6_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys14 配列番号: 72/71	F12-E20	Design_2_Cys3_no_Glyco 配列番号: 99/95
L13-S16	S11-E19	Design_7_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys15 配列番号: 73/71	M14-F14	Design_2_Cys1_no_Glyco 配列番号: 98/97
S16-V12	A13-F13	Design_3_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys11 配列番号: 69/68	N16-T12	Design_2_hypeCys1_no_Glyco 配列番号: 90/89
S16-E14	A13-S16	Design_4_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys12 配列番号: 70/68	D46-M62	Design_2_hypeCys3_no_Glyco 配列番号: 94/93
V23-F13	I16-A11	Design_10_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys4 配列番号: 78/77	V50-Q57	Design_2_hypeCys2_no_Glyco 配列番号: 92/91
Y44-L62	S62-S56	Design_8_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys1_4L4T_1 配列番号: 75/74	F87-A19	Design_2_Cys4_no_Glyco 配列番号: 101/100
T46-D58	T65-S56	Design_9_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys2_4L4T_2 配列番号: 75/76	E88-A19	Design_2_Cys5_no_Glyco 配列番号: 101/102
T46-S76	Y58-S76	Design_2_Pre_TCR_Conjunction' 1_ Cys10 配列番号: 67/66		
T49-S56				
L51-S56				
S62-S56				
S62-R78				

【0 4 2 2】

T C Rアルファ-ベータ定常領域中の対形成した C y s 変異に関して、T 4 9 C - S 5 6 C ジスルフィド結合を、全てのデザインに使用した。

【0 4 2 3】

抗体可変ドメイン及び T C R 定常ドメインを結びつける接続、それらの相対融合配向(fusion orientation)、並びに F c を結びつける接続は全て慎重に微調整し、安定し且つ機能的な W u X i B o d y を作製した。T C R 構造は抗体 F a b に非常に類似しているので、本発明者らは、抗体 F v ホモロジーモデルを T C R 可変領域上に重ねた (P D B 4 L 4 T、図 2 B)。重ねた構造は、抗体 F v は、T C R 定常ドメインと構造的に同等であることを指摘している。この構造整列化及び対応する配列を基に、全ての関連した操作パラメータを、以下に例示したように設計した。

【0 4 2 4】

(ドメイン配向)

【0 4 2 5】

V H - C B e t a / V L - C A l p h a 及び交差した(crossed) V H - C A l p h a / V L - C B e t a の両方の融合配向は、キメラタンパク質を正確に集成することができるので、本発明者らは、両方の配向を設計し且つ試験した。V H - V L の配列相同性は、T C R V B e t a - V A l p h a に近い。本発明者らは、V H - C B e t a / V L - C A l p h a 式を「正常配向(normal orientation)」と、及び V H - C A l p h a / V L - C B e t a を「交差配向(crossed orientation)」と命名した。

【0426】

(第一及び第二の接続ドメイン)

【0427】

本発明者らは、構造整列化を基に抗体及びTCRの配列を整列させ、且つ生殖系列配列に規定された接続は、その構造上に表示するものと常には一致しないことを認めた。例えば、配列規定から、VHとCH1を結びつける接続は、VH領域中の最後の2個「SS」残基の後ろの右側から始まるはずである。しかし構造的に、これらの2個の残基は、既に接続の一部である。本発明者らは、自分たちの接続を、配列よりもむしろ構造を基に規定した。

【0428】

本開示の表1及び表2は、2つの試験した配向に関する構造ベースの配列整列化を示した。どのドメインがどの接続ドメインと適合可能であるかを予測することは課題が多いので、本発明者らは、どのように抗体及びTCR接続が重ねた構造上で重複されたかをチェックし、且つ一つずつ使用し可能性のある配置を推定した。この接続ドメインのデザインは、表1及び表2に列挙している。

【0429】

(第三の接続ドメイン)

【0430】

先に説明したものと同様の戦略を使用し、ヒトIgG1及びIgG4ヒンジを、TCR膜近位領域（すなわちTCRヒンジ）と整列させ、且つ構造レベルでのそれらの重複を更にチェックした。本開示の表7及び表8は、第三の接続ドメインのデザインを列挙している。

【0431】

(FGループ及びDEループ)

【0432】

TCR定常領域構造の抗体構造との整列は、TCRベータ鎖のFGループ及びDEループは、抗体CH1中の対応する領域よりも長いことを明らかにした。図3A-3Bは、T細胞ベータ鎖と抗体重鎖の間の定常領域の差異を示している。CH1がTCRベータにより置き換えられた場合に、どのようにこれら2つのループがその構造を混乱させるかを試験するために、これら2つのループを持つ及び持たない構築体を設計した。

【0433】

先に言及した考察により、表22及び表23に列挙したように、合計9種の構築体を、これらのパラメータの組合せにより設計した。

【0434】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 2 : WuXiBody のキメラタンパク質 (CBeta/CAIpha) のデザイン

配列番号: (重鎖(HC)/軽鎖(LC))-IgG1	配向	接続	接続'	FGループ	DEループ
Design_1 配列番号: 2/1	正常	Conjunction_1	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
Design_2 配列番号: 4/3	正常	Conjunction_2	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
Design_3 配列番号: 9/8	交差	Conjunction_3	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
Design_4 配列番号: 10/8	交差	Conjunction_4	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
Design_5 配列番号: 5/1	正常	Conjunction_1	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	置換え	未変性
Design_6 配列番号: 6/3	正常	Conjunction_2	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	置換え	未変性
Design_6a 配列番号: 7/3	正常	Conjunction_2	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	置換え	置換え
Design_7 配列番号: 9/11	交差	Conjunction_3	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	置換え	未変性
Design_8 配列番号: 10/11	交差	Conjunction_4	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	置換え	未変性

【 0 4 3 5】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 3 : W u X i B o d y のキメラタンパク質 (C B e t a / C A l p h a) の構成成分及び配列

複合体名及び鎖配列番号:	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号				
	抗体重鎖可変ドメイン (VH又はVL)	第一又は第二の接続ドメイン(CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン+ヒンジ(CJ')	二量体形成ドメイン(D)
Design_1 HC	VH(CD3)	HCJ1	Cbeta(S58C)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 2	配列番号: 300	配列番号: 49	配列番号: 33	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_1 LC	VL(CD3)	LCJ1	CAlpha(T49C)		
配列番号: 1	配列番号: 301	配列番号: 51	配列番号: 43		
Design_2 HC	VH(CD3)	HCJ2	Cbeta(S58C)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 4	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 33	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2 LC	VL(CD3)	LCJ2	CAlpha(T49C)		
配列番号: 3	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 43		
Design_3 HC	VH(CD3)	HCJ3	CAlpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 9	配列番号: 300	配列番号: 129	配列番号: 43	配列番号: 134	配列番号: 302
Design_3 LC	VL(CD3)	LCJ3	Cbeta(S58C)		
配列番号: 8	配列番号: 301	配列番号: 308	配列番号: 33 + N0:306		
Design_4 HC	VH(CD3)	HCJ4	CAlpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 10	配列番号: 300	配列番号: 130	配列番号: 43	配列番号: 134	配列番号: 302
Design_4 LC	VL(CD3)	LCJ3	Cbeta(S58C)		
配列番号: 8	配列番号: 301	配列番号: 308	配列番号: 33 + N0:306		
Design_5 HC	VH(CD3)	HCJ1	Cbeta(S58C) (FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 5	配列番号: 300	配列番号: 49	配列番号: 37	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_5 LC	VL(CD3)	LCJ1	CAlpha(T49C)		
配列番号: 1	配列番号: 301	配列番号: 51	配列番号: 43		
Design_6 HC	VH(CD3)	HCJ1	Cbeta(S58C) (FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 6	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 37	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_6 LC	VL(CD3)	LCJ2	CAlpha(T49C)		
配列番号: 3	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 43		
Design_6a HC	VH(CD3)	HCJ2	Cbeta(S58C) (DE-FG-)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 7	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 41	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_6a LC	VL(CD3)	LCJ2	CAlpha(T49C)		
配列番号: 3	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 43		
Design_7 HC	VH(CD3)	HCJ3	CAlpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 9	配列番号: 300	配列番号: 129	配列番号: 43	配列番号: 134	配列番号: 302
Design_7 LC	VL(CD3)	LCJ3	Cbeta(S58C) (FG-)		
配列番号: 11	配列番号: 301	配列番号: 308	配列番号: 37 + N0:306		
Design_8 HC	VH(CD3)	HCJ4	CAlpha(T49C)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 10	配列番号: 300	配列番号: 130	配列番号: 43	配列番号: 134	配列番号: 302
Design_8 LC	VL(CD3)	LCJ3	Cbeta(S58C) (FG-)		
配列番号: 11	配列番号: 301	配列番号: 308	配列番号: 37 + N0:306		

【0 4 3 6】

(実施例 2 : 単一特異性 T C R / 抗体キメラの作製及び特徴決定)

T C R 定常ドメインを二重特異性抗体構築体へ融合する前に、定型的単一特異性 I g G へのそれらの導入の実行可能性を、最初に評価した。T 3 と称する、研究室内で開発した抗-CD 3 抗体を選択し、この概念実証 (P O C) 試験を実行した。T 3 I g G の定常ドメイン C H 1 及び C L を、対応する T C R 定常領域 (C A l p h a 及び C B e t a) により置き換えた。表 2 2 に列挙した 9 種の異なる戦略全て (前記参照) を適用し、全ての構築体を E x p i 2 9 3 システムにおいて発現した。

【0 4 3 7】

表 2 4 は、Q - E L I S A により定量した収集した上清中の設計したタンパク質の発現レベルを列挙した。概して、ほとんどの「正常配向」デザインは、「交差配向」フォーマットよりもよりよい発現を有し、且つほとんどの「T C R 接続」は、「抗体接続」よりもより良い。「正常配向」の 2 つの構築体、D e s i g n _ 5 及び D e s i g n - 6 は、D

e s i g n__2と同等の発現を有した。「交差配向」の2つの構築体について、D e s i g n__7、8は、D e s i g n__3、4よりもより良い発現を有した。T C R C B e t a内の必要以上に長い(extra-long) F Gループの低い発現が認められ、これは、このF Gループは、融合した抗体V Lドメインと著しい立体的クラッシュを引き起こし得ることを示唆している。

【0438】

【表26】

表24：上清中の全てのデザインの発現レベル及びC D 3結合

試料(IgG1)	上清中発現 レベル (ug/mL)	FACSにおける濃度(nM)		
		5.0	0.4	0.032
		MFI		
T3	N/A	5101	2937	408
Design_1	72.04	5441	2190	292
Design_2	204.42	5833	2616	380
Design_3	15.35	5089	982	137
Design_4	26.11	5438	1213	168
Design_5	113.68	5388	1865	249
Design_6	178.56	5789	3914	613
Design_6a	173.60	5794	2822	405
Design_7	75.69	6322	1929	259
Design_8	98.63	6412	1831	243

【0439】

これらの結果は、Wuらが彼等の類似の抗体-T C Rキメラデザインで観察したもの(Wuら、2015、前掲)とは完全に異なり：彼等の「交差配向」デザインは、低い発現を有した。彼等の「正常配向」デザインは、発現さえしなかった。

【0440】

発現されたタンパク質が、正確なフォールディングを有し、且つ当初の機能を保持しているかどうかを確認するために、本発明者らは、C D 3陽性J u r k a t細胞上でのそれらの結合を試験した。全ての試料のF A C S結合は、3種の異なる濃度で行った：5.0、0.4及び0.032nm。当初の野生型抗体T3を、陽性対照として使用した。用量依存的C D 3結合データは、表24の3-5列に列挙している。D e s i g n__2、D e s i g n__6及びD e s i g n__6aは、天然型抗体T3と同等の、最良の結合能を示した。これら3種全ての構築体が、哺乳動物細胞において、図らずも最良の3種の発現フォーマットであったことは、興味深い。この強力な相関関係は、この発現又は結合のレベルは、同じ分子起源から、すなわち抗体可変ドメインとT C R定常ドメインの間の適合性から生じ、これは、接続ドメイン及び鎖間ジスルフィド結合などの構成成分の慎重なデザインを必要とすることを示唆した。

【0441】

この発現レベル及び結合活性を基に、D e s i g n__2を、先に進める最終フォーマットとして選択した。

【0442】

(実施例3：脱グリコシル化)

抗体上の翻訳後修飾(P T M)のN-グリコシル化部位は、タンパク質の不均一を引き起こし、開発段階での課題となり始めている。従って、T C R定常領域上のN-グリコシル化部位を除去することを試みた。T C R定常領域に認められた合計4つのN-グリコシル化部位が存在する。1つは、C B e t a上(N69、配列番号：244参照)であり、他の3つは、C A l p h a上(N34、N68及びN79、配列番号：241参照)であ

る。本開示の発現データは、これらの部位、特にC A l p h a上の部位は、この分子が哺乳動物細胞で発現された場合に、実際に重度にグリコシル化されたことを示唆した。

【0443】

D e s i g n _ 2上の全てのグリコシル化部位は、4つのA s n残基のG l n又はA l aによる置換により除去した(D e s i g n _ 2-Q Q Q Q又は-A A A Aと称す、表25参照)。この戦略はタンパク質操作において非常に一般的であるが、G l n / A l a変異は、T C R / 抗体キメラタンパク質の発現レベルに影響を及ぼし得ることが報告されている(Wuら、2015、前掲)。このリスクを軽減するために、対応する位置で、P r e - T C R (C A l p h a上のN 6 8 S)及びマカクT C R (C A l p h a上のN 7 9、C B e t a上のN 6 9 E)由来の残基(D e s i g n _ 2-Q S K E及び-A S K Eと称す)も使用した(表25参照)。加えて、C A l p h a上に非定型グリコシル化部位(N 6 1)が存在することも報告された(Wollscheidら、Nature Biotechnology, 27(4), 378-386 (2009)、「N-結合型細胞表面糖タンパク質の質量分析同定及び相対定量」、Wollscheid B., Baush-Fluck D., Henderson C., O' Brien R., Bubel M., Schiess R., Aebersold R., Watts J.D., Nat. Biotechnol. 27:378-386(2009) [PubMed][Europe PMC])。従ってこの残基は、G l nにも変異された(D e s i g n _ 2-Q Q Q Q Qと称す、表25参照)。全ての変異体は、更なる試験のためにE x p i 2 9 3において発現した。

【0444】

【表27】

表25：上清中の全ての脱グリコシル化デザインの発現レベル

試料	上清中発現レベル(ug/mL)	配列番号： (HC-CBeta/LC-CAlpha)
D e s i g n _ 2-Q Q Q Q	334.39	13/12 (IgG1) 21/12(IgG4)
D e s i g n _ 2-A A A A	414.58	15/14 (IgG1)
D e s i g n _ 2-Q S K E	311.48	17/18 (IgG1)
D e s i g n _ 2-A S K E	107.89	17/18 (IgG1)
D e s i g n _ 2-Q Q Q Q Q	213.31	20/19 (IgG1)

【0445】

【表 2 8】

表 2 6 : 脱グリコシル化デザインの構成成分

複合体名及び鎖配列番号:	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号				
	抗体重鎖可変ドメイン (VH又はVL)	第一又は第二の接続ドメイン(CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン + ヒンジ(CJ')	二量体形成ドメイン(D)
Design_2-QQQQ (IgG1) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 13	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 34	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2-QQQQ (IgG1) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68Q+ N79Q)		
配列番号: 12	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 44		
Design_2-QQQQ (IgG4) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G4	FcG4
配列番号: 21	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 34	配列番号: 54	配列番号: 303
Design_2-QQQQ (IgG4) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68Q+ N79Q)		
配列番号: 12	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 44		
Design_2-AAAA (IgG1) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69A)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 15	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 35	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2-AAAA (IgG1) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34A+N68A+ N79A)		
配列番号: 14	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 45		
Design_2-QSKE (IgG1) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 17	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 36	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2-QSKE (IgG1) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68S+ N79K)		
配列番号: 16	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 46		
Design_2-ASKE (IgG1) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 17	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 36	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2-ASKE (IgG1) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34A+N68S+ N79K)		
配列番号: 18	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 47		
Design_2-QQQQ Q (IgG1) HC	VH(CD3)	HCJ2	CBeta(S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 20	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 34	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_2-QQQQ Q (IgG1) LC	VL(CD3)	LCJ2	CAIpha(T49C) (N34Q+N68Q+ N79Q+ N61Q)		
配列番号: 19	配列番号: 301	配列番号: 52	配列番号: 48		

【0 4 4 6】

上清中の発現量は、表 2 5 において Q - E L I S A により概算した。興味深いことに、本発明者らのただ 1 種の脱グリコシル化デザインは、発現レベルをわずかに減少した。G l n 又は A l a による単純な変異は、非還元ゲルに対し、いかなる負の作用も有さず (図 4)、150kd バンドが認められた。還元ゲル上では (図 4)、25kd バンドが認められた。両方は、軽鎖及び重鎖上のグリコシル化の除去が成功したことを指摘している。TCR 定常領域上の N - グリカンの除去による変異タンパク質は、CD3 - 結合について試験した。図 5 は、CD3 + J u r k a t 細胞への異なる変異タンパク質結合を示した。変異タンパク質の曲線は、野生型抗体 T 3 と比べ右側へわずかにのみシフトし、これはキメラよりも、ヒト I g G に対しより感受性のある抗体の検出に起因している。最大結合に変化はなかった。一般的に、ほとんどの脱グリコシル化デザインは、発現又は結合のいずれかにおいて明確な差異を示さなかった。D e s i g n _ 2 - Q Q Q Q を、更なる試験のためのデザインとして選択した。

【0447】

Wuらにより実行された類似の試験において(Wuら、2015、前掲)、彼等は、彼等の「正常配向」フォーマットは発現しなかったので、彼等の「交差配向」フォーマットに対し脱グリコシル化変異を行った。

【0448】

(実施例4：TCRプレアルファ／ベータベースのWuXiBodyのデザイン)

未熟胸腺細胞により発現されたプレ-T細胞抗原受容体(pre-TCR)は、初期T細胞発達において中心的役割を有する。プレ-TCRは、定型的ベータ鎖を有するが、その配列及び構造は定型的アルファ鎖のものとは全く異なる利用可能な定常領域のみ伴う特別なプレアルファ鎖は有さない。定型的TCRの定常領域は、抗体可変領域と適合可能であるので、プレ-TCR(PDB 3OF6、配列番号：246参照)も、キメラタンパク質のデザインを助けると期待された。抗体デザインは、表27に示した。

【0449】

【表29】

表27：WuXiBodyに関するTCRプレアルファ／ベータベースのキメラのデザイン

	配向	接続	接続'	FGループ	DEループ
PreTCR_Design_A	正常	Conjunction_A	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
PreTCR_Design_B	正常	Conjunction_B	Conjunction' _1 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
PreTCR_Design_C	交差	Conjunction_C	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性
PreTCR_Design_D	交差	Conjunction_D	Conjunction' _2 (IgG1, IgG4)	未変性	未変性

【0450】

表28に列挙したように、合計10種のキメラ構築体を、これらのパラメータの組合せにより、設計した。

【0451】

【表30】

表28：IgG1型のキメラのプレ-TCR-抗体キメラのデザインの対応

表27のデザイン	配列ファイル	配列番号： (HC/LC)
PreTCR_Design_B	Design_1_Pre_TCR_Conjunction' _1	65/64
	Design_2_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys10	67/66
	Design_3_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys11	69/68
	Design_4_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys12	70/68
	Design_5_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys13	70/71
	Design_6_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys14	72/71
	Design_7_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys15	73/71
	Design_8_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys1_4L4T_1	75/74
	Design_9_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys2_4L4T_2	75/76
	Design_10_Pre_TCR_Conjunction' _1_Cys4	78/77
PreTCR_Design_C	PreTCR_Design_5_crossed_1	137/136
	PreTCR_Design_6_crossed_1	137/139
PreTCR_Design_D	PreTCR_Design_5_crossed_2	138/136
	PreTCR_Design_6_crossed_2	138/139

【0452】

【表 3 1 - 1】

表 2 9 : I g G 1 型のキメラのプレ-T C R - 抗体キメラのデザインの構成成分

複合体名及び鎖配列番号:	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号				
	抗体重鎖可変ドメイン (VH又はVL)	第一又は第二の接続ドメイン (CJ)	TCR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン + ヒンジ (CJ')	二量体形成ドメイン(D)
Design_1_Pre_TCR_Conjunction'_1_HC 配列番号: 85	VH(CD3)	HCJB	CBeta(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_1_Pre_TCR_Conjunction'_1_LC 配列番号: 84	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(N50Q)		
Design_2_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys10_HC 配列番号: 87	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(S76C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_2_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys10_LC 配列番号: 86	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(Y59C)(N50Q)		
Design_3_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys11_HC 配列番号: 89	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(F13C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_3_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys11_LC 配列番号: 88	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(A13C)(N50Q)		
Design_4_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys12_HC 配列番号: 70	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(S16C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_4_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys12_LC 配列番号: 68	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(A13C)(N50Q)		
Design_5_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys13_HC 配列番号: 70	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(S16C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_5_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys13_LC 配列番号: 71	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(S11C)(N50Q)		
Design_6_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys14_HC 配列番号: 72	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(A18C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
Design_6_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys14_LC 配列番号: 71	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha(S11C)(N50Q)		
Design_7_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys15_HC 配列番号: 73	VH(CD3)	HCJB	Cbeta(E19C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2】

Design_7_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys15 LC	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha (S11C) (N50Q)		
配列番号: 71	配列番号: 301	配列番号: 309	配列番号: 313		
Design_8_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys1_4L4T_1 HC	VH(CD3)	HCJB	Cbeta (S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 75	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 34	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_8_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys1_4L4T_1 LC	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha (S62C) (N50Q)		
配列番号: 74	配列番号: 301	配列番号: 309	配列番号: 314		
Design_9_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys2_4L4T_2 HC	VH(CD3)	HCJB	Cbeta (S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 75	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 34	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_9_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys2_4L4T_2 LC	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha (T85C) (N50Q)		
配列番号: 76	配列番号: 301	配列番号: 309	配列番号: 315		
Design_10_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys4 HC	VH(CD3)	HCJB	Cbeta (A11C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
配列番号: 78	配列番号: 300	配列番号: 50	配列番号: 324	配列番号: 53	配列番号: 302
Design_10_Pre_TCR_Conjunction'_1_Cys4 LC	VL(CD3)	LCJB	CPreAlpha (I16C) (N50Q)		
配列番号: 77	配列番号: 301	配列番号: 309	配列番号: 316		
PreTCR_Design_5_crossed_1 HC	VH(CD3)	HCJC	CPreAlpha (S11C) (N50Q)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 137	配列番号: 300	配列番号: 132	配列番号: 313	配列番号: 134	配列番号: 302
PreTCR_Design_5_crossed_1 LC	VL(CD3)	LCJC	Cbeta (N69Q, S16C)		
配列番号: 136	配列番号: 301	配列番号: 50	配列番号: 321+ 306		
PreTCR_Design_6_crossed_1 HC	VH(CD3)	HCJC	CPreAlpha (S11C) (N50Q)	CJ'2G4	FcG4
配列番号: 137	配列番号: 300	配列番号: 132	配列番号: 313	配列番号: 134	配列番号: 303
PreTCR_Design_6_crossed_1 LC	VL(CD3)	LCJC	Cbeta (N69Q, A18C)		
配列番号: 139	配列番号: 301	配列番号: 50	配列番号: 322+ 306		
PreTCR_Design_5_crossed_2 HC	VH(CD3)	HCJD	CPreAlpha (S11C) (N50Q)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 138	配列番号: 300	配列番号: 133	配列番号: 313	配列番号: 134	配列番号: 302
PreTCR_Design_5_crossed_2 LC	VL(CD3)	LCJC	Cbeta (N69Q, S16C)		
配列番号: 136	配列番号: 301	配列番号: 50	配列番号: N0:321+ 306		
PreTCR_Design_6_crossed_2 HC	VH(CD3)	HCJD	CPreAlpha (S11C) (N50Q)	CJ'2G1	FcG1
配列番号: 138	配列番号: 300	配列番号: 133	配列番号: 313	配列番号: 134	配列番号: 302
PreTCR_Design_6_crossed_2 LC	VL(CD3)	LCJC	Cbeta (N69Q, A18C)		
配列番号: 139	配列番号: 301	配列番号: 50	配列番号: 322+306		

【0 4 5 3】

実施例 1 - 3 において学んだ経験は、「正常配向」及びより多くの T C R 残基を伴う接続ドメインは、良好なキメラタンパク質の作製により適していることを示唆した。従って同じ戦略を採用し、表 3 及び表 4 に示したような軽鎖及び重鎖接続ドメインを設計した。定型的アルファ鎖とは異なり、T C R プレーアルファ鎖内にはただ 1 つのグリコシル化部位 (N 5 0) が存在し、これは G l n 残基へ変異された (配列番号: 2 4 7 参照)。ベータ定常領域を持つ重鎖全体は、表 2 2 の D e s i g n _ 2 のそれと同じであり、G l n 残基へ置換された N - グリコシル化部位 (N 6 9) を伴う (配列番号: 2 4 4 参照)。

【0 4 5 4】

10

20

30

40

50

正常配向での第三の接続ドメインは、表 7 におけるものと同一に設計され、且つ交差配向での第三の接続ドメインは、表 8 におけるものと同一に設計された（TCR アルファ／ベータベースのキメラ抗体）。

【0455】

プレTCRは、第三の接続ドメイン上に、天然型鎖間ジスルフィド結合を有さなかった。定型的TCRについて行った操作作業と同様に、本発明者らは論理的に、このキメラタンパク質の安定性を向上するために、定常領域内のベータ及びプレアルファ境界面で、ジスルフィド結合を導入した（表 11 参照）。プレTCR結晶構造（PDB 3OF6）上の全ての境界面残基を検証し、そのCAlpha及びCBeta炭素原子が、それぞれ、7 Å及び5 Å以内である鎖間対のリストを得た（表 11 参照）。定義した各対は、次にCys残基へ置換し、この変異タンパク質を、Exp i 293細胞において発現した。

【0456】

（実施例 5：TCR ガンマ／デルタベースのキメラ抗体のデザイン）

ガンマ鎖及びデルタ鎖で作製されたTCRは余り一般的ではないが、このタンパク質のヘテロ二量体の性質も同じく、新規キメラフォーマットのデザインを助けることができる。実施例 1 において検証した同じ戦略及び手順に従い、本発明者らは、デルターガンマTCRの定常領域を、抗体の対応する領域と置き換えるために使用し、新規キメラを設計した。抗体とTCRの間の構造がガイドした配列整列を促進するために、デルターガンマTCRの構造（PDB 4LFH、配列番号：249及び252参照）を使用した。

【0457】

表 5 及び表 6 は、各々、「正常配向」及び「交差配向」に関して設計された接続ドメインを列挙した。異なる配向の対応するIgG1及びIgG4接続ドメインを、表 9 及び表 10 に示した。デルターガンマTCRの構造は、アルファベータTCRよりもむしろ、抗体により類似している。追加のFG及びDEループのデザインは、行わなかった。N-グリコシル化部位（ガンマ上のN65、並びにデルタ上のN16及びN79、配列番号：250参照）は、全てGln（Q）置換により除去した。接触境界面ジスルフィド結合は、実施例 4 において導入された同じ戦略を基に設計した。

【0458】

【表 3 2】

表 3 0：キメラTCR／抗体のデザイン

	配向	第一及び第二の接続ドメイン	第三の接続ドメイン	FGループ	DEループ
dg_Design_1	正常	Conjunction_4	Conjunction' _3 (IgG1, IgG4)	天然	天然
dg_Design_2	正常	Conjunction_5	Conjunction' _3 (IgG1, IgG4)	天然	天然
dg_Design_3	交差	Conjunction_6	Conjunction' _4 (IgG1, IgG4)	天然	天然
dg_Design_4	交差	Conjunction_7	Conjunction' _4 (IgG1, IgG4)	天然	天然

【0459】

表 3 1 に列挙したように、合計 13 種のキメラ構築体を、これらのパラメータの組合せにより設計した。

【0460】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 1 : C G a m m a / C D e l t a に関するキメラ T C R / 抗体のデザインの対応

I g G1 の表 30 におけるデザイン	デザインの構築体	配列番号 (H C / L C)
dg_Design_1	dg_Design_1	108/107
dg_Design_2	dg_Design_2	106/105
	dg_Design_2_no_Glyco	86/85
	dg_Design_2_hypeCys1_no_Glyco	90/89
	dg_Design_2_hypeCys2_no_Glyco	92/91
	dg_Design_2_hypeCys3_no_Glyco	94/93
	dg_Design_2_Cys2_no_Glyco	96/95
	dg_Design_2_Cys1_no_Glyco	98/97
	dg_Design_2_Cys3_no_Glyco	99/95
	dg_Design_2_Cys4_no_Glyco	101/100
	dg_Design_2_Cys5_no_Glyco	101/102
dg_Design_3	dg_crossed_Design_1	110/109
dg_Design_4	dg_crossed_Deisgn_2	112/111

【 0 4 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1】

表 3 2 : C G a m m a / C D e l t a に関するキメラ T C R / 抗体のデザインの構成成分

複合体名及び鎖配列番号:	N-末端からC-末端へのドメイン、及びそれらの配列番号				
	抗体重鎖可変ドメイン (VH又はVL)	第一又は第二の接続ドメイン (CJ)	TOR定常ドメイン (C1又はC2)	第三の接続ドメイン + ヒンジ (CJ')	二量体形成ドメイン (D)
dg_Design_1_HC 配列番号: 108	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ4 配列番号: 117	CGamma 配列番号: 113	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_1_LC 配列番号: 107	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ4 配列番号: 119	CDelta 配列番号: 310		
dg_Design_2_HC 配列番号: 106	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma 配列番号: 113	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_LC 配列番号: 105	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta 配列番号: 115		
dg_Design_2_no_Glyco_HC 配列番号: 88	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(N85Q) 配列番号: 114	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_no_Glyco_LC 配列番号: 85	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(N16Q+N79Q) 配列番号: 116		
dg_Design_2_hyp_eCys1_no_Glyco_HC 配列番号: 90	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(T12C) (N85Q) 配列番号: 333	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_hyp_eCys1_no_Glyco_LC 配列番号: 89	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(N16C) (N79Q) 配列番号: 325		
dg_Design_2_hyp_eCys2_no_Glyco_HC 配列番号: 92	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(Q57C) (N85Q) 配列番号: 334	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_hyp_eCys2_no_Glyco_LC 配列番号: 91	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(V50C) (N16Q + N79Q) 配列番号: 326		
dg_Design_2_hyp_eCys3_no_Glyco_HC 配列番号: 94	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(M82C) (N85Q) 配列番号: 335	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_hyp_eCys3_no_Glyco_LC 配列番号: 93	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(D46C) (N16Q + N79Q) 配列番号: 327		
dg_Design_2_Cys2_no_Glyco_HC 配列番号: 96	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(S17C) (N85Q) 配列番号: 336	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_Cys2_no_Glyco_LC 配列番号: 95	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(F12C) (N16Q + N79Q) 配列番号: 328		
dg_Design_2_Cys1_no_Glyco_HC 配列番号: 98	VH(CD3) 配列番号: 300	HCJ5 配列番号: 118	CGamma(F14C) (N85Q) 配列番号: 337	CJ'3G1 配列番号: 121	FcG1 配列番号: 302
dg_Design_2_Cys1_no_Glyco_LC 配列番号: 97	VL(CD3) 配列番号: 301	LCJ5 配列番号: 120	CDelta(M14C) (N16Q + N79Q) 配列番号: 329		

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2】

dg_Design_2_Cys 3_no_Glyco HC	VH(CD3)	HCJ5	CGamma(E20C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号: 99	配列番号: 300	配列番号: 118	配列番号: 338	配列番号: 121	配列番号: 302
dg_Design_2_Cys 3_no_Glyco LC	VL(CD3)	LCJ5	CDelta(F12C) (N16Q + N79Q)		
配列番号: 95	配列番号: 301	配列番号: 120	配列番号: 328		
dg_Design_2_Cys 4_no_Glyco HC	VH(CD3)	HCJ5	CGamma(A19C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号: 101	配列番号: 300	配列番号: 118	配列番号: 338	配列番号: 121	配列番号: 302
dg_Design_2_Cys 4_no_Glyco LC	VL(CD3)	LCJ5	CDelta(F87C) (N16Q + N79Q)		
配列番号: 100	配列番号: 301	配列番号: 120	配列番号: 330		
dg_Design_2_Cys 5_no_Glyco HC	VH(CD3)	HCJ5	CGamma(A19C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
配列番号: 101	配列番号: 300	配列番号: 118	配列番号: 338	配列番号: 121	配列番号: 302
dg_Design_2_Cys 5_no_Glyco LC		LCJ5	CDelta(E88C) (N16Q + N79Q)		
配列番号: 102		配列番号: 120	配列番号: 331		
dg_crossed_Desig n_1 HC	VH(CD3)	HCJ6	CDelta	CJ'4G1	FcG1
配列番号: 110	配列番号: 300	配列番号: 123	配列番号: 332	配列番号: 127	配列番号: 302
dg_crossed_Desig n_1 LC	VL(CD3)	LCJ6	CGamma		
配列番号: 109	配列番号: 301	配列番号: 125	配列番号: 340		
dg_crossed_Desig n_2 HC	VH(CD3)	HCJ7	CDelta	CJ'4G1	FcG1
配列番号: 112	配列番号: 300	配列番号: 124	配列番号: 332	配列番号: 127	配列番号: 302
dg_crossed_Desig n_2 LC	VL(CD3)	LCJ7	CGamma		
配列番号: 111	配列番号: 301	配列番号: 126	配列番号: 340		

【0 4 6 2】

(実施例 6 : 抗体重 - 軽鎖誤対形成試験)

I g G 様フォーマットの二重特異性抗体を作製する際の一つの課題は、軽鎖及び重鎖の制御できない誤対形成である。本発明者らは、T C R ベータ及びアルファ置き換えた C H 1 及び C L ドメインは、単独の宿主細胞において同時発現した場合に、正常な I g G 重鎖及び軽鎖と集成することができるかどうかを、評価した。

【0 4 6 3】

抗 - C D 3 抗体 T 3 に加え、本発明者らは、B リンパ球抗原 C D 1 9 を標的化するモノクローナル抗体 U 4 を開発した。2 種の天然抗体の軽鎖及び重鎖が誤対形成され得る見込みがどの程度かをチェックするために、T 3 及び U 4 の軽鎖 - 重鎖対を、意図的にスイッチし (T 3 _ l i g h t - U 4 _ h e a v y 、 T 3 _ h e a v y - U 4 _ l i g h t) 、且つ E x p i 2 9 3 細胞において同時発現した。T C R - 修飾した T 3 を使用する同じ試験をまた、並列比較として実行した。図 6 A - 6 B は、I g G 1 及び I g G 4 の両方におけるタンパク質の S D S - P A G E データを示した。天然型抗体を使用しスイッチされた対に関して、非還元 P A G E における 1 5 0 k d バンド、及び還元 P A G E における 5 0 k d 、 2 3 k d バンドは、誤対形成された I g G タンパク質の集成体を明確に確認した。しかし、T C R - 修飾した T 3 の導入後、1 5 0 k d バンドは、もはやゲルからは認められず、これはいずれの非コグネイト対も、抗体様分子に集成することができないことを指摘している。これらのデータは、本発明者らの設計された T C R - 修飾した F a b は、非認識鎖 (non-cognitive chain) の誤対形成を効果的に防止することができることを確認した。

【0 4 6 4】

(実施例 7 : F a b - T C R キメラの作製及び特徴決定)

T C R - 修飾した抗体 F a b を使用し、二重特異性抗体をデザインすることができるこ

とを確認するために、2つの位置で切断したFab断片を、構築した。図8は、N-グリカン除去によりTCR-修飾したT3 Fabは、巧く発現され、且つ精製されたことを示している（T3-Fab-Design_2.his1（配列番号：30/12）及びT3-Fab-Design_2.his2（配列番号：31/12））。それらのCD3への結合能もまた、CD3⁺Jurkat細胞において評価し、且つ野生型T3の一価型と比較した。図9は、キメラFab及び一価T3は、定性的に類似した結合挙動を有することを示した。これらのずれは、His及びFcタグによるタンパク質検出法における差異から生じ得る。

【0465】

（実施例8：TCRベースのノブイントゥホール二重特異性抗体の作製及び特徴決定）

TCR定常ドメインを単一特異性抗体T3へ巧く融合し、且つ新規フォーマットは、抗体U4との鎖誤対形成効果的に防止することができることを確認した後、本発明者らは、二重特異性フォーマットの構築に進んだ。

【0466】

Fc CH3ドメインで利用した「ノブイントゥホール」変異を持つTCR-修飾したT3及び野生型U4を、Exp1293細胞から同時発現した。「ノブイントゥホール」に関する変異を、IgG1アイソタイプにおいて、T3のCH3ドメイン中のS139C及びT151W（配列番号：295、ノブ）、並びにU4のCH3ドメイン中のY134C、T151S、L153A及びY192V（配列番号：296、ホール）に作製した。あるいはノブイントゥホール変異を、IgG4アイソタイプにおいて、T3のCH3ドメインのS136C及びT148W（配列番号：298、ノブ）、並びにU4のCH3ドメインのY131C、T148S、L150A及びY189V（配列番号：299、ホール）に作製した。図7A-7Bは、精製後にIgG1及びIgG4において作製されたタンパク質のSDS-PAGEデータを示す。第一工程プロテインA精製後の収量は、IgG1及びIgG4に関して、各々、125mg/L及び173.7mg/Lに達した。正確な分子量、すなわち非還元ゲルでのおよそ150kdのバンドに加え、還元ゲルでのおよそ50及び25kdのバンドが、全て明確に観察された。精製した試料を更に、SEC-HPLCにより検証した。IgG1及びIgG4の純度は、98.63%及び100%に達した。このデータは、IgG-様分子、IgG1及びIgG4の両方が、良好に発現され且つ集成されたことを指摘している。これらのTCR-関連した新規二重特異性フォーマットは、「E17-Design_2-QQQQ」と称した（IgG1に関して配列番号：22/12/24/23及びIgG4に関して配列番号：25/12/26/23）。

【0467】

予想された分子量は、設計された二重特異性抗体に関して認められたが、各アームは、それらの個別のコグネイト抗原に対するそれらの当初の結合能を維持したかどうかを検証することは必要であった。各標的に関して、E17-Design_2は、一価の結合体であるので、本発明者らはまた、並列比較を行うために、天然型T3及び天然型U4の一価型を構築した。図10A及び図10Bは、各々、CD3⁺Jurkat細胞及びCD19⁺Ramos細胞に対する設計された二重特異性抗体のFACS結合の結果を示した。TCR-修飾したT3のアームは、野生型T3に比べて中程度の結合喪失を示したが、IgG4は、IgG1よりもより良く、且つ天然型タンパク質に近かった。U4アームの結合は、近傍にある操作されたT3アームにより減少されなかった。これは一価型において、当初のU4抗体に対するものと類似の結合を有した。しかし興味深いことに、今回、IgG1は、IgG4よりもより良く性能を発揮した。アイソタイプが、一価の結合の維持において重要である理由は、明らかではない。TCR定常領域の安定性、第三の接続ドメインデザインの選択、又は2つのFabアーム間の相互作用のような要因は、観察された現象を生じることができる。

【0468】

TCR-修飾した二重特異性フォーマットのCD3及びCD19への一価の結合は、それらの二価の親抗体と比べ、両方共減少された。CD3結合を介したT細胞活性化は、極

10

20

30

40

50

めて敏感であることはわかっている。T細胞への強力な刺激は、副作用を引き起こし得る。従って、比較的弱いCD3-結合は、恐らく許容することができ、安全性の理由についてさえも望ましかった。しかし、弱いCD19-結合は、B細胞死滅に向けられた二重特異性抗体におけるその能力に直接影響を及ぼし、結果的に薬効を減少する。CD19結合の重要性を確認し、且つ本発明者らのキメラデザインの普遍性を試験するために、本発明者らは、IgG4において「F16-Design__2-QQQQ」と称する別の二重特異性構築体を製造し、ここで設計されたT3アームは依然一価であるが、U4アームは二価であった。

【0469】

この新規構築体を、発現させ且つ精製し、その結合実験を、直接行った。図11A-11Bは、先に設計されたE17及び2つの親抗体T3及びU4と比較した、そのFACS結合データを示している。F16-Design__2-QQQQは、CD3-及びCD19-結合の両方を向上した(HC/LC(抗-CD3)/HC/LC(抗-CD19)の順に配列番号:25/12/27/23)ことは、興味深い。そのCD19-結合(配列番号:27/23)は、野生型抗体U4と同等であった。このデータは、本発明者らのT3に対するキメラデザインは、異なる二重特異性フォーマットに適用することができることを確認した。

【0470】

(実施例9:二重特異性抗体-指向性(directed)腫瘍細胞死滅のインビトロアッセイ)

インビトロ機能アッセイを、悪性B細胞のT細胞エンゲージされた死滅における設計された二重特異性フォーマットの活性をチェックするために行った。E17構築体を、最初に試験した。親単一特異性抗体T3及びU4を、陰性対照として使用した。図12は、このE17二重特異性フォーマットの用量依存型の細胞死滅機能を示している。E17-IgG4($EC_{50}=57\text{ pM}$)は、E17-IgG1($EC_{50}=624\text{ pM}$)よりも、より強力であった。この細胞死滅の活性を向上するために、2つのCD19-結合部位を有するF16フォーマットも、E17と比較した。図13に示したように、E17($EC_{50}=17.7\text{ pM}$)と比べ、F16($EC_{50}=5.5\text{ pM}$)の効能は、3倍向上した。このデータは、CD19の結合は、細胞死滅作用に影響を及ぼすことを確認した。無関係のヒトIgG4抗体を、陰性対照として使用した。

【0471】

(実施例10:質量分析特徴決定)

作製された二重特異性抗体は正確な集成体を有したことを確認するために、本発明者らは、分子E17-Design__2-QQQQを質量分析で特徴決定した。2本の重鎖と2本の軽鎖の間の理論的分子量の差異は、各々、およそ4000Da及び500Daである。図14Aは、非還元条件でのタンパク質のスペクトルを示した。148180Daのピークは、正確に集成された二重特異性抗体の予想された分子量であった。Fc領域における「ノブイントゥホール」変異、及び本発明者らのTCR-置換えCH1/CL領域が、所望の4本鎖を適切に対形成するように働いたことを示す他のピークは、観察されなかった。非還元質量スペクトルは、両方の軽鎖が誤対形成されたIgGから、正確に集成された二重特異性抗体の識別を助けることができないことは、注目に値する。しかし実施例4は、誤対形成した重鎖と軽鎖は、発現も集成もされず、これは重鎖及び軽鎖の両方の対の誤対形成の可能性を排除しないことを指摘している。

【0472】

非還元条件において(図14A参照)、149128Daにピークがあり、これは計算した分子量よりもおよそ947Da大きい。質量分析をまた、還元条件でのタンパク質を用いて実行した。図14Bは、VL-CALPHAキメラ軽鎖から948Da離れたピークが存在したことを示し、これは軽鎖上のO-グリカン修飾($GlNAc+Hex+2*NeuAc$)を指摘している。

【0473】

(実施例11:熱安定性試験)

本発明者らは更に、示差走査蛍光測定（DSF）を用い、タンパク質融解温度 T_m を測定することにより、IgG1及びIgG4の両方において、設計された二重特異性抗体の熱安定性を試験し且つ比較した。天然型単一特異性T3及びTCR-修飾したT3（Design_2及びDesign_2-QQQQ）を、対照として使った。

【0474】

表33は、新規構築体の測定した T_{on} 値、 T_m 値を列挙した。全般的に、全ての分子は、妥当な熱安定性を示した。IgG1-様分子は、IgG4-様分子よりも、より安定していた。天然型T3抗体の T_m 値は、74℃であった。TCR抗体キメラタンパク質は、およそ60℃の比較的低い T_m を有し、このことは、TCR C Beta-C Alphaは、正常抗体のCH1-CLと比べ、高温に対する抵抗が少ないことを示唆している。このことは、Wuらの研究(Wuら、2015、前掲)で報告されたものと一致し、且つC Alphaドメインは、C Betaよりも安定性が低いことを示唆した(Toughiriら、mAbs, 862(7月)、1276-1285(2016))。

10

【0475】

TCR定常領域上のN-グリコシル化を除去する変異は、このキメラタンパク質の熱安定性に影響を及ぼさなかった。本発明者らの二重特異性抗体E17-Design_2-QQQQは、Design_2-QQQQのものと同様の T_m 、及び天然T3よりも低い T_m を有した。

【0476】

【表35】

20

表33：示差走査蛍光測定（DSF）により測定した設計されたキメラ及び二重特異性抗体の熱安定性

タンパク質名 HC/LC(抗-CD3)/HC/LC(抗-CD19)	アイソ タイプ	濃度 (ng/ml)	T_{on} (°C)	T_{h1} (T_m) (°C)	T_{h2} (°C)	pI	純度
T3	IgG1	2.7	57	74.2	na	8.31	99.41%
Design_2 (配列番号：4/3/4/3)	IgG1	1.6	46	59.3	na	6.07	93.09%
Design_2-QQQQ (配列番号：13/12/13/12)	IgG1	1.1	45	59.1	na	6.07	99.03%
E17-Design_2-QQQQ (配列番号：22/12/24/23)	IgG1	0.3	49	61.9	76.2	7.29	98.63%
T3	IgG4	1.4	53	65	73.2	8.24	96.06%
Design_2-QQQQ (配列番号：21/12/21/12)	IgG4	0.9	45	58.4	na	5.7	96.05%
E17-Design_2-QQQQ (配列番号：25/12/26/23)	IgG4	0.8	47	60.2	72.7	6.4	100%

30

【0477】

(実施例12：材料及び方法)

(抗体T3 Fvホモロジーモデリング)

【0478】

40

抗体Fv構造モデルは、そのFvアミノ酸配列を基に、ソフトウェアDiscovery Studio o(BIOVIA)を使用し、構築した。軽鎖配列及び重鎖配列の両方を、3つのCDR、並びに各鎖のフレームワークを同定するために、最初にKabat番号付けで注釈した。次に各セグメント（CDR又はフレームワークのいずれか）を、抗体データベースにおいて、PDB中の全ての抗体構造由来の配列で、BLAST検索した。高解像及び低B因子(B factor)を有する場合、最もマッチした配列の構造を使用し、ホモロジーモデルを構築した。次に全てのモデル化されたセグメントを集成し、軽鎖及び重鎖構造モデルを構築した。これら2つのモデル化された鎖間の相対配向を、最も類似している全体の配列を有する抗体構造の角度を測ることにより、推定した。全ての分子可視化及び分析作業は、PyMOLソフトウェア(Schrodinger)を用いて行った。

50

【0479】

(ベクター構築)

【0480】

VL、VH、Ck、CH1遺伝子を、現存する研究室のDNA鋳型から、PCRにより増幅した。CAIpha及びCBeta遺伝子は、Genewiz社により合成した。天然型又はキメラ軽鎖遺伝子は、CMVプロモーター及びカップシグナルペプチドを含む線状ベクターに挿入した。VH-CH1又はVH-CBetaのDNA断片は、ヒトIgG4/IgG1定常領域CH2-CH3を含む線状ベクターに挿入した。このベクターは、CMVプロモーター及びヒト抗体重鎖シグナルペプチドを含む。プラスミドのライゲーション、形質転換、DNA調製は、標準の分子生物学プロトコルを用いて行った。部位特異的変異誘発は、変異原性プライマーを使用するPCR増幅、それに続く鋳型DNAのDpnI消化により実行した。

10

【0481】

(タンパク質発現)

【0482】

重鎖及び軽鎖の構築されたベクターを、Exp293細胞(ThermoFisher Scientific)へ、同時形質移入した。同時形質移入に関する異なるベクターの比は、抗体の予想される構造に従い調節し、且つ最初の発現結果が、SDS-PAGE上に示された。簡単に述べると、プラスミド40µg及びイクスピフェクタミン(expifectamine)108µlを、容積40mlの 1.2×10^8 個細胞を形質移入するのに使用した。エンハンサー1及びエンハンサー2を、形質移入の20時間後に添加した。形質移入した細胞を、120rpmで回転する楕円振盪機において、8%CO₂、37℃で培養した。形質移入の5日後、上清を、遠心分離により収集し、且つ0.22µmフィルタリングにより、細胞断片を除去した。

20

【0483】

(SDS-PAGEによる発現検出)

【0484】

5日目に収集した上清を、NuPAGE LDS試料緩衝液(4×)、NuPAGE試料還元剤(10×)及びH₂Oと混合した。還元した試料を、75℃で加熱し、その後ゲルに装加した。ゲルを、定圧200Vを用いて35分間泳動した。次にゲルを、SimplyBlue(商標)SafeStain(Invitrogen、LC6065)により染色し、5分間マイクロフェーブにかけた。脱色は、水と共にインキュベーションすることにより行い、7分間マイクロウェーブにかけた。ゲルの画像を、Universal HoodIII(Bio-Rad)を用いて撮影した。

30

【0485】

(精製)

【0486】

プロテインAクロマトグラフィー精製

【0487】

MabSelect(商標)SuRe(商標)(MSS)プロテインA樹脂を、GE Healthcareから入手し、ガラスカラム(BioRad)に充填した。プロテインAクロマトグラフィーによる精製は、流量0.2ml/分で動力源として蠕動ポンプを用い、室温で実施した。試料を装加した後、10カラム容積(CV)の100mMグリシン(pH3.5)を、溶出に使用し、異なる画分を収集した。異なる画分中のタンパク質濃度を、NanoDrop(商標)2000(ThermoFisher Scientific)を用いて測定した。このタンパク質純度は、SDS-PAGE及びSEC-HPLCにより検出した。

40

【0488】

イオン交換クロマトグラフィー(IEC)

【0489】

IECクロマトグラフィー実験を、AKTA Pureシステム(GE Healthcare)を備えた、GE Healthcare life sciencesからのHi trap SP HPの1mlカラムを用いて行った。プロ

50

グラムされた方法の設定は、以下であった：10 CVの洗浄緩衝液A（10 mM NaH_2PO_4 、pH 6.0）によるカラム洗浄；試料注入口を使用する試料の適用；カラムの、10 CV洗浄緩衝液A（10 mM NaH_2PO_4 、pH 6.0）による平衡化；洗浄緩衝液A及び洗浄緩衝液B（10 mM NaH_2PO_4 、1 M NaCl 、pH 6.0）による、カラムの溶出。勾配溶出条件は、30%洗浄緩衝液Bで50 CVの線状工程、100%洗浄緩衝液Bで5 CVの線状工程、並びに100%洗浄緩衝液Bで10 CVで充填による工程として適用した。画分を、UV吸光度値に従い1本のチューブにつき0.5 mlとして収集した（収集閾値は、5 mAUに設定した）。

【0490】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

【0491】

このクロマトグラフィー実験は、Superdex（商標）200インクリース10/300 GLカラム及びGE Healthcare life sciencesからのAKTAシステムを用いて行った。実験は、PBS（137 mM NaCl 、2.68 mM KCl 、1.76 mM KH_2PO_4 、10 mM Na_2HPO_4 、pH 7.0）を0.5 ml/分で用いて行った。画分は、各画分0.5 mlで、自動収集プログラムを用いて収集した（収集値は、UV吸光度の5 mAUとして設定した）。

【0492】

Ni Sepharose（商標）Excelクロマトグラフィー精製

【0493】

Ni Sepharose（商標）Excelクロマトグラフィーを使用する6×His タグ付きタンパク質の精製のため、Ni Sepharose（商標）excel樹脂をGE Healthcareから購入した。この樹脂を、ガラスカラム(BioRad)に充填した。樹脂貯蔵用緩衝液を除去するためにカラムを10カラム容積(CV) dd H_2O で洗浄した後、これを、6×His タグ付きタンパク質の精製に使用した。簡単に述べると、Niカラムによる精製は、流量0.2 ml/分で蠕動ポンプを用い、室温で行った。試料の装加後、10 CVのPBS（50 mM リン酸塩、150 mM NaCl 、pH 7.0）を洗浄に使用し、引き続き5 CV溶出緩衝液1（50 mM リン酸塩、150 mM NaCl 、20 mM イミダゾール、pH 7.0）により、弱く結合したタンパク質を除去した。10 CV溶出緩衝液2（50 mM リン酸塩、150 mM NaCl 、500 mM イミダゾール、pH 7.0）を使用し、結合したタンパク質を溶出した。溶出後、収集したタンパク質を、NanoDrop（商標）2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。溶出したタンパク質の純度は、SDS-PAGE及びSEC-HPLCにより検出した。カラムを、10 CVのdd H_2O 、10 CVストリッピング緩衝液（50 mM トリス、500 mM NaCl 、50 mM EDTA、pH 7.4）を汚染処理(sanitation)のため、10 CVの6 M 塩酸グアニジン（pH 7.4）及び10 CVの0.1 M 硫酸ニッケルを用いて再生した。再生したカラムを、20%エタノールと共に充填させ、4℃で貯蔵した。

【0494】

サイズ排除－高速液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）

【0495】

試料の純度を、Tosoh BioscienceからのTSK-GEL G3000SWXLカラム（7.8 mm × 300 mm）、及びAgilent 1200 HPLCシステム(Agilent Technologies)を用いて分析した。カラムは、流量1.0 ml/分のリン酸緩衝液（50 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl 、pH 7.0）により平衡化した。50 µlのタンパク質試料が濾過及び注入された後、UV吸光度を280 nmでモニタリングした。純度は、このクロマトグラムの積分により概算した。

【0496】

ELISAによる抗体濃度の測定

【0497】

ELISAプレートを、コーティング緩衝液（200 mM Na_2CO_3 / NaHCO_3

10

20

30

40

50

、pH 9.2)中の200 ng/mLのヤギ抗-ヒトIgG-Fc由来の(Fab)₂によりコーティングした。4℃で一晩のインキュベーションした後、プレートを、ディープウェル洗浄機(Biotek ELx405)を用い、PBS緩衝液で1回洗浄した。その後プレートを、PBS緩衝液中の2%BSAによりブロックし、室温で1時間インキュベーションした。プレートを、洗浄緩衝液で3回洗浄し、陽性対照抗体及び希釈した試料を添加した。2時間インキュベーションした後、プレートを300 µL洗浄緩衝液で6回洗浄し、ビオチン化したヤギ抗-ヒトIg-Fc (Bethyl、100 µL/ウェル、2%BSA中1:5000希釈)を、検出抗体として添加した。インキュベーション工程及び洗浄工程の後、SA-HRP (Invitrogen、2%BSA中1:8000希釈)を添加した。次にプレートを、室温で更に1時間インキュベーションした。プレートを、300 µL/ウェル洗浄緩衝液により6回洗浄した。基質TMBを添加し、10分間呈色させた。停止溶液(2M HCl、100 µL/ウェル)を添加し、更なる発色を停止させ、プレートリーダー(Molecular Device SpectraMax(登録商標)M5e)を使用し、吸光度を450 nmで測定した。

【0498】

標的-結合アッセイ

【0499】

設計された分子の結合能は、各々、CD3⁺Jurkat細胞株及びCD19⁺Ramos細胞株を用いて評価した。両方の細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)から入手し、且つ10%ウシ胎仔血清(FBS、Corning、カタログ番号35-076-CV)を補充したRPMI 1640培地(Invitrogen、カタログ番号22400105)において維持した。

【0500】

1ウェルあたり10⁵個細胞のアリコートを集し、1%ウシ血清アルブミン(BSA、Bovogen-BSAS)により洗浄し、引き続き96-ウェル丸底プレート(Corning、カタログ番号3799)中で、連続希釈した試験用抗体と共に、4℃で1時間インキュベーションした。1%BSAにより2回洗浄した後、プレートを更に、PE-コンジュゲートしたヤギ抗-ヒトIgG-Fc抗体(Jackson Immuno Research Laboratories、カタログ番号109-115-098)と共に、4℃で30分間インキュベーションした。プレートを再度2回洗浄した後、細胞を、FACSCanto IIサイトメーター(BD Biosciences)を使用するフローサイトメトリーにより分析し、関連した蛍光強度を、FlowJoソフトウェアを用いて定量した。4パラメータの非線形回帰解析を使用し、Prismソフトウェア(GraphPad Software社)において、EC50値を得た。

【0501】

(二重特異性抗体-指向性腫瘍細胞死滅)

【0502】

ヒトT細胞を得るために、健常ドナー由来の末梢血単核細胞(PBMC)を、ヘパリン処理した静脈血から、Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare-17-1440-03)密度勾配遠心分離により、新たに単離した。10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(Sciencell、カタログ番号:0503)、50ユニット/mLヒトIL-2リガンドタンパク質及び10 ng/mL OKT3抗体(EBioscience、カタログ番号16-0037-85)を補充したRPMI 1640培地において6日間培養した後、CD8⁺T細胞の濃縮のために、PBMCを、EasySep(Stemcell、カタログ番号:19053)カラムを通過させた。ネガティブ選択カラムからのCD8⁺T細胞を、エフェクター細胞として使用した。

【0503】

細胞傷害アッセイにおいて、標的細胞としてCD19⁺Raji細胞を、20 nMのCell Trace フェアレッド(Invitrogen、カタログ番号C34564)により、37℃で30分間、予め標識した。次に細胞ペレットを、10%FBSを補充したフェノール-非含有RPMI 1640培地(Invitrogen、カタログ番号11835030)により2回洗浄した。96-ウェル丸底プレート(Corning、カタログ番号3799)において、フェアレッド染色したRaji細胞(20,000個細胞/ウェル)を、単離したCD8⁺T細胞(標的細胞:エフェ

10

20

30

40

50

クター細胞の比1:5)、及び連続希釈した二重特異性抗体と共に、37℃で4時間インキュベーションした。インキュベーション後、3µMヨウ化プロピジウム(PI、Invitrogen、カタログ番号P3566)を添加し、十分に混合し、死滅細胞を確定した。15分後、細胞を、FACSCanto IIサイトメーターを使用するフローサイトメトリーにより分析した。二重特異性抗体-媒介した細胞傷害性を、ファールレッド-陽性標的細胞中のPI-陽性標的細胞の割合(%)として規定することができる。T細胞エンゲージされた細胞傷害性のEC50は、Prismソフトウェア(GraphPad Software社)を用いて決定した。

【0504】

(質量分析特徴決定)

【0505】

このタンパク質を、0.4mg/mLに希釈し、20mMトリス緩衝液(pH8.0)100µL中のPNGase F(Glyko、GKE-5006D)1µL(タンパク質対酵素比40:1)と、37℃で少なくとも4時間インキュベーションすることにより、脱グリコシル化した。脱グリコシル化した二重特異性抗体のアリコート、2µLの1M DTTを添加することにより、最終濃度20mMとなるよう、室温で15分間、部分的に還元した。各試料2µgを、Acquity UPLC BEH300 C4カラム(2.1×100mm、1.7µm)上に、0.4mL/分で注入した。移動相Aは、HPLC等級水中の0.1%ギ酸(FA)であった。移動相Bは、アセトニトリル中の0.1%FAであった。非還元条件及び還元条件の両方に関して、3.0分から15.0分まで、24%Bから34%Bまでの有効溶出勾配を使用した。RP UPLCによる分離後、非還元条件及び還元条件中の二重特異性タンパク質の質量を、Waters Xevo G2 Q-TOFにより検出した。MSシグナルを、Biopharma Lynx 1.3ソフトウェアを用いデコンボリューションした。軽鎖及び重鎖の構成成分の理論的質量平均分子量は、GPMawプログラム(v.6.00)を用いて決定した。

【0506】

(DSFによる熱安定性試験)

【0507】

DSFアッセイを、7500 FastリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いて行った。簡単に述べると、抗体溶液19µLを、62.5×SYPROオレンジ溶液(Invitrogen)の1µLと混合し、96ウェルプレート(Biosystems)に添加した。このプレートを、2℃/分の速度で、26℃から95℃まで加熱し、生じる蛍光データを収集した。異なる温度に関する蛍光変化の負の微分係数(negative derivaritive)を計算し、最大値を、融解温度 T_h として規定した。タンパク質が複数のアンフォールディング転移を有する場合、最初の2つの T_h が報告され、 T_{h1} 及び T_{h2} と命名した。 T_{h1} は常に、異なるタンパク質の間の比較を促進するための、正式な融解温度 T_m として解釈される。データ収集及び T_h 計算は、その操作ソフトウェアにより、自動的に行った。一旦異なる温度の負の微分係数のプロットが、このソフトウェアにより報告されたならば、転移前ベースラインから減少するよう始まる曲線プロット中の点を、開始温度 T_{on} として大まかに概算することができる。

【0508】

(実施例13:O-グリカン同定)

先の質量分析データは、TCR-修飾したT3軽鎖上のO-グリカンを発見した。アミノ酸配列パターンを基に配置され得るN-グリコシル化部位とは異なり、O-グリコシル化部位は、配列から予測することは困難である。このT3 TCR-キメラ軽鎖は、T3親抗体のV領域、並びにTCRアルファ鎖の定常領域で構成された。両方の領域は、潜在的にO-グリコシル化部位を有し得る。質量分析を、当初のT3モノクローナル抗体に対し再度行い、且つこの親抗体は、O-グリカンを有さないことを認め、これはO-グリカンは、TCRアルファ定常領域内に配置されていることを指摘している。

【0509】

O-グリコシル化は、ほとんどSer残基又はThr残基に起こり、且つTCRアルファ定常領域の配列中には21個のSer/Thr残基が存在する(下記配列中太字で示す)

10

20

30

40

50

ことは、わかっている。O-グリコシル化部位の正確な位置を配置するために、個別のSer/Thrを各々Alaと置換するためのAla走査を実行し、21種のTCR-修飾した単一特異性T3分子を構築した。各変異体上の潜在的O-グリカン、タンパク質から放出し、2-アミノ安息香酸により標識し、蛍光検出装置と組合せたHPLCにより定量した。O-グリカンシグナルの喪失は、O-グリコシル化部位の位置を示すことができる。

【0510】

【表36】

1	11	21	31	41
PDIQNPDPAV	YQLRDSKSSD	KSVCLFTDFD	SQTQVSQSKD	SDVYITDKCV
51	61	71	81	91
LDMRSMDFKS	NSAVAWSQKS	DFACANAFQN	SIIPEDTFFP	SPESS

(配列番号：411)

10

【0511】

O-グリカンの同定及び量を定量するために、酸加水分解及びHPLCベースの方法を開発した。試料を、2M TFA（トリフルオロ酢酸）により加水分解し、O-グリカンの単糖を放出させた。O-グリカンのGalNAc（N-アセチル-D-ガラクトサミン）及びGal（ガラクトース）から放出されたGalN（ガラクトサミン）を、2-アミノ安息香酸で標識し、FLD（蛍光検出装置）と組合せたHPLCにより分析し、外部校正曲線により定量した。放出されたGalN含量はO-グリカンに対する特異的単糖であるので、これは、O-グリカンの量に直接関連した。これらの結果は、1モルタンパク質あたりのGalNのモル数を報告し、これは1モルタンパク質が含むO-グリカンのモル量を表す。

20

【0512】

表34は、全ての変異体について定量したO-グリカンレベルを示す。二重特異性分子E17-Design_2-QQQQを、対照タンパク質として使用した。このデータは、E17-Design_2-QQQQタンパク質1モル上に利用可能な0.24molのO-グリカンが存在することを示した。これはただ1つのTCR-修飾したT3軽鎖を有する二重特異性抗体であるので、2本の鎖のO-グリカンレベルの合計は、2倍すべきであり、すなわちおよそ0.48mol/molである。21種の変異体全ての中で、それらのほとんどは、予測されたO-グリカン量を保持した。試料#3、#8、#10及び#20は、わずかなシグナル減少を有した。試料#19は、明確なO-グリカン喪失を示した。そのシグナルは、対照タンパク質のものよりも低くさえあった。従って、位置S91を、主要なO-グリコシル化部位として同定した。S19、S36、S41及びS94は、可能性のあるO-グリコシル化部位として同定した。

30

【0513】

40

50

【表 37】

表 34：様々な単独 A1a 変異体上の O-グリカン量（残基番号付けは図 19A に列挙した）

プロジェクト番号		WBP3438	分析番号	AS1803474
試験品		単糖分析	SOP番号	PD-PAS-LAB-090-02
試料番号	試料ID	試験結果(mol/molタンパク質)		
		ガラクトサミン		
196388	E17-Design_2-QQQQ	0.24 (×2)		
1	T3.uIgG4.SP(S16A)	0.41		
2	T3.uIgG4.SP(S18A)	0.43		
3	T3.uIgG4.SP(S19A)	0.38		
4	T3.uIgG4.SP(S22A)	0.45		
5	T3.uIgG4.SP(T27A)	0.57		
6	T3.uIgG4.SP(S31A)	0.44		
7	T3.uIgG4.SP(T33A)	0.42		
8	T3.uIgG4.SP(S36A)	0.36		
9	T3.uIgG4.SP(S38A)	0.47		
10	T3.uIgG4.SP(S41A)	0.37		
11	T3.uIgG4.SP(T46A)	0.50		
12	T3.uIgG4.SP(S55A)	0.43		
13	T3.uIgG4.SP(S60A)	0.53		
14	T3.uIgG4.SP(S62A)	0.56		
15	T3.uIgG4.SP(S67A)	0.57		
16	T3.uIgG4.SP(S70A)	0.52		
17	T3.uIgG4.SP(S81A)	0.53		
18	T3.uIgG4.SP(T87A)	0.55		
19	T3.uIgG4.SP(S91A)	0.12		
20	T3.uIgG4.SP(S94A)	0.32		
21	T3.uIgG4.SP(S95A)	0.61		

【0514】

（実施例 14：Fcγ 受容体、C1q、及び FcRn への結合）

（方法）

【0515】

（SPR による Fcγ 受容体結合親和性）

【0516】

FcγRs への抗体結合親和性は、Biacore T200(又はBiacore 8K)を用いて検出した。各受容体を、抗-his 抗体固定したCM5センサーチップ(GE)上に捕獲した。異なる濃度の抗体を、センサーチップ上に、流量30μL/分で注入し、会合相60秒間、引き続きの解離相60秒間であった。次に各結合サイクル後、このチップを、10mMグリシン(pH1.5)により再生した。

【0517】

ブランク表面及び緩衝液チャンネルのセンサーグラムを、被験センサーグラムから減算した。この実験データを、ラングミュア解析を使用する1:1モデル(FcγRIに関して)又は定常状態モデル(他の受容体に関して)によりフィッティングさせた。分子量150kDaを使用し、抗体のモル濃度を計算した。

【0518】

（ELISAによるC1q結合）

【0519】

ELISAプレート(Nunc)を、 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体試料により、 4°C で一晩コーティングした。ブロック及び洗浄後、 $1\mu\text{g}$ を、 $600\mu\text{g}/\text{mL}$ から始めて勾配希釈し、室温で2時間インキュベーションした。次にプレートを洗浄し、引き続きヒツジ抗マウスIgG1 Ab-HRPと共に1時間インキュベーションした。洗浄後、TMB基質を添加し、相互作用を 2M HCl により停止した。 450nm での吸光度を、マイクロプレートリーダー(Molecular Device)を用い測定した。

【0520】

(SPRによるFcRn結合親和性)

【0521】

FcRnに対する抗体結合親和性を、Biacore T200(又はBiacore 8K)を用いて検出した。各抗体は、CM5センサーチップ(GE)上に固定した。送液緩衝液($50\text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 150mM NaCl 、 $0.05\%\text{Tween }20$ 、 $\text{pH }6.0$)中の異なる濃度のFcRnを、センサーチップ上に、流量 $30\mu\text{L}/\text{分}$ で注入し、会合相60秒間、引き続き解離相60秒間であった。次に各結合サイクル後、このチップを、 $1\times\text{PBS}(\text{pH }7.4)$ により再生した。

【0522】

ブランク表面及び緩衝液チャンネルのセンサーグラムを、被験センサーグラムから減算した。この実験データを、定常状態モデルによりフィッティングさせた。分子量 45kDa を使用し、FcRnのモル濃度を計算した。

【0523】

(結果)

【0524】

先に言及した全てのIgG1は、LALA変異を伴うIgG1であるので、IgG4及び野生型IgG1(T3U4.E17-2.(2).uIgG1(ノブイントゥホール型の野生型IgG1))の両方におけるE17-Design_2-QQQQの、FcγRI、FcγRIIa(H167)、FcγRIIa(R167)、FcγRIIb、FcγRIIIa(F176)、FcγRIIIa(V176)及びFcγRIIIbへの結合活性を、SPRにより調べた。

【0525】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

T 3 U 4 . E 1 7 - 2 . (2) . u I g G 1 構築体の関連配列を、以下に提供する。

T3U4.E17-2. (2).uIgG1	U4-LC (配列番号 : 371)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTTITCSASSTVNYMHVYQQKPGKAPKL LIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQW SSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	10
	U4-HC (配列番号 : 372)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYAFTSYNMYWVRQARGQRL EWIGYIDPYNGDTTYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCLTTAYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKRVEPKSCDKHTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	T3-LC (配列番号 : 373)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA YYYCTQSHLTRTFGGGTKEIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSQ KSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS	20
	T3-HC (配列番号 : 374)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHWRQAPGQGL EWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEP EAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQP LKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRASDKHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30

【0526】

親和性は、表 3 5 (I g G 4) 及び表 3 6 (野生型 I g G 1) にまとめた。両方の分子は、全ての F c γ 受容体に対する典型的ヒト I g G 4 及び野生型 I g G 1 結合親和性を示した。

【0527】

【表 3 9】

表 3 5 : S P R による F c 受容体への I g G 4 親和性

Fc受容体	K _D (M)
Fc γ RI	9.79E-09
Fc γ RIIa (H167)	2.05E-05
Fc γ RIIa (R167)	1.58E-05
Fc γ RIIb	2.41E-05
Fc γ RIIIa (F176)	2.93E-05
Fc γ RIIIa (V176)	1.40E-05
Fc γ RIIIb	> 4.10E-05

40

50

【0528】

【表40】

表36：SPRによるFc受容体への野生型IgG1親和性

Fc受容体	K _D (M)
FcγRI	1.30E-09
FcγRIIa (H167)	3.58E-06
FcγRIIa (R167)	4.83E-06
FcγRIIb	8.07E-06
FcγRIIIa (F176)	2.08E-06
FcγRIIIa (V176)	6.44E-07
FcγRIIIb	5.16E-06

10

【0529】

抗体のC1Qへの結合活性を、ELISAにより調べた(図21A-21B)。IgG4中のE17-Design__2-QQQQは、ELISAにおいて、結合シグナルを示さない(図21A)のに対し、野生型IgG1及び対照ヒトIgG1抗体中のE17-Design__2-QQQQは、正常な結合シグナルを示した(図21B)。

【0530】

20

(実施例15：対称フォーマットG19、G19R、G25、G25R)

安全性の懸念のために、CD3×CD19のような抗体治療標的は、一価のCD3結合を伴う二重特異性抗体から恩恵を受ける。これを考慮し、WuXiBody Fabをインテグレートすること、並びにノブイントゥホール技術により、非対称性二重特異性フォーマットE17及びF16を設計し、且つ良好に作製した。しかしCTLA-4×PD-1のような一部の二重特異性標的は、対称性フォーマットから恩恵を受け、これは、2種の異なる抗体を集成すると同時に、それらの当初の価数を保持し(すなわち合計四価)、所望の相乗作用を達成することができる。WuXiBodyのコアユニットは、キメラFabであり、これは、コグネイト軽鎖-重鎖の正確な対形成を確実にするために、非対称性及び対称性の両方のフォーマットに容易に組み込むことができる。4種のWuXiBodyベースの対称性フォーマット、すなわちG19、G19R、G25及びG25Rを設計した。

30

【0531】

図22は、4種の対称性フォーマットの概略的説明を提供する。G19及びG25において、2種のWuXiBodyキメラFabは、各々、正常抗体のc-末端及びn-末端でグラフトされた。G19とG19Rの間、又はG25とG25Rの間の差異は、各個別のフォーマットにおける正常及びキメラFabの逆転した位置である。2つのFab並びにIgG-Fcの重鎖部分は、1本の鎖にインテグレートされるのに対し、2本の軽鎖は、独立してフォールディング及び集成するよう自由であった。3種のベクターを、宿主細胞へ同時形質移入した場合、重鎖-重鎖会合は、発現プロセス時に正常抗体のように働くと思われ、各軽鎖は、重鎖上のそれ自身のコグネイトパートナーに自己集成すると予想された。

40

【0532】

対称性WuXiBodyフォーマット中の二重特異性CTLA-4×PD-1抗体を、設計した。新規抗-PD-1抗体W3055__1.153.7(U6と称す)及び市販の抗-CTLA-4抗体イピリムマブ(T1と称す)を、この新規フォーマットにつなぐために採用した。IgG4アイソタイプを、その分子に対するADCC及びCDC作用の枯渇を確実にするために選択した。U6及びT1は両方共、このフォーマットの頂上側又は底側に配置することができるので(各々、U6T1及びT1U6と称す)、単独フォーマットG19を、両方のケースを調べるために、最初に使用した。

50

【0533】

被験WuXiBodyの関連配列を、以下に提供する：

【0534】

【表41-1】

試料	プラスミド 番号	配列
T1U6.G1 9.IgG4	T1-LC (配列番号： 375)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA ~~WYQQKPGQAPRLLIYGAFS~~ RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGGGTKVEIK RTVAAPS ~~VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY~~ PREAKVQWKVDNALQSGNSQ SVTEQDSKDS ~~TYSLSSLT~~ TLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	T1-U6-HC (配列番号： 376)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYD GNNKYYADSVKGRFTISRDN ~~SKNTLYLQMN~~ SLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYW GGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTS ~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~ TVPSSSLGKTKYTCNV ~~DHKPSNTK~~ VDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV ~~LHQDWLNGKEYKCKVSNK~~ GLPSSIEKTI ~~SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF~~ YPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN ~~VFSCSV~~ MHEALHN HYTQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES ~~GGGLVQP~~ GGSLRLSC AASGFTFSSHAMS ~~WVRQAPGKGLEWVSTITGGG~~ SIYYADSVKGRFTISRDN ~~SK~~ NTLYLQMN ~~SLRAEDTAIYYCAKNRAGEGYFDY~~ WGGGTLVTVLEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS ~~WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ~~ PALQDSRYALSSRLRVSA ~~TFWQNP~~ RNHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQI VSAEAWGR
	U6-LC (配列番号： 377)	SYELTQPLSVSV ~~ALGQTARITCGGDNI~~ GNKDVHWYQQKPGQAPV ~~LVIYRDSNRP~~ SGIPEGFSGSNSGNTATLTISR ~~AQAGDEADYYCQVWDSI~~ WVFGGGTKLTVLPDI QNPDPAYYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQV ~~SQSKDS~~ DVYITDKCVLDMRSM DKSNSAVAWSQKSDFA ~~CANAFQNSI~~ IPEDTFFPSPESS
U6T1.G1 9.IgG4	U6-LC (配列番号： 378)	SYELTQPLSVSV ~~ALGQTARITCGGDNI~~ GNKDVHWYQQKPGQAPV ~~LVIYRDSNRP~~ SGIPEGFSGSNSGNTATLTISR ~~AQAGDEADYYCQVWDSI~~ WVFGGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV ~~AWKADSSPVKAGVETTT~~ PSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	U6-T1-HC (配列番号： 379)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMS ~~WVRQAPGKGLEWVSTITGG~~ GSIYYADSVKGRFTISRDN ~~SKNTLYLQMN~~ SLRAEDTAIYYCAKNRAGEGYFDY WGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV ~~DHKPSNTK~~ VDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV ~~LHQDWLNGKEYKCKVSN~~ KGLPSSIEKTI ~~SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF~~ YPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN ~~VFSCSV~~ MHEALH NHYTQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN ~~NKYYADSVKGRFTISR~~ DNS KNTLYLQMN ~~SLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGGTLVTVLEDLKNVFPPEVA~~ VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS ~~WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ~~ PALQDSRYALSSRLRVSA ~~TFWQNP~~ RNHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPYTQI VSAEAWGR
	T1-LC (配列番号： 380)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA ~~WYQQKPGQAPRLLIYGAFS~~ RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGGGTKVEIK PDIQNPDPAYYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQV ~~SQSKDS~~ DVYITDKCVLDMR SMDFKNSAVAWSQKSDFA ~~CANAFQNSI~~ IPEDTFFPSPESS
U6T1.G1 9R.IgG4	U6-LC (配列番号： 381)	SYELTQPLSVSV ~~ALGQTARITCGGDNI~~ GNKDVHWYQQKPGQAPV ~~LVIYRDSNRP~~ SGIPEGFSGSNSGNTATLTISR ~~AQAGDEADYYCQVWDSI~~ WVFGGGTKLTVLPDI QNPDPAYYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQV ~~SQSKDS~~ DVYITDKCVLDMRSM DKSNSAVAWSQKSDFA ~~CANAFQNSI~~ IPEDTFFPSPESS

10

20

30

40

50

【表 4 1 - 2】

	U6-T1-HC (配列番号 : 382)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVTYLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRV SATFWQNPRNHFRQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVYVDVYSEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVYSYLT VYLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGGGSGGGGGSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGVYQPG RSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVT FISYDGN NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWL GPFDYWGQGT LVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVYVTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTK VDKRV	10
	T1-LC (配列番号 : 383)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSYGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAFS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIK RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
U6T1.G2 5.IgG4	U6-LC (配列番号 : 384)	SYELTQPLSYSV ALGQTARITCGGDNI GNKDVHWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSI WVFGGGT KLT VLPDI QNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDS DVIITDKCVLDMRSM D FKSNSAVAWSQKSD FACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS	20
	U6-T1-HC (配列番号 : 385)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVTYLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRV SATFWQNPRNHFRQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVYQPG GRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVT FISYDGN NKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT LVTYSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVYVTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVYSEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVYSYLT VYLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	30
	T1-LC (配列番号 : 386)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSYGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAFS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIK RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
U6T1.G2 5R.IgG4	U6-LC (配列番号 : 387)	SYELTQPLSYSV ALGQTARITCGGDNI GNKDVHWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSI WVFGGGT KLT VLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	40

【表 4 1 - 3】

	U6-T1-HC (配列番号 : 388)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVYTVPSSSLGKTYYTCNV DHKPSNTKV DKR VGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGK GLEWVTFISYDGN NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCA RTGWLGPFDYWGQGT LVTYLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPYTQIYSAEAWGRYGP PCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EYTCVYVDYSQEDPEYQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPV LDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	10
	T1-LC (配列番号 : 389)	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGGGT KVEIK PDIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDS DVIITDKCYLD MR SMDFKSN SAVAWSQKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPESS	
U6T4.G2 6.IgG4	U6-LC (配列番号 : 390)	SYELTQPLSVSV ALGQTARITCGGDNIGNKDVHWWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSIWWFGGGTKLT VLPDI QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDS DVIITDKCYLD MRSM FKSNSAVAWSQKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPESS	20
	U6-HC-T4-L C (配列番号 : 391)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVTYLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQV QFYGLSENDEWTQDRAKPYTQIYSAEAWGRGGGSGGGGSDIYMTQTPLSLSVT PGQPASISCRSSQSLNSDGN TYLYWY LQKPGQSPQLLIYLVSKLGSGVPNRFS GSGSGTDFTLKI SRVEADYGVYYCYQGTHDPWTFGGGT KVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVYCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	T4-HC (配列番号 : 392)	QVQLQESGPGLYKPSETLSLTCSVTYHTITSGYDWTWIRKPPGKGMEWIGYISY SGNTNYNPSLKSRYTISRDT SKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCASMMPHYVYMD AWGQGT LVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVYTVPSSSLGKTYYTCNV DHKPSNTKV D RVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EYTCVYVDYSQED PEYQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	30
U6T5.G1 9.IgG4	U6-LC (配列番号 : 393)	SYELTQPLSVSV ALGQTARITCGGDNIGNKDVHWWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSIWWFGGGTKLT VLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	40

【表 4 1 - 4】

	U6-T5-HC (配列番号 : 394)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKV DKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EYQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT V LHQD W L N GKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTFTNIFYMNVVRQAPGGGLEWMGRVDPEQGRADYAEKFKKRVITADKS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRAMDNYGFAYWGQGT LVT V L E D L K N V F P P E V AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALQDSRYALSSRLRVSA TFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPV TQ IVSAEAWGR	10
	T5-LC (配列番号 : 395)	EIVLTQSPDFQS VTPKEKVTITCSANSALS YMYWYQQKPDQSPKLWVHGT SNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHHWNTQWTFGGG TKVEIKPD IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM DFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS	
U6T5.G1 9R.1gG4	U6-LC (配列番号 : 396)	SYELTQPLSVSV ALGQTARITCGGDNIGNKDVH WYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSI WVF GGGTKLT VLPDI QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM DFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS	20
	U6-T5-HC (配列番号 : 397)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGT LVT V L E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSA TFWQNP RNHFRCQV QFYGLSENDEWTDRAKPV TQ I V S A E A W G R Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F P P KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTFTNIFYMNVVRQAPGGGLEWMGRVDPEQGRADYAEKFKKRVITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRAMD NYGFAYWGQGT LVTYSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNT KV D K R V	30
	T5-LC (配列番号 : 398)	EIVLTQSPDFQS VTPKEKVTITCSANSALS YMYWYQQKPDQSPKLWVHGT SNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHHWNTQWTFGGG TKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
U6T5.G2 5.1gG4	U6-LC (配列番号 : 399)	SYELTQPLSVSV ALGQTARITCGGDNIGNKDVH WYQQKPGQAPV LVIYRDSNRP SGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSI WVF GGGTKLT VLPDI QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM DFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS	40

10

20

30

40

【表 4 1 - 5】

	U6-T5-HC (配列番号 : 400)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHAMSWYRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGTLYTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNP RNHFRQV QFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSKASGYTFTNYFMNWVRGAPGGGLEWMGRYDPEQGRADYAEKFKRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRANDNYGFAYWGQGTLYTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKYDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EYTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	T5-LC (配列番号 : 401)	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPDQSPKLWVHGTSNLA SGVPSRFGSGSGSDFTLTINSLEAEDAATYYCHHWSTQWTFGGGTKVEIKRT YAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVYCLLNFPYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
U8T5.G2 5R.IgG4	U6-LC (配列番号 : 402)	SYELTQPLSVSV ALGQTARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRP SGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGQDEADYYCQVWDSIWWFGGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTAVKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHKYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	U6-T5-HC (配列番号 : 403)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHAMSWYRQAPGKGLEWVSTITGG GGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKYDKR VGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYFMNWVRGAPGO GLEWMGRYDPEQGRADYAEKFKRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRANDNYGFAYWGQGTLYTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFPYDPHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYGPCCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EYTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	T5-LC (配列番号 : 404)	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPDQSPKLWVHGTSNLA SGVPSRFGSGSGSDFTLTINSLEAEDAATYYCHHWSTQWTFGGGTKVEIKPD IQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCYLDNRSM DFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
T4U6.G2 7.IgG4	T4-HC-U6-L C (配列番号 : 405)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVTYHTITSGYDWTWIRKPPGKGMWIGYISY SGNTNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCASMMVPHYVMD AWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKYDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EYTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEAL HNHYTQKSLSLGLGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPLSVSV ALGQTAR ITCGGDNIGNKDVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPEGFSGSNSGNTATLT ISRAGQDEADYYCQVWDSIWWFGGGTKLTVLPDIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCYLDNRSMDFKSN SAVAWSQKSDFACAN AFQNSIIPEDTFFPSPESS

10

20

30

40

P D - 1 機能の重要性のために、U 6 は、全てのフォーマットの頂上側に保持し、P D - 1 結合を最大化する一方で、T 1 は底側に保持し、まずまずの C T L A - 4 結合を認めた。全ての構築された分子は、E x p i 2 9 3 において良好に発現され、且つプロテイン A クロマトグラフィーの一工程精製後、純度 > 9 0 % が容易に達成された。図 2 5 A - 2 5 B は、S D S - P A G E 並びに S E C - H P L C により特徴決定された精製されたタンパク質を示した。

【0538】

次に P D - 1 及び C T L A - 4 の両方への細胞ベースの結合アッセイを行い、新たに構築した分子全ての結合能をチェックした。図 2 6 A - 2 6 B は、設計された構築体とベンチマーク抗体の間の結合曲線の比較を示した。データは、全てのタンパク質は、ベンチマーク抗体と非常に類似した P D - 1 結合を有したことを示した。加えて、C T L A - 4 結合は、G 2 5 及び G 2 5 R フォーマットにおいて有意に改善され、且つベンチマーク抗体と同等の性能が達成された (≤ 2 倍)。しかし G 1 9 R フォーマットは、依然良好には働かなかった。恐らく G 1 9 と G 1 9 R は、T 1 の効果的結合を妨げるという同じ問題点を共有するのであろう。

【0539】

これらの分子の機能を、2 つの標的 P D - L 1 及び C D 8 0 の各リガンドへのそれらの競合能の検証により更に特徴付けた。図 2 7 A - 2 7 B は、これらの分子は、P D - L 1 との競合において、ベンチマークと同等の性能を有することを確認した。C T L A - 4 側に関して、フォーマット G 2 5 R は、C D 8 0 との競合において、ベンチマークと類似の能力を示した。他の 2 種のフォーマットは、かなり悪い結果を有した。G 2 5 と G 2 5 R の間の差異は、T C R 定常領域の位置である。T 1 の W u X i B o d y フォーマットへの転換は、T 1 の活性を促進したように見えるが、T 1 は依然 U 6 の下であった。これは、機能性リード(lead)は、限定された数の W u X i B o d y 由来のフォーマットの走査により効果的にスクリーニングされ得ることを明らかにする良好な例を提供した。

【0540】

従って、ベンチマーク抗体に類似した機能性 P D - 1 / C T L A - 4 二重特異性抗体を得た。W u X i B o d y フォーマットは、非常に普遍的であり、すなわちいずれの新規抗体も、これらのフォーマットにフィットし、且つその機能を発揮することができる。良好な親抗体が入手できるならば、これをベンチマーク抗体よりも優れた分子を作製するために使用することができる。

【0541】

この概念を証明するために、イピリムマブよりもはるかに強力な親和性を有する別の抗 - C T L A - 4 抗体である W 3 1 6 2 _ 1 . 1 5 4 . 8 - z 3 5 (T 5 と称す) を、図 2 2 に示した 4 種のフォーマット G 1 9 、 G 1 9 R 、 G 2 5 、及び G 2 5 R 全てにおいて、開発し且つ実行した。再度、新規構築体全てを、E x p i 2 9 3 細胞において良好に発現させ、一工程プロテイン A クロマトグラフィーにより容易に精製した。これらのタンパク質の純度は、図 2 8 A - 2 8 B に示した。

【0542】

全ての U 6 T 5 分子、先に同定した U 6 T 1 . G 2 5 R 分子、並びにベンチマーク抗体の結合を全て実行し、且つ比較した。結果は、図 2 9 A - 2 9 B に列挙している。P D - 1 側は、先に観察されたような当初の結合挙動を保持し、その理由は、P D - 1 抗体はこれらのフォーマットのいずれにおいても置き換えられなかったからである。しかし C T L A - 4 側に関して、U 6 T 5 構築体 (G 1 9 及び G 1 9 R フォーマットであっても) は全て、U 6 T 1 . G 2 5 R 並びにベンチマーク分子よりも明らかに優れた結合を示した。U 6 T 5 . G 2 5 は、これらの新規タンパク質全ての中で最も強力であり、これは、ベンチマーク抗体と比べ、1 . 6 $\times$ 向上された E C ₅₀ 及び > 3 $\times$ 向上された最高値を有した。この分子は更に、E L I S A デュアル結合アッセイ及び F A C S 競合アッセイにおいて特徴付けた。図 3 0 は、これらの分子は、両方の標的へ同時に効果的デュアル結合することを証明した。図 3 1 A - 3 1 B のデータは、U 6 T 5 . G 2 5 は、C T L A - 4 に対し有

意に向上されたCD80との競合能を有することを確認した。これは、WuXiBodyフォーマットは、異なる親抗体を操作するのに十分に柔軟であることを証明した。この分子をWuXiBodyフォーマットに組み込んだ(plug)場合、親抗体の優れた部分は、良好に保存され、且つ反映される。

【0543】

これら4種の対称性フォーマットの全てをカバーする分子の熱安定性を特徴付けた。これらの分子のほとんどは、およそ60℃の融解温度を示し(表37参照)、これは先に示した非対称性フォーマットと一致した。

【0544】

【表42】

表37: WuXiBodyフォーマットの代表的抗体の融解温度

タンパク質名	アイソタイプ	pI	緩衝液	濃度(mg/ml)	T _h 1(℃)	T _h 2(℃)
T1U6.G19.IgG4	IgG4, κ, λ	5.92	PBS	1.3	60.8	69.9
U6T1.G19.IgG4	IgG4, κ, λ	5.92	PBS	0.9	59.1	72.8
U6T1.G25R.IgG4	IgG4, κ, λ	6.06	PBS	1.385	60.8	73.9
U6T5.G19.IgG4	IgG4, κ, λ	5.93	PBS	0.6	56.2	74.1
U6T5.G19R.IgG4	IgG4, κ, λ	5.87	PBS	1.2	63.4	-
U6T5.G25.IgG4	IgG4, κ, λ	5.93	PBS	0.7	63.4	-
U6T5.G25R.uIgG4	IgG4, κ, λ	5.99	PBS	0.5	57.2	74.1

【0545】

(実施例16: 軽-重スイッチしたキメラFab)

合計で111種の可能性のあるWuXiBodyベースのフォーマットを、うまく設計した。先に示したE17、F16、G19、G19R、G25及びG25Rに加え、軽-重交差したTCR-キメラFabを伴う新規フォーマットも数種類設計した。これらは、図32に示したように、G26、G26R、及びG27と称した。今回は、抗体対U6及びT4を使用し、ここでT4は、抗-CTLA-4抗体WBP3162-1.146.19-z12であった。T4U6対を、フォーマットG27及びG26Rについて開発した。図33A-33Bは、SDS-PAGE及びSEC-HPLCにより特徴付けした精製したタンパク質を示した。両方のタンパク質が発現され、T4U6.G27.IgG4は低い純度を有したが、T4U6.G26R.IgG4は、正確な分子量及び高い純度を有した。後者の分子の結合能を、FACS結合において特徴付けた。図34A-34Bは、PD-1結合は、底側に配置されるので、これは影響を受けることを示したのに対し、CTLA結合側は、フォーマットの頂上側に配置されるので、完全に回復したことを示した。

【0546】

U6T4対を、フォーマットG26について試みた。発現及び精製の両工程は、図35A-35Bにおいて示したように良好に働いた。ELISA及びFACS結合を両方共行い、データは、図36A-36Dに示した。これらのデータは、軽-重交差したキメラFabは、依然良好に働くことができることを証明した。表38に示したように、この分子の融解温度は、およそ63.4であった。

【0547】

【表43】

表38. U6T4.G26.IgG4の融解温度

タンパク質名	アイソタイプ	pI	緩衝液	濃度(mg/ml)	T _h 1(℃)	T _h 2(℃)
U6T4.G26.IgG4	IgG4, κ, λ	5.93	PBS	0.8	63.4	-

【0548】

(実施例17: 二重特異性抗-CD13×CD19 WuXiBody)

背景

【0549】

(標的生物学)

【0550】

ヒトCD19は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型膜貫通タンパク質である(Carterら、Curr Dir Autoimmun, 2004, 7:4-32)。これは、ほとんどのB細胞上で発現されるが、形質細胞、幹細胞、又は正常骨髓細胞系上では検出されない(Tedder、Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(10):572-577)。CD19は、B細胞受容体(BCR)－依存型及び非依存型シグナル伝達の両方を調節することを通じて、内因性B細胞シグナル伝達閾値の確立に、決定的に関与している(Wangら、Experimental Hematology & Oncology, 2012, 1:36)。CD19は、CD20よりも広範な発現を有する。CD19発現のパターンは、B細胞悪性変換において維持され、これは、緩徐進行型から攻撃型までB細胞リンパ腫の全ての亜型、並びにB細胞慢性リンパ球性白血病及び急性非Tリンパ芽球性白血病へ転換し、且つリツキシマブにより標的化することができない、急性リンパ芽球性白血病(ALL)など早期B細胞の腫瘍指標を標的化することを可能にする。いくつかのCD19モノクローナル抗体が、リンパ腫療法について調べられている(米国特許出願公開20140072587 A1、米国特許第8,242,252 B2号、及び米国特許第8,097,703 B2号)。

10

【0551】

CD3 T細胞共受容体は、4本の異なる鎖、CD3ガンマ鎖、CD3デルタ鎖、及び2本のCD3イプシロン鎖で構成されたタンパク質複合体である。4本の鎖は、T細胞受容体(TCR)として公知の分子及びゼータ鎖と会合し、Tリンパ球における活性化シグナルを作製する。TCR、ゼータ鎖、及びCD3分子は、TCR複合体を構成し、ここでサブユニットとしてのTCRは、抗原を認識し且つ結合し、サブユニットとしてのCD3は、抗原刺激をシグナル伝達経路に移行及び運搬し、並びに最終的にはT細胞活性を調節する。CD3タンパク質は、事実上全てのT細胞に存在する。CD3－TCR複合体は、自然免疫応答及び養子免疫応答の両方においてT細胞機能を調節し、並びに細胞性及び体液性免疫機能を調節する。これらは、広範囲の細胞傷害性作用による病原性生物の排除及び腫瘍成長の制御を含む。ヒトCD3に特異的なマウスモノクローナル抗体、例えばOKT3(Kungら、Science, 1979, 206: 347-9)は、治療のために開発された第一世代CD3抗体であった。OKT3は強力な免疫抑制効能を有すが、その臨床使用は、その免疫原性及び分裂促進性の能力に結びつけられた重篤な副作用により、阻止された(Chatenoud、Nature Reviews, 2003, 3:123-132)。OKT3は、抗グロブリン反応を誘導し、それ自身迅速なクリアランス及び中和を促進する(Chatenoudら、Eur. J. Immunol., 1982, 137:830-8)。加えてOKT3は、インビトロにおいてT細胞増殖及びサイトカイン産生を誘導し、且つインビボにおけるサイトカインの大規模放出につながった(Hirschら、J. Immunol, 1989, 142: 737-43)。そのような重篤な副作用は、移植におけるOKT3のより広範な使用、並びに自己免疫などの他の臨床分野へのその使用の拡大を制限した(同書)。

20

30

【0552】

CD3及びCD19を標的化する二重特異性抗体は、T細胞及びB細胞に同時に結合することができる。一旦この二重特異性抗体がCD3－陽性T細胞及びCD19－陽性B細胞に結合したならば、細胞溶解性シナプスが形成される。次に細胞傷害性は、細胞傷害性T細胞の顆粒からのパーフォリン及びグランザイムの放出により誘導され、後者は悪性B細胞のアポトーシス及び溶解を誘導する。

40

【0553】

ブリナツモマブの活性は、クラスII MHCによる抗原提示及びTCR認識とは無関係であることが証明されている。従って、これは、抗原提示の仕組みの機能障害及び腫瘍微小環境における負の共刺激シグナルの活性化など、様々な腫瘍－媒介性免疫回避機序を迂回することができる。

【0554】

満たされない医学的必要性

50

【0555】

成人の急性リンパ芽球性白血病（ALL）の治療は、依然課題が多く、新規療法が必要とされている。現在の療法により、奏功率は、最初の寛解期間、年齢及び細胞遺伝学に応じて、30～50%の範囲である。非ホジキンリンパ腫（NHL）のサブセットに関する全奏功率は、第一世代の抗-CD20抗体を利用するレジメン下では、現在90%以上である。しかしいくつかのNHL亜型は、これらの療法に反応せず、反応性NHL患者の大部分は、標準の免疫療法／化学療法併用レジメンの後で、最終的には再発する。従ってこれらの満たされない必要性のために、新規の第一順位の療法及び新規救済レジメンの両方が、必要である。

【0556】

材料及び方法

【0557】

（カニクイザルCD19発現細胞株の作製）

【0558】

完全長ヒト又はカニクイザルCD19の遺伝子を、p cDNA3.3ベクターへクローニングした。次に各発現ベクターを、リポフェクタミン2000を使用し、それぞれ、CHO-K1細胞へ形質移入した。これらの細胞を、10%FBSを含むF12-K中で培養した。形質移入後の24～48時間に、ブラストサイジンを追加した。選択のために2～3代継代した後、細胞を、PEコンジュゲートされた抗-CD19抗体及び抗-PEマイクロビーズ(Miltenyi-013-048-801)により濃縮した。安定した単独細胞クローンを、限定希釈により単離し、抗-CD19抗体を使用するFACSによりスクリーニングした。

【0559】

（標的-発現する腫瘍細胞株）

【0560】

Raji細胞及びJurkat細胞を、ATCCから得た。Ramos細胞は、ECACCから得た。これらの腫瘍細胞は全て、RPMI1640／10%FBSにおいて培養した。

【0561】

（WuXiBody W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP及びW3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPの構築）

【0562】

VL、VH、Cκ、CH1遺伝子は、現存する研究室のDNA鋳型から、PCRにより増幅した。Cα及びCβ遺伝子は、Genewiz社により合成した。抗CD19天然型又は抗CD3キメラの軽鎖遺伝子を、CMVプロモーター及びカップリングナルペプチドを含む線状化されたベクターへ挿入した。抗CD3VH-CβのDNA断片を、ノブ変異を伴うヒトIgG4S228P定常領域CH2-CH3を含む線状化されたベクターへ挿入した。抗CD19VH-CH1のDNA断片を、ホール変異を伴うヒトIgG4S228P定常領域CH2-CH3を含む線状化されたベクターへ挿入した。このベクターは、CMVプロモーター及びヒト抗体重鎖シグナルペプチドを含む。

【0563】

（W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP及びW3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPの発現及び精製）

【0564】

重鎖及び軽鎖発現プラスミドを、Exp293細胞へ、Exp293発現システムキット(ThermoFisher-A14635)を製造業者の指示に従い使い、同時形質移入した。形質移入の5日後、上清を収集し、タンパク質をプロテインAカラム(GE Healthcare-17543802)及び更にサイズ排除カラム(GE Healthcare-17104301)を用いて精製した。抗体濃度は、Nano Dropにより測定した。タンパク質の純度は、SDS-PAGE及びHPLC-SECにより評価した。

【0565】

（FACSによる標的結合）

【0566】

二重特異性抗体のCD3-及びCD19-発現細胞への結合を、各々、Jurkat及びRamosを用いて評価した。無関係の抗体を、アイソタイプ対照として使用した。細胞を、96-ウェルプレート(Corning-3799)に密度 10^5 個細胞/ウェルで播種し、PBS/1%BSAで洗浄した。抗体を連続希釈し、細胞と4℃で1時間インキュベーションした。PE-コンジュゲートしたヤギ抗-ヒトIgG Fc抗体(Jackson-109-115-098)を、検出のために使用した。洗浄及び再懸濁後、細胞を、フローサイトメトリー(Canto II, BD Biosciences)により分析した。データは、FlowJoソフトウェアを用いて解析した。4パラメータ非線形回帰解析を使用し、Prism GraphPadソフトウェアを用い、EC50値を算出した。

10

【0567】

(カニクイザルCD3への結合)

【0568】

CD3×CD19二重特異性抗体のカニクイザルCD3への結合を、タンパク質結合ELISAにより試験した。96-ウェル高タンパク質結合ELISAプレート(Nunc MaxiSorp, ThermoFisher, Thermo-442404)を、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液(20mM Na_2CO_3 、180mM NaHCO_3 、pH9.2)中の $1\mu\text{g}/\text{mL}$ カニクイザルCD3イプシロンタンパク質(Acro, #CDE-C5226)の100 μL により、4℃で一晩コーティングした。全てのウェルを、PBS/0.5%Tween-20(v/v)の300 μL /ウェルで、1回洗浄した。次にウェルを、PBS/2%BSA(BOVOGEN、#BSAS)の200 μL により、室温で1時間ブロックし、PBS/0.5%Tween-20(v/v)の300 μL /ウェルにより、3回洗浄した。一次抗体結合に関して、PBS/2%BSA中に連続希釈したCD3×CD19二重特異性抗体を、関連ウェル中に添加し、室温で2時間インキュベーションした。プレートを、先と同様に3回洗浄し、その後100ng/mL二次抗体ヤギ-抗-ヒトIgG Fc-HRP(Bethyl, #A80-304P)の100 μL を添加した。プレートを、室温で1時間インキュベーションし、引き続き先に説明したように6回洗浄した。結合検出のために、テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液(Sigma-860336)100 μL を、全てのウェルに、暗所室温で10分間添加し、その後2M HClの100 μL により反応を停止した。カニクイザルCD3への二重特異性抗体結合の程度を、SpectraMax(登録商標)M5eマイクロプレートリーダーを用い、OD450吸光度を測定することにより、決定した。適切ならば、結合EC50値を、Graph Pad Prism5ソフトウェアを使用する、4パラメータ非線形回帰解析から得た。

20

30

【0569】

(カニクイザルCD19への結合)

【0570】

CD3×CD19二重特異性抗体のCHOK1細胞上に発現されたカニクイザルCD19標的タンパク質への結合を、フローサイトメトリー分析により決定した。簡単に述べると、カニクイザルCD19を過剰発現した安定した細胞株(WBP701.CHOK1.cPro1.C9、WuXi Biologics)を、トリプシンにより収集し、1%BSA/1×PBS中に 1×10^6 個細胞/mLに希釈した。1× 10^5 個細胞/ウェル(100 μL)を、96-ウェルU-プレート(Corning、#3799)の各ウェルに添加し、1500rpmで5分間遠心し(Eppendorf、#5810R)、その後上清を除去した。1%BSA/1×PBS中に連続希釈した抗体を、ペレット化した細胞へ、100 μL /ウェルで添加し、4℃で1時間インキュベーションした。無関係のhIgG4抗体を、アイソタイプ対照として使用した。細胞を、1%BSA/1×PBSの180 μL /ウェルで2回洗浄し、1500rpm、4℃で5分間遠心分離した。ペレット化された細胞を、1%BSA/1×PBS中に1:150希釈した蛍光-標識した抗-ヒトIgG Fc抗体(Jackson、#109-115-098)の100 μL /ウェルの中に、4℃で30分間、暗所において再懸濁した。その後細胞を、前述のように2回洗浄した。最終洗浄後、細胞を、1%BSA/1×PBSの80 μL 中に再懸濁し、蛍光値を、FACS Canto IIサイトメーター(BD Biosciences)により測定した。細胞

40

50

表面結合した抗-CD19×CD3二重特異性抗体の量を、平均蛍光(MFI)を測定することにより、評価した。FACS生データを、FlowJoソフトウェアにより解析し、抗体を含まないか又は二次抗体のみを含有するウェルを使用し、バックグラウンド蛍光を確立した。結合EC50値を、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用する、4パラメータ非線形回帰解析により得た。

【0571】

(FACSによる親和性)

【0572】

CD3及びCD19への結合親和性を、各々、Jurkat細胞及びRamos細胞を使用する、フローサイトメトリーにより決定した。細胞を、96-ウェルU底プレート(BD)へ、密度 5×10^4 個細胞/ウェルで、移した。試験する抗体を、1%1×PBS/1%BSA中に、1:2倍で連続希釈し、細胞と4℃で1時間インキュベーションした。次に、プレートを1500rpmで4分間遠心分離し、上清を廃棄した。二次抗体Alexa647コンジュゲートしたヤギ抗-ヒトIgG Fc(Jackson、カタログ番号109-605-098)又はFITCコンジュゲートしたヤギ抗-His(Bethyl、カタログ番号A190-113F)を、再懸濁した細胞へ添加し、暗所において4℃で30分間インキュベーションした。細胞を1回洗浄し、1×PBS/1%BSAの100μL中に再懸濁した。蛍光強度を、フローサイトメトリー(BD Canto II)により測定し、FlowJoにより解析した。蛍光強度を、定量的ビーズ(Quantum™ MESF Kits、Bangs Laboratories)を基に、結合した分子/細胞へ変換した。KDを、Graphpad Prism5により算出した。

【0573】

(標的細胞への二重結合)

【0574】

二重特異性抗体のCD3 T細胞及びCD19 B細胞へ架橋する能力を、FACSにより試験した。Jurkat細胞及びRaji細胞を、20nMのCellTrace フェアレッド(Invitrogen-C34564)及び50nMのカルセイン-AM(Invitrogen-C3099)により個別に37℃で30分間予め標識し、密度 1×10^6 個細胞/mLとした。予め標識した細胞ペレットを、PBS/1%BSAにより2回洗浄し、次に1:1で混合し、最終密度 1×10^6 個細胞/mLとした。この細胞混合物を遠心分離し、10nM抗体と共に再懸濁し、引き続き1時間インキュベーションした。インキュベーション直後に、細胞混合物を、フローサイトメトリーにより分析した。架橋の割合(%)は、同時に標識されたFar-Red及びカルセインである事象(event)の割合(%)として計算した。

【0575】

(細胞傷害性アッセイ)

【0576】

末梢血単核細胞(PBMC)を、ヘパリン処理した静脈血から、フィコール-Paque PLUS(GE Healthcare-17-1440-03)密度勾配遠心分離により、新たに単離した。次に得られたPBMCを、CD8⁺T細胞の濃縮のために、EasySep(StemCell-19053)カラムを通過させ、これをエフェクター細胞として使用した。CD8⁺T細胞による腫瘍細胞溶解を媒介する抗体の有効性を、フローサイトメトリーにより決定した。細胞傷害性アッセイにおいて、標的細胞としてのRaji CD19 B細胞を、20nM CellTraceフェアレッド(Invitrogen-C34564)により、37℃で30分間予め標識し、引き続き細胞ペレットを、1%FBSを補充したフェノール-非含有RPMI 1640(Invitrogen-11835030)により、2回洗浄した。フェアレッド染色したRaji細胞(20000個細胞/ウェル)を、96-ウェル丸底プレート(Corning-3799)において、単離されたCD8⁺T細胞(エフェクター細胞/標的細胞の比は5:1)及び連続希釈した抗体と共に、37℃で4時間インキュベーションした。インキュベーション後、3μMヨウ化プロピジウム(PI、Invitrogen-P3566)を、死滅した細胞を同定するために、完全に混合した。15分後、細胞を、FACSCanto IIサイトメーターを使用するフローサイトメトリーにより分析した。Ab-媒介した細胞傷害性を、フェアレッド-陽性標的細胞中のPI-陽性標的細胞

割合 (%) として規定することができる。細胞傷害性の EC50 は、Prism を用いて決定した。

【0577】

(T細胞活性化アッセイ)

【0578】

(分泌されたサイトカイン TNF α 及び IFN γ)

【0579】

T細胞が活性化されるかどうかは、上清へ分泌された TNF α 及び IFN γ の量により反映された。CD4 及び CD8 陽性 T細胞の単離手順は、セクション「T細胞活性化 (細胞内サイトカイン TNF α 及び IFN γ 染色)」に記載している。Raji ヒト B細胞 (2 $\times$ 10⁴ 個細胞/ウェル)、CD4 又は CD8 T細胞 (1 $\times$ 10⁵ 個細胞/ウェル)、及び抗体の混合物を、37℃で24時間同時インキュベーションした。上清を収集し、引き続き反応混合物を1500rpmで5分間遠心分離した。上清中の TNF α 及び IFN γ の量を、各々、ヒト TNF ELISA セット (R&D-DY210) 及び ヒト IFN γ ELISA セット (捕獲 Ab: Thermo Fisher-M700A、検出 Ab: Thermo Fisher-M701B、標準物質: PEROTECH-300-02) により決定した。

【0580】

サンドイッチ ELISA の手順は、以下であった。96-ウェル高タンパク質結合 ELISA プレート (ThermoFisher-442404) を、キットの仕様書に従い、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液 (20mM Na₂CO₃、180mM NaHCO₃、pH9.2) 中の 50 μ l/ウェルの捕獲抗体により、4℃又は室温で、一晚コーティングした。全てのウェルを、PBS/0.5% Tween-20 (v/v) の 300 μ l/ウェルにより3回洗浄し、このアッセイにおける後続の洗浄工程は、全て同様に行った。その後ウェルを、TNF α について PBS/2% BSA (BovoGen Biologicals-BSAS) により、及び IFN γ について 100% カゼイン (Pierce-37528) により1時間ブロックし、3回洗浄し、引き続き収集した上記上清又は標準物質 (50 μ l/ウェル) の結合を室温で1時間行い、その後3回洗浄した。検出抗体結合のために、TNF α について PBS/2% BSA 中及び IFN γ について 50% カゼイン中に希釈した対応する抗体を、関連ウェルに添加し、室温で2時間インキュベーションした。プレートを3回洗浄し、その後二次抗体 SA-HRP の 50 μ l を添加した。プレートを、室温で1時間インキュベーションし、引き続き前述のように6回洗浄した。結合検出のために、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質溶液 (Sigma-860336) 50 μ l を、全てのウェルに10分間添加し、その後2M HCl の 50 μ l により、反応を停止した。TNF α 及び IFN γ の量を、OD450 吸光度を、SpectraMax (登録商標) M5e マイクロプレートリーダーを用い測定することにより、決定した。

【0581】

(T細胞活性化アッセイ-表面マーカー CD25 及び CD69 発現)

【0582】

T細胞が活性化されたかどうかは、表面受容体 CD25 及び CD69 のシグナルを染色することにより反映された。CD4 及び CD8 陽性 T細胞の単離手順は、セクション「T細胞活性化 (細胞内サイトカイン TNF α 及び IFN γ 染色)」に記載されている。Raji ヒト B細胞 (2 $\times$ 10⁴ 個細胞/ウェル)、CD4 又は CD8 T細胞 (1 $\times$ 10⁵ 個細胞/ウェル)、及び抗体の混合物を、37℃で24時間同時インキュベーションした。1% BSA で1回洗浄後、細胞ペレットを、FITC マウス抗-ヒト CD4 (BD-550628) 又は PerCpCy5.5 マウス抗-ヒト CD8 (BD-560662)、PE マウス抗-ヒト CD69 (BD-560968) 及び APC マウス抗-ヒト CD25 (BD-555434) を含有する染色緩衝液により再懸濁させ、引き続き4℃で30分間インキュベーションした。細胞を2回洗浄した後、FITC 又は PerCpCy5.5 陽性細胞中の PE 及び APC 陽性細胞の割合 (%) を、フローサイトメトリーにより決定した。

【0583】

(熱安定性 (DSF))

10

20

30

40

50

【0584】

抗体の融解温度 (T_m) は、QuantStudio(商標)7 FlexリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いて調べた。抗体溶液 $19 \mu\text{L}$ を、 $62.5 \times \text{SYPRO}$ オレンジ溶液(Invitrogen)の $1 \mu\text{L}$ と混合し、 96 ウェルプレート(Biosystems)へ移した。このプレートを、 26°C から 95°C へ、 $0.9^\circ\text{C}/\text{分}$ の速度で加熱し、生じた蛍光データを収集した。異なる温度に関する蛍光変化の負の微分係数を計算し、最大値を融解温度 T_m として定義した。タンパク質が、複数のアンフォールディング転移を有する場合、最初の2つの T_m を報告し、 T_{m1} 及び T_{m2} と称した。データ収集及び T_m 計算は、操作ソフトウェアにより自動的に行った。

【0585】

(血清安定性)

【0586】

ヒト血液を、選択したドナーから、抗凝固剤を含まないポリスチレンチューブへ、新たに採取した。室温で30分間静置した後、ヒト血液を、 4000 rpm で10分間遠心分離し、血清層を収集した。遠心分離工程は、血清が透明になるまで繰り返した。検出した抗体を、収集した血清と1:9の比で混合し、アリコートをし、 37°C で指定された時間で採取した: 0日目、1日目、4日目、7日目及び14日目。これらの試料を、異なる時点で液体窒素中で急速凍結し、使用時まで -80°C で貯蔵した。試料を、FACSにより分析し、Jurkat CD3 T細胞及びRamos CD19 B細胞への結合能を、血清処理しない対応する抗体のそれとの比較により、評価した。

【0587】

(SPRによるFcγ受容体結合親和性)

【0588】

FcγRへの抗体結合親和性を、Biacore T200(又はBiacore 8K)を用いて検出した。各受容体を、抗-his抗体固定したCM5センサーチップ(GE)上に捕獲した。異なる濃度の抗体を、センサーチップ上に、流量 $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で注入し、会合相60秒間、引き続きの解離相60秒間であった。その後チップを、各結合サイクル後に、 10 mM グリシン($\text{pH} 1.5$)により再生した。

【0589】

ブランク表面及び緩衝液チャネルのセンサーグラムを、被験センサーグラムから減算した。実験データを、ラングミュア解析(FcγRIに関して)又は定常状態モデル(他の受容体に関して)を使用し、1:1モデルにフィットさせた。分子量 150 kDa を使用し、抗体の分子濃度を計算した。

【0590】

(ELISAによるC1q結合)

【0591】

ELISAプレート(Nunc)を、抗体試料により、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、 4°C で一晩コーティングした。ブロッキング及び洗浄後、C1qを、 $600 \mu\text{g}/\text{mL}$ から始めて、勾配希釈し、室温で2時間インキュベーションした。その後プレートを洗浄し、引き続きヒツジ抗-ヒトC1q Ab-HRPと共に1時間インキュベーションした。洗浄後、TMB基質を添加し、その相互作用を、 2 M HClにより停止した。 450 nm の吸光度を、マイクロプレートリーダー(Molecular Device)を用いて測定した。

【0592】

(SPRによるFcRn結合親和性)

【0593】

FcRnへの抗体結合親和性を、Biacore T200(又はBiacore 8K)を用いて検出した。各抗体を、CM5センサーチップ(GE)上に固定した。送液緩衝液(50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 150 mM NaCl 、 0.05% Tween 20、 $\text{pH} 6.0$)中の異なる濃度のFcRnを、センサーチップ上に、流量 $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で注入し、会合相60秒間、引き続きの解離相60秒間であった。その後チップを、各結合サイクル後に、1

× P B S (p H 7 . 4) により再生した。

【 0 5 9 4 】

ブランク表面及び緩衝液チャンネルのセンサーグラムを、被験センサーグラムから減算した。実験データを、定常状態モデルによりフィットさせた。分子量 4 5 K D a を使用し、F c R n の分子濃度を計算した。

【 0 5 9 5 】

(マウスの R a j i / P B M C モデルにおける有効性試験)

【 0 5 9 6 】

R a j i 腫瘍細胞(ATCC(登録商標)CCL-86(商標))を、インビトロにおいて、1 0 % ウシ胎仔血清、1 0 0 U / m l ペニシリン及び 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシンを補充した R P M I - 1 6 4 0 培地中の単層培養物として、空气中 5 % C O ₂ の大気において、3 7 ° C で維持した。腫瘍細胞は、週に 2 回慣習的に継代培養した。指数関数的増殖相の成長する細胞を収集し、腫瘍播種をカウントした。

【 0 5 9 7 】

ヒト P B M C を、フィコール-Paque Plus を製造業者の指示に従い使用し、ヘパリン全血から単離した。

【 0 5 9 8 】

各マウスを、D 0 に、P B S の 0 . 2 m l 中の Matrigel 及び新鮮 P B M C と混合した R a j i 腫瘍細胞により、右側側腹部皮下に同時接種した。抗体注射は、3 日目 (D 3) から行った (静注、B I W × 4 回)。

【 0 5 9 9 】

(試験製品調製)

【 0 6 0 0 】

【表 4 4】

化合物	パッケージ	調製	濃度 mg/ml
アインタイプ対照	9.38mg/ml	0.031ml 溶液 + 1.908ml PBS	1.5
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP	2.6mg/ml	B : 0.138ml 溶液 + 2.254 ml PBS	1.5
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP		B1 : 0.450ml B + 1.800ml PBS	0.3
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP		B2 : 0.450ml B1 + 1.800ml PBS	0.06

【 0 6 0 1 】

(腫瘍測定及びエンドポイント)

【 0 6 0 2 】

主要エンドポイントは、腫瘍成長が遅延されるか又はマウスが治癒したかであった。腫瘍サイズは、キャリパーを用い、2 方向で週に 2 回測定し、容積は、式： $V = 0.5 a \times b^2$ (式中、a 及び b は、各々、腫瘍の長径及び短径である) を用い、mm³ で表した。T / C 値 (%) は、抗腫瘍効果の指標である。

【 0 6 0 3 】

T G I は、各群について、式： $T G I (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ を用いて計算した；T_i は、所定日の治療群の平均腫瘍容積であり、T₀ は、治療開始日の治療群の平均腫瘍容積であり、V_i は、T_i と同じ比のビヒクル対照群の平均腫瘍容積であり、及び V₀ は、治療開始日のビヒクル群の平均腫瘍容積である。

【 0 6 0 4 】

(カニクイザル P K、毒性及び免疫原性)

【 0 6 0 5 】

1 匹の雄及び 1 匹の雌のカニクイザルに、W B P 3 4 3 8 の 1 m g / k g を、ボラス投与により 1 回投与した。この製剤は、2 0 m M NaAc-HAc、7 . 0 % (w / w) ショ糖、0 . 0 2 % (w / v) P S 8 0、p H 5 . 0 中に製剤化した。P K 用血液試料は、投与

前（－1日目）、0.25時間、0.5時間、1時間、4時間、8時間、24時間、3日目、7日目、14日目、21日目及び28日目に採取した。抗薬物抗体（ADA）試料は、3日目、14日目（312時間）及び28日目（480時間）に採取した。

【0606】

血清試料中のWBP3438及びADAの血清濃度を、ELISAにより決定した。サルにおけるWBP3438の血清濃度は、Phoenix WinNonlinソフトウェア(バージョン6.3、Pharsight, Mountain View, CA)を使用することにより、ノンコンパートメント薬物動態分析に供した。線形／対数台形式を、PKパラメータを得るために適用した。

【0607】

全般的健康状態及び外観に関するケージサイド観察、特に皮膚過敏を、観察した。血液学（CBC）のための全血試料分析及び化学検出のための血清分析を、各々、血液学的分析装置(ADVIA2120)及び化学(HITACHI 7180)により決定した。

【0608】

結果

【0609】

（カニクイザルCD19発現細胞株の作製）

【0610】

カニクイザルCD19発現細胞株WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9の発現は、フローサイトメリーにより、抗-CD19抗体を用いて検出した。WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9は、サルCD19の高発現を示した（図37）。

【0611】

（WuXiBody作製及び最適化）

【0612】

図1は、試験した抗体及びフォーマットの概略的表示を示す。抗-CD3抗体T3及び抗-CD19抗体U4の両方を開発した。定型的抗体に直交する独自の軽鎖－重鎖境界面をデザインするために、T3の定常領域（CL及びCH1）を、TCRの定常ドメインにより置き換えた。二重特異性抗体フォーマットE17及びF16をデザインするために、Fcドメインの「ノブイントゥホール」変異との接続したTCR－修飾したT3及び天然型U4を、使用した。

【0613】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP及びW3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP由来の抗-CD3及び抗-CD19結合部分の可変重鎖及び軽鎖配列を、以下に提供する：

【0614】

10

20

30

40

50

【表 4 5】

W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP及びW3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SP	抗-CD3抗体VH	DNA配列 (配列番号：353)	CAGGTGCAGCTTGTGCACTCTGGGGCA GAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTGTCAAGGTGTCAATGCAAGGCTAGCGGGTTCGCCTTTACTGACTACTACATCCACTGGGTGCGGCAGGCTCCCGGACAAGGTTGGAGTGGATGGGATGGATCTCCCCAGGCAATGTCAACACAAAGTACAACGAGAACTTCAAAGGCCGCTCACCATTACCGCCGACAAGAGCACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACACTGCCGTCTACTACTGTGCCAGGGATGGGTACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC
		アミノ酸配列 (配列番号：352)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVRQAPGGGLEWMGWISPGNVNTKYNNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLTVTVSS
	抗-CD3抗体VL	DNA配列 (配列番号：355)	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACTCCCTTGCTGTCTCCCTCGGCGAAAGAGCAACCATCAACTGCAAGAGCTCCCAAAGCCTGCTGAATCCAGGACCAGGAAGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATCTACTGGGCCTCCACCCGGCAGTCTGGGGTGCCCGATCGGTTTATGTGGATCTGGGAGCGGGACAGACTTCACATTGACAATTAGCTCACTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTGTACTCAGAGCCACACTCTCCGCACATTCGGCGGAGGGACTAAAGTGGAGATTAAAG
		アミノ酸配列 (配列番号：354)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPRDFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCTQSHTLRITFGGGTKVEIK
	抗-CD19抗体VH	DNA配列 (配列番号：368)	CAAATGCAGCTCGTCCAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCCGGGAATCCCGTCAAGGTCTCATGTAAGGCTAGCGGGTACGCATTCACTTCTACAACATGTACTGGGTGCGCCAGGCCAGAGGACAGAGGTTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCATACAACGCCGATACTACCTACAATCAGAAAGTTTAAAGGGCGGGTGACCATTACCCGGGATATGTCCACCTCACCCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCCTGACAACAGCCTATGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCACACTTGTGACTGTGAGCAGT
		アミノ酸配列 (配列番号：367)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYAFTSYNMYVVRQARGQRLEWIGYIDPYNADTIYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLTIAYAMDYWGQGLTVTVSS
	抗-CD19抗体VL	DNA配列 (配列番号：370)	GACATCCAGCTCACCCAATCCCTTCTTTCTCTCCGCAAGTGTGCGAGATAGGGTGACTATCACCTGCTCAGCTTCTTCAACCGTGAACATCATGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTACAGCACCTCCAATCTGGCCAGTGGAGTGCCAAGCCGGTTTACGCGGAGCGGCTCCGGCACTGAATTCACTTTGACAATTAGCAGCCTTCAGCCTGAGGACTTTGCCACATATTACTGTCAACAGTGGTCCAGCTACCCCTACACATTCGGGCAGGGCACAAAGCTGGAGATTAAAG
		アミノ酸配列 (配列番号：369)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSIVNYMHYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCHQWSSYPYTFGQGTKLEIK

10

20

30

40

【0615】

完全長W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP及びW3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SP配列を、以下に提供する：

【0616】

【表 4 6】

抗体	鎖	配列
W3438-T 3U4.E17 -1.αIgG 4.SP	T3-LC (配列番号 : 12)	DIYMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRFTGGGTKVEIK PDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSM DFKSNsAVAWsQKsDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	T3-HC (配列番号 : 25)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVVQRAPGQGLEWMGWISPGNV NTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGYSLYYFDYWGQG TLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWMVNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAFTWQNPRNHFRQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPYTQIVSAEAWGRYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	U4-LC (配列番号 : 23)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHVYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQWSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVYVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	U4-HC (配列番号 : 26)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYAFTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYIDPYNG DTTYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLTTAYAMDYWGQGTLY TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

10

20

【0 6 1 7】

30

40

50

【表 4 7】

抗体	鎖	配列
W3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SP	T3-LC (配列番号: 12)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIK PDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSM DFKSNsAVAWSQKSDFAcANAFQNSIIIPEDTFFPSPESS
	T3-HC (配列番号: 25)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHVVYRQAPGGGLEWMGWISPGNV NTKYNEFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQG TLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSEN DEWTDQRAKPVYTIQVSAEAWGRYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK
	U4-LC (配列番号: 23)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHVYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQWSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAP SVFIFFPSDEQLKSGTASVYCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	U4-HC (配列番号: 27)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMYWYRQARGQRLEWIGYIDPYNG DTTYNQKFGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLTTAYAMDYWGQGTLY TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKYDKRVGGGGSGGGGS QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMYWYRQARGQRLEWIGYIDPYNG DTTYNQKFGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLTTAYAMDYWGQGTLY TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKYDKRVESKYGPCCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

【0618】

(W3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SPの作製)

【0619】

抗体W3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SPの発現力価は、一過性発現を通じて90mg/Lよりも高い。2工程精製後、W3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SPの純度は、97.5%に達した(SEC-HPLC、図39)。W3438-T3U4.F16-1. uIgG4.SPは、還元条件下のSDS-PAGE上で、見かけの分子量75kDa、55kDa及び25kDaで移動し、これらは2本の重鎖及び2本の軽鎖に対応している。2本の軽鎖は、類似した分子量のために、重複している。この抗体は、非還元条件下では、見かけの分子量200kDaで移動し、これはインタクトな二重特異性分子を示している(図38)。

【0620】

(W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SPの作製)

【0621】

抗体W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SPの発現力価は、一過性発現を通じて100mg/Lよりも高い。2工程精製後、W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SPの純度は、95%に達した(SEC-HPLC、図41)。W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SPは、還元条件下のSDS-PAGE上で、見かけの分子量54kDa、56kDa及び25kDaで移動し、これらは2本の重鎖及

び2本の軽鎖に対応している。2本の軽鎖は、類似した分子量のために、重複している。この抗体は、非還元条件下では、見かけの分子量150kDaで移動し、これはインタクトな二重特異性分子を示している（図40）。

【0622】

（標的結合）

【0623】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのCD19及びCD3への結合を、Ramos細胞及びJurkat細胞上で、フローサイトメトリーにより試験した（図42A-42B）。抗体W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPは、Ramos細胞及びJurkat細胞に対し、各々、EC₅₀値が15.6nM及び47nMの、強力な結合活性を示した。

10

【0624】

W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPのCD19及びCD3への結合を、Ramos細胞及びJurkat細胞上で、フローサイトメトリーにより試験した（図43A-43B）。抗体W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPは、Ramos細胞及びJurkat細胞に対し、各々、EC₅₀値が1.8nM及び19.3nMの、強力な結合活性を示した。

【0625】

（交差種結合）

【0626】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのカニクイザルCD19への結合を、WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9細胞（CD19-発現細胞）において、フローサイトメトリーにより試験した（図44）。結合EC₅₀は、26nMであった。W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのカニクイザルCD3への結合を、W331-cynoPro1.ECD.His（カニクイザルCD3イプシロンタンパク質）において、ELISAにより試験した（図45）。結合EC₅₀は、0.04nMであった。

20

【0627】

（標的細胞への親和性）

【0628】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのヒトCD19及びCD3への結合親和性を、Ramos細胞及びJurkat細胞において、フローサイトメトリーにより試験した。結合IgG/遊離IgG、対、結合IgGを、図46A及び46Bにプロットした。CD19及びCD3への結合のフィットしたK_D値は、各々、23nM及び9.0nMであった。

30

【0629】

（標的細胞でのデュアル結合）

【0630】

CD3 T細胞及びCD19 B細胞を架橋するW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの活性を、予め標識したJurkat細胞及びRaji細胞を用い、フローサイトメトリーにより試験した（図47A-47B）。Q2は、架橋したJurkat細胞及びRaji細胞の集団を示す。陰性対照と比較すると、おおまかに細胞の18%は、二重特異性抗体W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPを通じて架橋された。

40

【0631】

（細胞傷害性アッセイ）

【0632】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの細胞傷害活性を、CD8⁺T細胞及びRaji細胞を用いて評価した。W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPは、4時間のインキュベーション後に迅速且つ有効な細胞溶解を誘導し（図48

50

A)、EC₅₀値は15 nMであった。最大細胞死滅割合は、90%であった。

【0633】

W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPの細胞傷害活性を、CD8⁺T細胞及びRaji細胞を用いて評価した。W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SPは、4時間のインキュベーション後に迅速且つ有効な細胞溶解を誘導し(図48B)、EC₅₀値は3.2 nMであった。最大細胞死滅割合は、90%であった。

【0634】

(標的特異的T細胞活性化)

【0635】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPを、CD19⁺標的細胞の存在又は非存在下で、活性化マーカーCD69及びCD25を通じて、T細胞活性化を示すアッセイにおいて調べた。結果は、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPは、CD19⁺標的細胞の存在下でのみ、用量依存型の様式でT細胞活性化マーカーCD25及びCD69の発現を誘導することを明らかにした(図49A-49D)。B細胞が存在しない場合、CD4⁺及びCD8⁺の両方のT細胞サブセットにおいて、CD25及びCD69の発現は、認められなかった。

【0636】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPはまた、CD19⁺標的細胞の存在又は非存在下で、サイトカイン放出のT細胞活性化アッセイにおいて調べた。結果は、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPは、CD19⁺標的細胞の存在下でのみ、用量依存型の様式でIFN- γ 及びTNF- α の放出を誘導することを明らかにした(図50A-50D)。B細胞が存在しない場合、CD4⁺及びCD8⁺の両方のT細胞サブセットにおいて、IFN- γ 及びTNF- α は検出されなかった。

【0637】

(熱安定性)

【0638】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPの熱安定性を、リアルタイムPCRを用いて調べた。W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのT_m1及びT_m2は、60.2℃及び72.7℃である。

【0639】

(血清安定性)

【0640】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPを、血清中、37℃で14日間インキュベーションした。0、1、4、7及び14日間インキュベーションした抗体の結合活性を、フローサイトメトリーにより検出した。結果は、W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのCD3及びCD19の両細胞への結合活性は、ヒト血清中で14日間インキュベーションした後、変化しなかったことを示している(図51A-51B)。

【0641】

(Fc γ 受容体結合)

【0642】

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPのFc γ RI、Fc γ RIIa(H167)、Fc γ RIIa(R167)、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa(F176)、Fc γ RIIIa(V176)及びFc γ RIIIbへの結合活性を、SPRにより調べた。親和性は、表39にまとめた。W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SPは、全てのFc γ 受容体に対し、典型的ヒトIgG4結合親和性を示した。

【0643】

10

20

30

40

50

【表 48】

表 39 : SPR による W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の Fc 受容体への親和性

Fc 受容体	K_D (M)
Fc γ RI	9.79E-09
Fc γ RIIa (H167)	2.05E-05
Fc γ RIIa (R167)	1.58E-05
Fc γ RIIb	2.41E-05
Fc γ RIIIa (F176)	2.93E-05
Fc γ RIIIa (V176)	1.40E-05
Fc γ RIIIb	>4.10E-05

10

【0644】

抗体の C1Q への結合活性を、ELISA により試験した。W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP は、ELISA において結合シグナルを示さず（図 52）、対照ヒト IgG1 抗体は、通常の結合シグナルを示した。

【0645】

(FcRn 結合)

【0646】

W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の FcRn への結合を、SPR により、pH6.0 で試験した。親和性は、ヒト IgG4 の FcRn への典型的親和性である、 $2.58 \mu\text{M}$ にフィットした。

20

【0647】

(PBMC/Raji 異種移植モデルの有効性試験)

【0648】

この試験において、NOG マウスにおいて Raji 細胞を有する混合した PBMC ヒト化モデルにおける W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の抗腫瘍有効性を、調べた。腫瘍成長曲線を、図 53 に示している。

【0649】

14 日目に、アイソタイプ対照治療群の平均腫瘍サイズは、 342 mm^3 に達した。W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の 1.5 mg/kg 及び 0.5 mg/kg による治療は、著しい抗腫瘍活性を生じた。平均腫瘍サイズは、各々、 78 mm^3 (T/C=23.0%、TGI=93.9%、 $p=0.016$) 及び 75 mm^3 (T/C=22.0%、TGI=95.3%、 $p=0.014$) であり、且つ高投与量レベル群の 1 匹の動物の腫瘍は、根絶されていた。W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP は、非常に低い投与量 (0.06 mg/kg) では、いかなる抗腫瘍活性も示さなかった。

30

【0650】

(カニクイザルにおける WuXiBody の薬物動態)

【0651】

カニクイザル血清中の W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の濃度を、ELISA により試験した（図 54）。計算した PK パラメータを、表 40 に列挙した。 1 mg/kg の単回 IV 注射に関する W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP の半減期は、152 時間であった。W3438-T3U4・E17-1・uIgG4・SP は、チンパンジーにおいて非常に短い半減期（1.5～2.6 時間）を有するブリナツモマブ（欧州医薬品庁審査報告書 EMA/CHMP/469312/2015）よりも、はるかに長い半減期をサルにおいて示した。

40

【0652】

50

【表 49】

表 40 : W3438-T3U4, E17-1, uIgG4, SP のカニクイザル PK

PKパラメータ	W3438-T3U4, E17-1, uIgG4, SP
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	60.4
$T_{1/2}$ (h)	152
$V_{d_{ss}}$ (L/kg)	0.0513
Cl (mL/min/kg)	0.00462
$AUC_{0-\text{last}}$ ($\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$)	3552
$AUC_{0-\text{inf}}$ ($\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$)	3708
$MRT_{0-\text{last}}$ (h)	157
$MRT_{0-\text{inf}}$ (h)	187

10

【0653】

(毒性)

【0654】

全てのサルは、本試験の全過程期間中、本薬物の忍容性が良かった。本試験の生存相(in-life phase)において、有害作用は認められなかった。食物摂取及び体重に明らかな変化はなかった。AST、ALT、WBC、HGB及びHCTを含む、血液学及び臨床化学に関するパラメータは一般に、基準範囲内であった。

【0655】

20

(免疫原性)

【0656】

W3438-T3U4, E17-1, uIgG4, SPの免疫原性試験結果を、図55 A-55 Bに示している。投与後3、14及び28日目のサル血清中のW3438-T3U4, E17-1, uIgG4, SPに対する抗薬物抗体(ADA)の力価は、投薬前と有意差を示さなかった。従ってW3438-T3U4, E17-1, uIgG4, SPの1mg/kgでの単回IV注射は、サルにおいて免疫原性ではないように見える。

【0657】

(実施例18: 二重特異性抗-CTLA-4×PD-1 WuXiBody)

(背景)

30

【0658】

癌免疫療法は、癌治療に関する活発な研究領域となってきた。細胞傷害性Tリンパ球-関連タンパク質4 (CTLA-4) は、免疫チェックポイントの検証された標的の一つである。T細胞活性化後、CTLA-4はそれらのT細胞上に、迅速に、一般にTCRとの抗原エンゲージメントの1時間以内に、発現される。CTLA-4は、CD28との競合を通じて、T細胞のシグナリングを阻害することができ、これはよく特徴付けられたT細胞共刺激シグナルを媒介する。抗原提示細胞上のそのリガンドCD80 (B7-1) 及びCD86 (B7-2) へのCD28結合は、インターロイキン-2及び抗-アポトーシス因子の産生を誘導することにより、T細胞増殖へつながる。CTLA-4のCD80及びCD86への親和性結合が、CD28のそれよりもはるかに高いために、CTLA-4は、CD80及びCD86上のCD28結合を打ち負かすことができ、これはT細胞活性化の抑制につながる。CTLA-4は、活性化されたT細胞上の誘導された発現に加え、調節T細胞(Treg)の表面上にも構成的に発現され、このことは、CTLA-4は、接触媒介性抑制に必要であり、且つトランスフォーミング増殖因子 β 及びインターロイキン-10などの免疫抑制性サイトカインのTreg産生と関連していることを示唆している。

40

【0659】

CTLA-4ブロックは、数多くの前臨床試験及び臨床試験において明らかにされたように、腫瘍退縮を誘導することができる。CTLA-4に対する2種の抗体が、臨床開発中である。イピリムマブ(MDX-010, BMS-734016)はIgG1- κ アイソタイプの完全

50

ヒト抗-CTLA-4モノクローナル抗体であるが、これは進行したメラノーマの治療のための単剤療法として承認された免疫調節薬である。提唱されたイピリムマブの作用機序は、活性化されたT細胞のサブセット上で発現されるCTLA-4の、プロフェッショナル抗原提示細胞上のCD80/CD86分子との相互作用の妨害である。これは、CTLA-4とCD80/CD86の相互作用により促進されたT細胞活性化の阻害性調節のブロックに起因した、T細胞の増強を生じる。生じるT細胞の活性化、増殖及び腫瘍へのリンパ球浸潤は、腫瘍細胞死に繋がる。その市販の剤形は、点滴用液剤について濃度5mg/mlである。イピリムマブはまた、前立腺癌及び肺癌を含む他の腫瘍型について臨床研究中でもある。臨床開発中の第二の抗-CTLA-4抗体であるトレメリムマブは、メラノーマ及び悪性中皮腫の単剤療法において評価された。

10

【0660】

プログラム細胞死-1(PD-1、CD279)は、活性化されたT細胞及び他の免疫細胞上に発現されるCD28ファミリーの一員である。PD-1のエンゲージメントは、これらの免疫細胞の機能を阻害する。PD-1は、2つの公知のリガンドPD-L1(B7-H1、CD274)及びPD-L2(B7-DC、CD273)を有し、両方共B7ファミリーに属する。PD-L1発現は、リンパ球及び末梢組織の様々な細胞型上で誘導性であるのに対し、PD-L2は、樹状細胞を含む骨髄細胞へ制限される。PD-1経路の主な役割は、組織及び臓器における炎症性免疫応答を減弱することである。

【0661】

CTLA-4をブロックするモノクローナル抗体(mAb)(イピリムマブ)及びPD-1をブロックするmAb(ニボルマブ)の併用による免疫療法は、いずれかのmAb単独により認められるものを超える臨床恩恵を示している。二重特異性抗-CTLA-4×PD-1 WuXiBodyは、両方のチェックポイント分子の同時ブロックを通じて抗腫瘍免疫を誘導するために、開発された。

20

【0662】

材料及び方法

【0663】

(全般的材料)

【0664】

全般的研究材料及びそれらの供給元を、下記表に列挙している：

30

【0665】

40

50

【表 50-1】

材料	供給業者	カタログ番号
Expi293F(商標)細胞	Thermo Fisher	Cat. A14527
ExpiFectamine293トランスフェクションキット	Thermo Fisher	Cat. A14524
Expi293F(商標)発現培地	Thermo Fisher	Cat. A1435101
リポフェクタミン(商標)2000トランスフェクション試薬	Thermo Fisher	Cat. 11888019
FreeStyle(商標)293-F細胞	Thermo Fisher	Cat. R79007
FreeStyle(商標)293発現培地	Thermo Fisher	Cat. 12338002
CHO-S細胞	Thermo Fisher	Cat. A1155701
FreeStyle(商標)CHO発現培地	GIBCO	Cat. 12851014
ウシ胎仔血清(FBS)	Corning	Cat. 35-076-CV
Opti-MEM	Thermo Fisher	Cat. 31985070
Niカラム	GE healthcare	Cat. 17-5247-01
プロテインAカラム	GE healthcare	Cat. 17-5438-02
Superdex200分取等級	GE Healthcare	Cat. 17-1043-01
HPLC-SEC	TOSO	Cat. 0008541
NuPAGE4%-12%ビス-トリスゲル	Thermo Fisher	Cat. NP0322BOX
ヒトCTLA-4: W316-hProl.ECD.His	Sino Biological	Cat. 11159-H08H
カニクイザルCTLA-4: W316-cProl.ECD.his	Sino Biological	Cat. 90213-C08H
ヒトPD-1: W305-hProl.ECD.His	本研究室	
カニクイザルPD-1: W305-cynoProl.ECD.His	R&D	Cat. R&D-8509-PD-050
ELISA用コーティング96-ウェルプレート	Nunc MaxiSorp、ThermoFisher	
FACS用U-底96-ウェルプレート	Corning-COSTAR	3799
ヒトPD-1+細胞株: W305-CHO-S.hProl.C6	本研究室	
カニクイザルPD-1+細胞株: W305-293F.cProl.FL.Pool	本研究室	
ヒトCTLA-4+細胞株: W316-293F.hProl.FL	本研究室	
カニクイザルCTLA-4+細胞株: W316-293F.cProl.FL.Pool	本研究室	
ヒトCD80+細胞株: W316-CHO-K1.hProl.L1.B9B11	本研究室	
ヒトCD86+細胞株: W316-CHO-K1.hProl.L2.A4A7	本研究室	
ヒトPD-1: W305-hProl.ECD.mFc	本研究室	
ヒトPD-1: W305-hProl.ECD.hFc	本研究室	
ヒトPD-1: W305-hProl.ECD.His	本研究室	
カニクイザルPD-1: W305-cProl.ECD.His	本研究室	
カニクイザルPD-1.hFcタンパク質	SinoBiological	90311C02H
ヒトCTLA-4: W316-hProl.ECD.mFc	本研究室	
ヒトCTLA-4: W316-hProl.ECD.hFc	本研究室	
ヒトCTLA-4: W316-hProl.ECD.His	本研究室	

10

20

30

40

50

【表 5 0 - 2】

カニクイザルCTLA-4: W316-cPro1.ECD.His	本研究室	
ヒトPDL1: W315-hPro1.ECD.mFc	本研究室	
カニクイザルPD-L1.hFc-ビオチン	本研究室	
ビオチン-標識W316.hPro1.ECD.hFc	本研究室	
ヒトCD80: W316-hPro1L1.ECD.His	本研究室	
WBP316-BMK1(イビリムマブ)	本研究室	
WBP305 BMK1(ニボルマブ)	本研究室	
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	本研究室	
アイソタイプ対照: WBP332-1.80.12.xAb.hIgG4	本研究室	
HRP-標識ヤギ抗-ヒトIgG Fc	Bethyl Laboratories	A80-304P
HRP-標識マウス抗-ヒトIgG Fc (CH2)	Thermo	MA5-16859
HRP-標識ヤギ抗-マウスIgG Fc	Bethyl Laboratories	A90-231P
HRP-標識ストレプトアビジン	Lifetechnologies	SNN1004
ビオチン-標識抗-His mAb	GenScript	A00613
FITC-標識ヤギ抗-ヒトIgG	Jackson	109-095-008
PE-標識ヤギ抗-ヒトIgG	Jackson	109-115-098
FITC-標識ヤギ抗-マウスIgG	Abcam	98716
PE-標識ストレプトアビジン	BD	554061
ヒトFicoll-Paque	StemCell	07861
単球濃縮キット	Miltenyi	Biotec-130-050-201
CD4 ⁺ T細胞濃縮キット	StemCell	19052
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T細胞濃縮キット	Miltenyi	130-093-631
組換えヒトGM-CSF	R&D	215-GM
組換えヒトIL-2	SL PHARM	
組換えヒトIL-4; 抗-IL-2Ab	R&D	AG1815401; MAB602
組換えヒトIFN- γ 標準	Peprotech	300-02
抗-IFN- γ 抗体	life technology	M700A;M7001B
H3-チミジン及びMicroScint	Perkin Elmer	NET027001MC
ウシ胎仔血清(FBS)	GIBCO	10100147
RPMI1640培地	GIBCO	22400089
DPBS	Corning	21-031-CVR
DELTA(登録商標)EuTDA細胞傷害試薬	PerkinElmer	A00116
CellTiter-Glo発光細胞生存性アッセイキット	Promega	G7573
カルセイン-AM	Corning-354216	354216
Far red	Invitrogen	C34572

【0 6 6 6】

(可溶性抗原の作製)

【0 6 6 7】

ヒトPD-1の細胞外ドメイン配列をコードしているDNA配列(Uniport番号: Q15116)を、Sangon Biotech(上海、中国)において合成し、次にC-末端に6×hisを持つ改変したpcDNA3.3発現ベクターへサブクローニングした。ヒト、カニクイザル及びマウスのCTLA-4並びにマウス及びカニクイザルのPD-1のタンパク質を、Sino Biologicalから購入した。

【0 6 6 8】

10

20

30

40

50

Exp i 2 9 3細胞(Invitrogen-A14527)を、精製した発現ベクターp c D N A 3 . 3により形質移入した。細胞を5日間培養し、上清を、Ni-NTAカラム(GE Healthcare、175248)を使用するタンパク質精製のために収集した。得られたヒトPD-1を、SDS-PAGE及びSECにより品質管理(QC)し、その後-80℃で貯蔵した。

【0669】

(参照抗体の作製)

【0670】

抗-CTLA-4抗体(WBP316-BMK1)、抗-PD-1抗体(WBP305-BMK1)の可変領域をコードしているDNA配列を、Sangon Biothec(上海、中国)において合成し、次にヒトIgG1又はヒトIgG4(S228P)の定常領域を持つ改変したp c D N A 3 . 4発現ベクターへサブクローニングした。抗-PD-1 WBP3055-1.153.7. u I g G 4 k及びWBP3055-1.103.11. u I g G 4 k抗体が、ヒトPD-1及びマウスPD-1によるラットの免疫処置後に産生され、これらをIgG4(S228P)フォーマットに変換した。ベンチマーク二重特異性抗-CTLA-4×PD-1抗体(WBP324-BMK1. IgG1. KDL)をコードしているDNA配列を合成した。

【0671】

VH及びVL遺伝子を含むプラスミドを、Exp i 2 9 3細胞へ同時形質移入した。細胞を、5日間培養し、上清を収集し、プロテインAカラム(GE Healthcare、175438)及びプロテインGカラム(GE Healthcare、170618)を使用し、タンパク質精製した。得られた抗体を、SDS-PAGE及びSECにより試験し、その後-80℃で貯蔵した。

【0672】

(標的-発現細胞株の作製)

【0673】

リポフェクタミン2000を使用し、CHO-S細胞又は293F細胞を、完全長ヒトPD-1又はマウスPD-1をコードしている遺伝子を含む発現ベクターにより、形質移入した。細胞を、適切な選択マーカ含有する培地において培養した。ヒトPD-1高発現性安定細胞株(WBP305. CHO-S. h P r o 1. C6)及びマウスPD-1高発現性安定細胞株(WBP305. 293F. m P r o 1. B4)を、限界希釈により得た。

【0674】

(二重特異性の抗-CTLA-4/PD-1二重特異性抗体の作製)

【0675】

W3248-U6T1. G25R-1. u I g G 4 . S Pの構築：5'末端から3'末端へ連結された、抗-PD-1重鎖可変領域、定常領域1、抗-CTLA-4重鎖可変領域、TCRベータ定常領域、並びにIgG4(S228P)定常領域2及び3をコードしているDNA配列を、改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターへクローニングした。TCRアルファ定常領域の5'側の抗-CTLA-4抗体軽鎖可変領域をコードしているDNA配列を、別の改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターにクローニングした。抗-PD-1軽鎖を、第三の改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターへクローニングした。

【0676】

W3248-U6T5. G25-1. u I g G 4 . S Pの構築：5'末端から3'末端へ連結された、抗-PD-1重鎖可変領域、TCRベータ鎖定常領域、抗-CTLA-4重鎖可変領域及びIgG4(S228P)をコードしているDNA配列を、改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターへクローニングした。TCRアルファ定常領域の5'側の抗-PD-1抗体軽鎖可変領域をコードしているDNA配列を、別の改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターにクローニングした。抗-CTLA-4軽鎖を、第三の改変したp c D N A 3 . 3発現ベクターへクローニングした。

【0677】

W3248-U6T1. G25R-1. u I g G 4 . S Pの関連配列を、以下に提供す

10

20

30

40

50

る：

【0678】

【表51】

LC1	アミノ酸配列 (配列番号：412)	SYELTQPLSVSVVALGQTARITCGGDNI GNKDVHWHYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSG IPEGFSGSNSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC2	アミノ酸配列 (配列番号：413)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWHYQQKPGQAPRLLIYGAFSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGGQTKVEIKPDIQ NPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKS NSAVAWSQKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
HC	アミノ酸配列 (配列番号：414)	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGGGG SIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKYDKRVGGGGSGG GGSQVQLVESGGGVVQPG RSLRLS CAASGFTFS SYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISY DGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWG QGTLVTVLEDLKNVFPPEVA VFEPESEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVYN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLS ENDEWTDRAKPYVTQIYSAEAWGRYGP PCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLG

10

20

【0679】

W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SPの関連配列を、以下に提供する：

【0680】

【表52】

LC1	アミノ酸配列 (配列番号：415)	SYELTQPLSVSVVALGQTARITCGGDNI GNKDVHWHYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSG IPEGFSGSNSGNTATLTISRAGAGDEADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQNPDP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFA CANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
LC2	アミノ酸配列 (配列番号：416)	EIVLTQSPDFQS VTPKEKVTITCSANSALSYMYWHYQQKPDQSPKLWVHGTSNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHWVSNTQWTFGGGQTKVEIKRTVAAP SVFI FPPSDEQLKSGTASVYCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
HC	アミノ酸配列 (配列番号：417)	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SHAMSWVRQAPGKGLEWVSTITGGGG SIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQG TLVTVLEDLKNVFPPEVA VFEPESEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVYNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSEN DEWTDRAKPYVTQIYSAEAWGRGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKYSCA SGYTFITNYFMNWVRQAPGGGLEW MGRVDPEQGRADYAEKFKRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARRAMDNYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKYDKRVESKYGP PCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLG

30

40

【0681】

50

両方の二重特異性抗体に関して、1種の重鎖発現ベクター及び2種の軽鎖発現ベクターを、Exp i 2 9 3細胞(ThermoFisher-A14527)へ、製造業者の指示に従い、同時形質移入した。形質移入の5日後、上清を収集し、プロテインAカラム(GE Healthcare-17543802)及び更にサイズ排除クロマトグラフィー(GE Healthcare-17104301)を用いて精製した。抗体濃度は、Nano Dropにより測定した。エンドトキシン検出キット(GenScript-L00350)を用いることにより、低エンドトキシンレベルが確認され、2種の二重特異性抗体のエンドトキシンレベルは、10 EU/mg未満であった。タンパク質の純度は、SDS-PAGE及びHPLC-SECにより評価した。

【0682】

(インビトロ特徴決定)

10

【0683】

(示差走査蛍光測定(DSF))

【0684】

DSFアッセイを、7500 FastリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いて行った。簡単に述べると、二重特異性抗体溶液19 µLを、62.5×SYPROオレンジ溶液(ThermoFisher-S6650)1 µLと混合し、96ウェルプレートへ加えた。このプレートを、26℃から95℃まで、2℃/分の速度で加熱し、生じる蛍光データを収集した。データを、その操作ソフトウェアにより自動的に解析し、 T_h を、温度に関する発生蛍光データの負の微分係数の最大値を採用することにより、算出した。 T_{on} は、転移前ベースラインから減少するように始まる負の微分係数プロットの温度として、おおまかに決定することができる。

20

【0685】

(FACSによるヒトPD-1結合)

【0686】

操作したヒトPD-1発現細胞W305-CHO-S.hPro1.C6を、U-底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)に、 1×10^5 個細胞/ウェルで播種した。200 nMから0.002 nMまで、1%BSA DPBSにおいて3.16倍でタイトレーションした抗体を、細胞へ添加した。プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。1:125希釈したPE-標識ヤギ抗-ヒト抗体(Jackson 109-115-098)の100 µLを、各ウェルに添加し、プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。抗体の細胞上への結合を、フローサイトメトリーにより試験し、平均蛍光強度(MFI)をFlowJoにより解析した。

30

【0687】

(FACSによるカニクイザルPD-1-結合)

【0688】

操作したカニクイザルPD-1発現細胞W305-293F.cynoPro1.FL.poolを、U-底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)に、 1×10^5 個細胞/ウェルで播種した。40 µg/mLから0.0001526 µg/mLまで、1%BSA DPBSにおいて4.0倍でタイトレーションしたAbを、細胞へ添加した。プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。洗浄後、1:150希釈したPE-標識ヤギ抗-ヒト抗体(Jackson 109-115-098)の100 µLを、各ウェルに添加し、プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。抗体の細胞への結合を、フローサイトメトリーにより試験し、平均蛍光強度(MFI)をFlowJoにより解析した。

40

【0689】

(FACSによるヒトCTLA-4結合)

【0690】

操作したヒトCTLA-4発現細胞W316-293F.hPro1.FLを、U-底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)に、 1×10^5 個細胞/ウェルで播種した。200 nMから0.002 nMまで、1%BSA DPBSにおいて3.16倍でタイトレーションしたAbを、細胞へ添加した。プレートを、4℃で1時間インキュベーションした

50

。洗浄後、1：150希釈したPE-標識ヤギ抗-ヒト抗体(Jackson 109-115-098)の100 μ Lを、各ウェルに添加し、プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。抗体の細胞への結合を、フローサイトメトリーにより試験し、平均蛍光強度(MFI)をFlowJoにより解析した。

【0691】

(FACSによるカニクイザルCTLA-4結合)

【0692】

操作したヒトCTLA-4発現細胞W316-293F.cynoPro1.F1.Poolを、U底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)に、 1×10^5 個細胞/ウェルで播種した。40 μ g/mLから0.00004 μ g/mLまで、1%BSA DPBSにおいて4.0倍でタイトレーションしたAbを、細胞へ添加した。プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。洗浄後、1：150希釈したPE-標識ヤギ抗-ヒト抗体(Jackson 109-115-098)の100 μ Lを、各ウェルに添加し、プレートを、4℃で1時間インキュベーションした。抗体の細胞への結合を、フローサイトメトリーにより試験し、平均蛍光強度(MFI)をFlowJoにより解析した。

【0693】

(ELISAによるhPD-1及びhCTLA-4デュアル結合)

【0694】

二重特異性抗体は、hPD-1及びhCTLA-4の両方に結合することができるかどうかを試験するために、ELISAアッセイを、以下のように開発した。96-ウェルELISAプレート(Nunc MaxiSorp、ThermoFisher)を、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液中の0.5 μ g/mL抗原-1(hPD-1-ECD、W305-hPro1.ECD.mFc)により、4℃で一晩コーティングした。PBS中に溶解した2%(w/v)ウシ血清アルブミン(Pierce)による1時間のブロック工程後、2%BSA PBSを含有するPBS中の異なるPD-1 $\times$ CTLA-4二重特異性抗体の連続希釈物を、プレート上で室温で1時間インキュベーションした。インキュベーションに続けて、プレートを、0.5%(v/v)Tween 20を含有するPBSの300 μ L/ウェルで3回洗浄した。0.5 μ g/mL抗原-2(hCTLA-4-ECD、W316-hPro1.ECD.hFc.ピオチン)をプレートへ添加し、この混合物を1時間インキュベーションした。プレートを3回洗浄した後、ストレプトアビジン-HRP(Lifetechnologies、#SNN1004)(1：20000希釈した)を添加し、プレート上で、室温で1時間インキュベーションした。0.5%(v/v)Tween 20を含有するPBSの300 μ L/ウェルで6回洗浄した後、検出のために、1ウェルあたり100 μ Lテトラメチルベンジジン(TMB)基質を添加した。およそ5分後、100 μ L/ウェルの2M HClの添加により、反応を停止した。ウェルの吸光度を、マルチウェルプレートリーダー(SpectraMax(登録商標)M5e)により、450 nmで測定した。

【0695】

(FACSによるhPD-1及びhCTLA-4デュアル結合)

【0696】

この二重特異性抗体が、hPD-1及びhCTLA-4の両方へ結合することができるかどうかを試験するために、FACSアッセイを以下のように開発した。操作したヒトPD-1及びCTLA-4発現細胞W305-CHO-S.hPro1.C6及びW316-293F.hPro1.F1を、各々、50 nMのカルセイン-AM(Corning-354216)及び20 nMのファアレッド(Invitrogen-C34572)で、37℃で20分間染色した。PBS中に溶解した1%(w/v)ウシ血清アルブミン(Pierce)で2回洗浄した後、混合したhPD-1(5E4)及びhCTLA-4(5E4)細胞を、U底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)中に 1×10^5 個細胞/ウェルで播種した。上清の除去後、1%BSA DPBSで7.5 nMから0.83 nMまで3 $\times$ 連続希釈した抗体を、細胞へ添加した。プレートを、4℃で1.5時間インキュベーションした。細胞を、フローサイトメトリーにより試験し、二重陽性細胞の割合(%)を、FlowJoにより解析した。

【0697】

(ヒトPD-1-競合的FACS)

【0698】

この二重特異性抗体が、hPD-1タンパク質へのhPD-L1結合をブロックするかどうかを試験するために、競合的FACSを行った。簡単に述べると、操作されたヒトPD-1発現細胞W305-CHO-S、hPro1.C6(研究室内)を、U底96-ウェルプレート(COSTAR 3799)内に 1×10^5 個細胞/ウェルで播種し、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトPD-L1タンパク質W315-hPro1.ECD.mFcと結合させた200nMから0.002nMまでのヒトPD-L1を、細胞へ添加した。プレートを、 4°C で1時間インキュベーションした。洗浄後、W315-hPro1.ECD.mFcのヒトPD-1発現細胞への結合を、FITC-標識ヤギ抗-マウス抗体(abcam 98716、1:125)により検出した。抗体の細胞への競合結合を、フローサイトメトリーにより試験し、平均蛍光強度(MFI)を、FlowJoにより解析した。

10

【0699】

(ヒトCD80へのヒト/カニクイザルCTLA-4結合のブロック)

【0700】

ELISAを使用し、この二重特異性抗体は、hCD80タンパク質へのhCTLA-4結合をブロックするかどうかを試験した。簡単に述べると、平底96-ウェルプレート(Nunc MaxiSorp、ThermoFisher)を、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ W316-hPro1.ECD.hFcにより、 4°C で一晩予めコーティングした。2%BSAでブロックした後、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ヒトCD80タンパク質W316-hPro1.L1.ECD.Hisに結合させた400nMから0.04nMのAbまでの、3.16倍でタイトレーションしたAbの100 μL を、各ウェルにピペティングし、外界温度で1時間インキュベーションした。インキュベーションに続き、プレートを、0.5%(v/v)Tween20を含有するPBSの300 μL /ウェルで3回洗浄し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン-標識抗-His mAb(GenScript-A00613)の100 μL /ウェルを、プレートへ添加し、1時間インキュベーションした。6回洗浄後、W315-hPro1.L1.ECD.HisのWBP316-hPro1.ECD.hFcへの結合を、ストレプトアビジン-HRP(Lifetechnologies、#SNN1004)(1:20000希釈した)により検出した。TMB基質100 μL を分散することにより、発色させ、次に100 μL の2N HClにより停止した。吸光度を、マイクロプレート分光光度計(SpectraMax(登録商標)M5e)を用い、450nmで測定した。

20

30

【0701】

競合的FACSを使用し、これらの抗体は、細胞表面上のhCD80へのヒト又はカニクイザルCTLA-4結合をブロックするかどうかを試験した。簡単に述べると、ヒトCD80-発現CHO-K1細胞を、96-ウェルプレート(COSTAR 3799)の各ウェルへ、 1×10^5 個/ウェルで添加し、1500rpmで、 4°C で4分間遠心分離し、その後上清を除去した。被験抗体の連続希釈物、陽性対照及び陰性対照を、ビオチン化したヒトCTLA-4.ECD.hFcと混合した。細胞表面上のリガンドの異なる密度のために、hCTLA-4.ECD.hFc-ビオチンの0.066~0.037 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、ヒトCD80-発現細胞のために使用した。次に、抗体及びCTLA-4の混合物を、細胞へ添加し、 4°C で1時間インキュベーションした。細胞を、200 μL のFACS洗浄緩衝液(1%BSAを含有するDPBS)により2回洗浄した。FACS緩衝液中に1~600希釈したストレプトアビジンPE(BD Pharmingen-554061)を、細胞へ添加し、 4°C で1時間インキュベーションした。追加の洗浄工程を、200 μL のFACS洗浄緩衝液により2回行い、引き続き1500rpmで、 4°C で4分間遠心分離した。最後に、細胞を、100 μL のFACS洗浄緩衝液中に再懸濁し、蛍光値を、フローサイトメトリーにより測定し、FlowJoにより解析した。

40

【0702】

(CTLA-4及びPD-1への親和性)

50

【0703】

S P R 技術を使用し、抗体の C T L A - 4 又は P D - 1 の E C D への会合定数 (k_a) 及び解離定数 (k_d) を測定した。親和定数 (K_D) を、結果的に決定した。

【0704】

Biacore T200、シリーズ S センサーチップ C M 5、アミン結合キット、及び 10 × H B S - E P は、GE Healthcare から購入した。ヤギ抗 - ヒト I g G F c 抗体は、Jackson ImmunoResearch Lab (カタログ番号 109-005-098) から購入した。固定工程において、活性化緩衝液を、400 mM E D C 及び 100 mM N H S を、注入の直前に混合することにより調製した。C M 5 センサーチップを、活性化緩衝液により 420 秒間活性化した。次に 10 mM N a A c (p H 4.5) 中のヤギ抗 - ヒト I g G F c γ 抗体 30 μ g / mL を、F c 1 - F c 4 チャンネルへ、200 秒間かけて、流量 5 μ L / 分で注入した。チップは、1 M エタノールアミン - H C l (GE) により、失活させた。その後抗体を、チップ上で捕獲した。簡単に述べると、送液緩衝液 (H B S - E P +) 中の抗体 4 μ g / mL を、F c 3 チャンネルへ、30 秒かけて、流量 10 μ L / 分で個別に注入した。C T L A - 4 又は P D - 1 の被検体 E C D の 8 種の異なる濃度 (20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 及び 0.15625 nM) 及びブランク送液緩衝液を、F c 1 - F c 4 チャンネルへ、流量 30 μ L / 分で順に、120 秒の会合相、それに続く 240 秒の解離相で注入した。各解離相の後、再生緩衝液 (10 mM グリシン、p H 1.5) を、10 μ L / 分で 30 秒間注入した。

【0705】

(ヒト血清安定性)

【0706】

抗体を、新たに単離されたヒト血清中で、37℃でインキュベーションした。指定した時点で、血清処理試料のアリコートをし、インキュベーターから取りだし、液体窒素で瞬間凍結し、その後デュアル - 結合 E L I S A 試験が準備できるまで、-80℃で貯蔵した。凍結試料は、安定性試験の直前に、迅速に解凍した。簡単に述べると、プレートを、h C T L A 4 . E C D . h F c (研究室内) の 0.5 μ g / mL により、4℃で一晩予めコーティングした。1時間ブロックした後、被験抗体を、様々な濃度で、プレートへ添加した。プレートを、外界温度で 1 時間インキュベーションした。インキュベーションに続けて、プレートを、0.5% (v / v) T w e e n 20 を含有する P B S の 300 μ L / ウェルで 3 回洗浄した。次に 0.1 μ g / mL の h P D - 1 - E C D . ビオチンをプレートへ添加し、この混合物を、1 時間インキュベーションした。プレートを 3 回洗浄した後、ストレプトアビジン - H R P (Lifetechnologies、#SNN1004) (1 : 20000 希釈した) を添加し、プレート上で室温で 1 時間インキュベーションした。0.5% (v / v) T w e e n 20 を含有する P B S の 300 μ L / ウェルで 6 回洗浄した後、検出のために、100 μ L / ウェルのテトラメチルベンジジン (T M B) 基質を添加した。反応を、およそ 5 分後に、100 μ L / ウェルの 2 M H C l の添加により停止した。ウェルの吸光度を、マイクロウェルプレートリーダー (SpectraMax (登録商標) M5e) により、450 nm で測定した。

【0707】

結果

【0708】

(二重特異性抗体の発現及び精製)

【0709】

S D S - P A G E (図 56A) 及び S E C - H P L C (図 56B) の両方で分析した、二重特異性抗体の純度は、90% 以上であった。

【0710】

(W u X i B o d y の D S F)

【0711】

D S F を使用し、W u X i B o d y の T_m を測定した。図 57 に示したように、W 3 2

10

20

30

40

50

48-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、各々、60.8℃及び63.4℃のTh1を有した。

【0712】

(ヒト及びカニクイザルPD-1への結合)

【0713】

この二重特異性抗体は、ヒトPD-1 (図58) 及びカニクイザルPD-1 (図59) へ結合することができる。W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SPのヒトPD-1-結合活性は、FACSにおいて、WBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPよりもわずかに良かった。W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、各々、1.24nM及び1.32nMのヒトPD-1への親和性を有した (図62)。

10

【0714】

(ヒト及びカニクイザルCTLA-4への結合)

【0715】

精製した二重特異性抗体は、FACSにおいて試験したように、ヒトCTLA-4へ結合した (図60)。2種の二重特異性抗体はまた、カニクイザルCTLA-4へも結合した (図61)。W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、各々、0.0356nM及び0.357nMの、ヒトCTLA-4への親和性を有した (図62)。

【0716】

(CTLA-4及びPD-1への同時結合)

【0717】

この二重特異性抗体は、両方の標的へ結合することができるかどうかを試験するために、ELISA及びFACSを使用した。ELISAにおいて、ヒトPD-1を、プレート上にコーティングした。二重特異性抗体の添加後、ビオチン化したCTLA-4を使用し、結合した二重特異性抗体を検出した。図66に示したように、W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、PD-1及びCTLA-4の両方へ結合することができ、EC50は0.1072nMから0.0710nMであり、これは二重特異性参照抗体のWBP324 B MK1 (EC50=0.0599nM) と同等であった。FACSにおいて、W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPの両方は、PD-1⁺細胞及びCTLA-4⁺細胞へ同時に結合することができる (図67)。

20

【0718】

(ヒト又はカニクイザルCTLA-4のCD80結合への結合ブロック)

【0719】

競合的FACSを使用し、CTLA-4のそのリガンドCD80の二重特異性抗体によるブロックを試験した。W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、CD80へのCTLA-4結合をブロックし、IC50は4.300nM及び0.7581nMであった (図64)。

30

40

同様に、二重特異性抗体はまた、ヒトCD80⁺細胞へのカニクイザルCTLA-4の結合もブロックする (図65)。

【0720】

(PD-1のそのリガンドへの結合のブロック)

【0721】

競合的FACSを使用し、PD-1のそのリガンドPD-L1の二重特異性抗体によるブロックを試験した。W3248-U6T1. G25R-1. uIgG4. SP及びWBP3248-U6T5. G25-1-uIgG4. SPは、PD-L1へのPD-1結合をブロックし、IC50は、1.670nM及び1.917nMであった (図63)。

【0722】

50

(血清安定性)

【0723】

2種の二重特異性抗体は、37℃のヒト血清で、14日間インキュベーションし、ヒトCTLA-4及びPD-1へのそれらのデュアル結合を、ELISAにおいて測定した。図68A及び68Bに示したように、標的へのW3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP及びWB P3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SPのデュアル結合は、経時的に変化せず、このことはこれら2種の二重特異性抗体は、37℃のヒト血清中で少なくとも14日間は安定していたことを示唆している。

【0724】

本開示は、特に具体的実施態様を参照して示され且つ説明されているが、形状及び詳細における様々な変更を、本明細書において開示されたような本開示の精神及び範囲から逸脱することなく行うことができることは当業者により理解されなければならない。

10

20

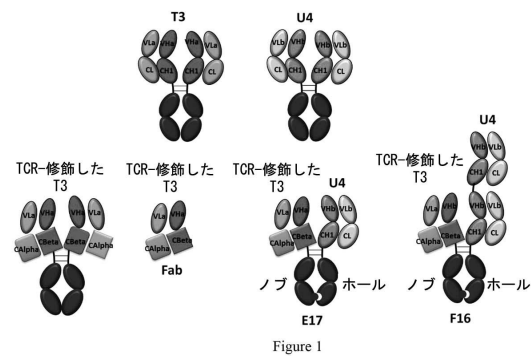
30

40

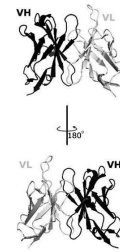
50

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

【図 2 B】



【図 2 C】



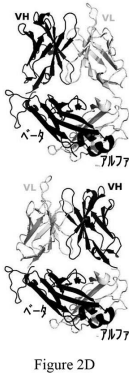
20

30

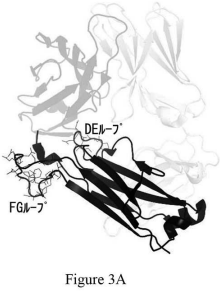
40

50

【図 2 D】



【図 3 A】

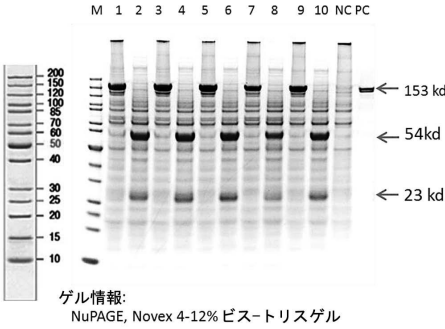


10

【図 3 B】

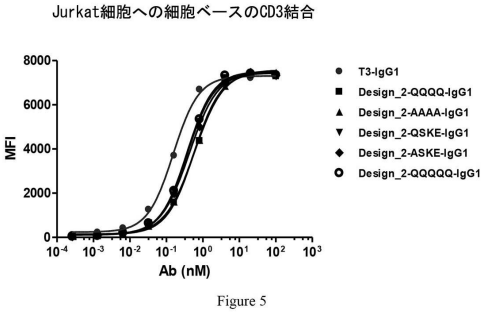


【図 4】

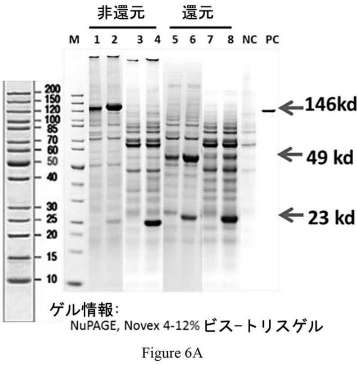


20

【図 5】



【図 6 A】



30

40

50

【図 6 B】

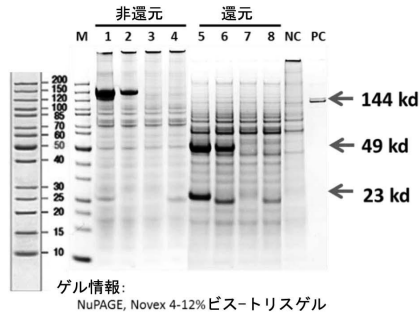


Figure 6B

【図 7 A】

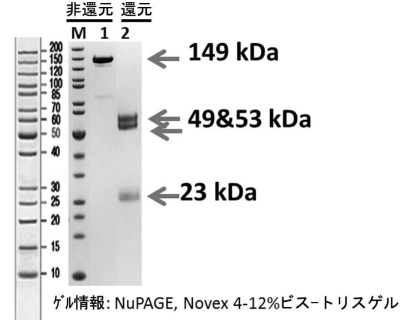


Figure 7A

10

【図 7 B】

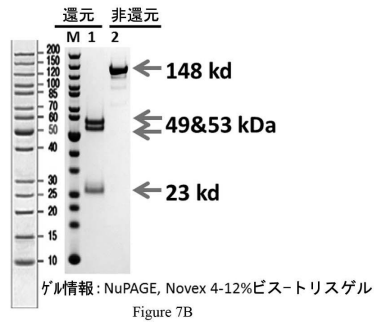


Figure 7B

【図 7 C】

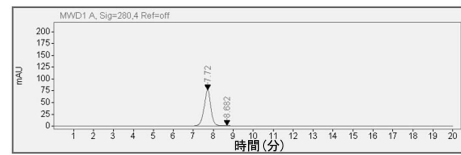


Figure 7C

20

【図 7 D】

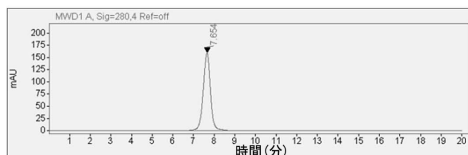


Figure 7D

【図 8】

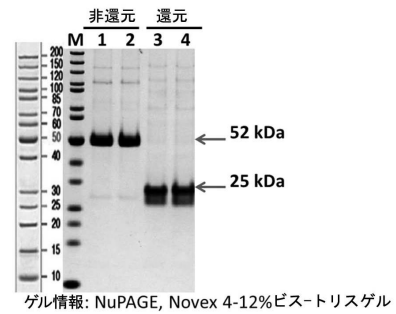


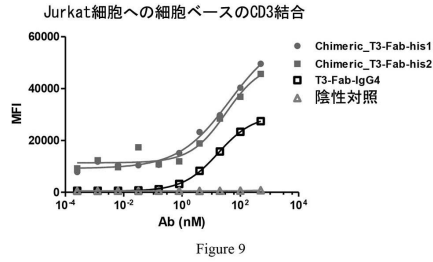
Figure 8

30

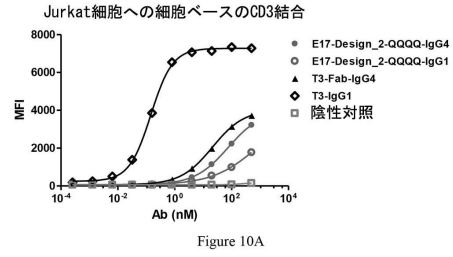
40

50

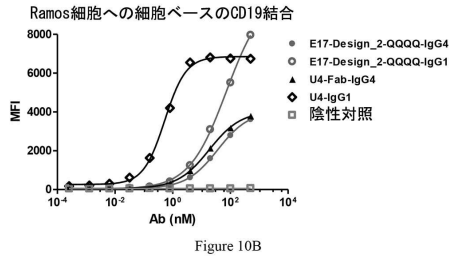
【図 9】



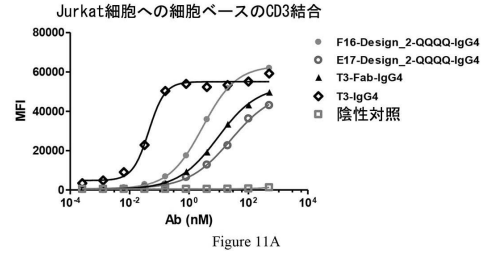
【図 10 A】



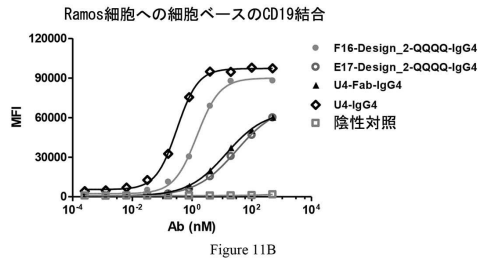
【図 10 B】



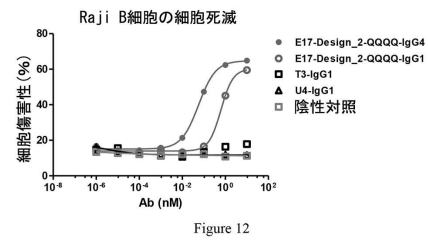
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 12】



10

20

30

40

50

【図 1 3】

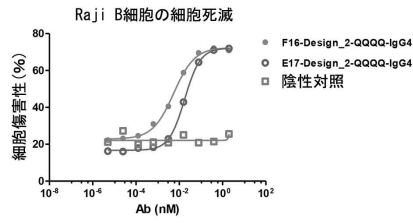
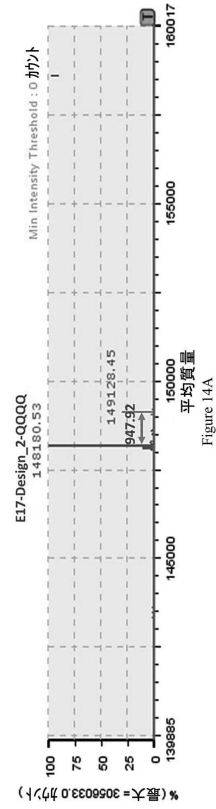
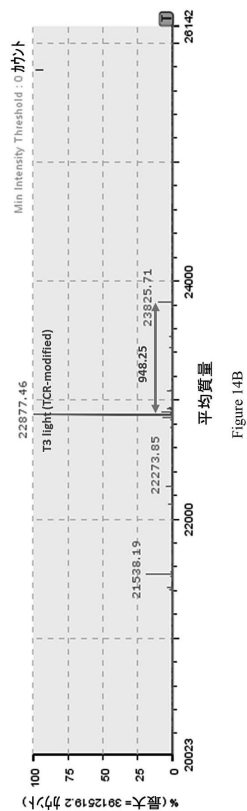


Figure 13

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【図 1 5 A】

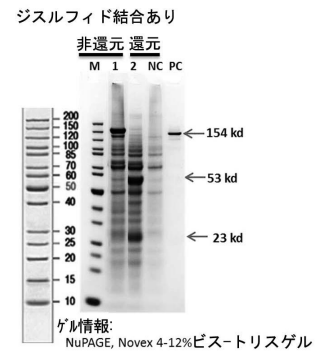


Figure 15A

10

20

30

40

50

【図 1 5 B】

ジスルフィド結合なし

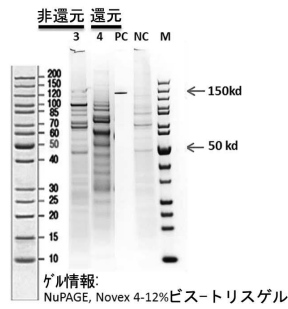


Figure 15B

【図 1 6】

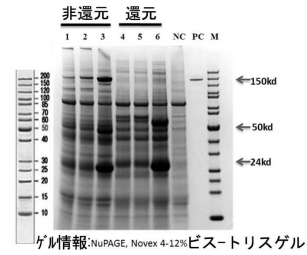


Figure 16

10

【図 1 7 A】

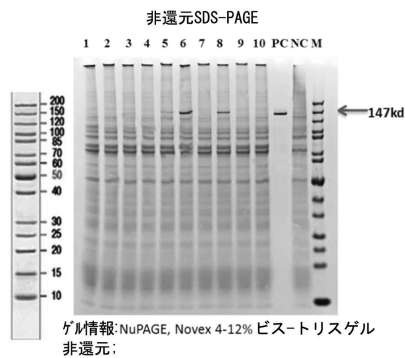


Figure 17A

【図 1 7 B】

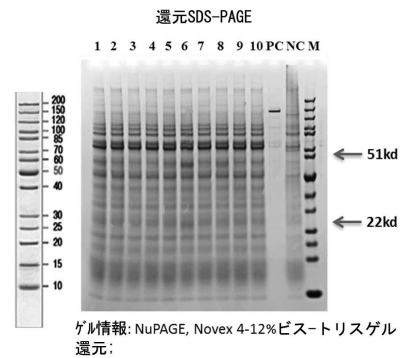


Figure 17B

20

【図 1 8 A】

TCRアルファ鎖定常領域配列:

TRAC_Human	PNTQNPDAV YQLRDSKSSD KSYCLTFDFD SQTNYSGSKD SDVYITDKTV
4LAT_Alpha_Crystal	PDIQNPDAV YQLRDSKSSD KSYCLTFDFD SQTNYSGSKD SDVYITDKTV
TRAC_Human	LDMSMPKRS NSIAWNSKS DFACANAPNN STIPEDTFPP SPSSSCDVLL
4LAT_Alpha_Crystal	LDMSMPKRS NSIAWNSKS DFACANAPNS STIPEDTFPP SPSSSCDVLL
TRAC_Human	VEKSPETDTN LNFQNLVIG FRILLKVG ENLMLRLW SS
4LAT_Alpha_Crystal	VEKSPETDTN LNFQNLVIG FRILLKVG ENLMLRLW SS

配列番号:254
配列番号:255

Figure 18A

【図 1 8 B】

TCRベータ鎖定常領域配列:

TRBC1_Human	EDUNKVFPPPE VAYFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGEFFPH VELSWMVNGK
TRBC2_Human	EDUNKVFPPPE VAYFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGEFFPH VELSWMVNGK
4LAT_Beta_Crystal	EDUNKVFPPPE VAYFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGEFFPH VELSWMVNGK
TRBC1_Human	EVHSGYSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RYSATFQNP RNHRCQVGF
TRBC2_Human	EVHSGYSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RYSATFQNP RNHRCQVGF
4LAT_Beta_Crystal	EVHSGYSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RYSATFQNP RNHRCQVGF
TRBC1_Human	YGLSENDEWT QORAKPTQI VSAEAWGRAD CGFTSYSVQQ GYLSATILYE
TRBC2_Human	YGLSENDEWT QORAKPTQI VSAEAWGRAD CGFTSYSVQQ GYLSATILYE
4LAT_Beta_Crystal	YGLSENDEWT QORAKPTQI VSAEAWGRAD CGFTSYSVQQ GYLSATILYE
TRBC1_Human	ILLGKATLYA VLVSALYMA MYRKRDP
TRBC2_Human	ILLGKATLYA VLVSALYMA MYRKRDRG
4LAT_Beta_Crystal	ILLGKATLYA VLVSALYMA MYRKRDRG

配列番号:256
配列番号:257
配列番号:258

Figure 18B

30

40

50

【図 18 C】

プレーアルファ鎖定常領域配列:

PTCRA_HUMAN	MAGTWLLLL ALGCPALPTG VGGTFPFSLA PFMELVDGK QQWVYCLVL
30F6_PreAlpha_Crystal	-----GARMPTG VGGTFPFSLA PFMELVDGK QQWVYCLVL
PTCRA_HUMAN	DVAPPGLDSP IWFSGAGSA LDAFTYGFSP ATDGTWTLA HLSLPSELA
30F6_PreAlpha_Crystal	DVAPPGLDSP IWFSGAGSA LDAFTYGFSP ATDGTWTLA HLSLPSELA
PTCRA_HUMAN	SWEPLVCHTG PGAECHSEST QPMHLSGEAS TARTCPQEPIL RCTVGALML
30F6_PreAlpha_Crystal	SWEPLVCHTG PGAECHSEST QPMHLSGEAS TARTC-----SGDD DDK-----
PTCRA_HUMAN	GVLRLLLEL LLFDLLTCS CLCDPAGPLP SPATTILRLA LGSRLHPAT
30F6_PreAlpha_Crystal	-----
PTCRA_HUMAN	ETGGREATSS PRPQPRDRRW GDTTPGRKPG SPVVGESYLL SSYPTCPAQA
30F6_PreAlpha_Crystal	-----
PTCRA_HUMAN	WCSRSALRP SSSLAFFAG DLPPPLQAGA A
30F6_PreAlpha_Crystal	-----

Figure 18C

【図 18 D】

デルタ鎖定常領域配列:

TRAB_Human	MLFSSLLCYF VAFSYSGSSV AQRYTQAGSS VSMPVKRAVT LNCLEYTSWW
4LFI_Delta_Crystal	-----ETG AQRYTQAGSS VSMPVKRAVT LNCLEYTSWW
TRAB_Human	SVYTFYVQL PSKEMIFLIR QGSDEQNAS GRYSYNFKKA AKSVALTISA
4LFI_Delta_Crystal	SVYTFYVQL PSKEMIFLIR QGSDEQNAS GRYSYNFKKA AKSVALTISA
TRAB_Human	LQLEDSARYF CALCESPLFP RGNHYITDKL IFGGTRVTV EPRSQPHIKP
4LFI_Delta_Crystal	LQLEDSARYF CALGD-----PGGLATDKL IFGGTRVTV EPRSQPHIKP
TRAB_Human	SVFYMNCTN VACLVEFPF KDRIINLYSS KKITEFPPI VISPSGKYN
4LFI_Delta_Crystal	SVFYMNCTN VACLVEFPF KDRIINLYSS KKITEFPPI VISPSGKYN
TRAB_Human	VILGAYEDSN SYTUSVQHDN KTVISTDEEV KTDSTHWRP KETENTAQPS
4LFI_Delta_Crystal	VILGAYEDSN SYTUSVQHDN KTVISTDEEV KTDSTHWRP KETENTAQPS
TRAB_Human	K-----SCHYFKA IVHTKYNMM SLTVLGLRML FAKTVAVNPL LTAKLFFL
4LFI_Delta_Crystal	KSASGLVPR-----

Figure 18D

【図 18 E】

ガンマ鎖定常領域配列:

TRBC1_Human	DQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQAGTY LCLLEKFPFD VIKHMQEKK
4LFI_Gamma_Crystal	DQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQAGTY LCLLEKFPFD VIKHMQEKK
TRBC2_Human	DQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQAGTY LCLLEKFPFD IIKHMQEKK
TRBC1_Human	SNILGSQEG NTMKNDTYM KFSNLTYPEK SLQKEHRCIV RHENNNGVD
4LFI_Gamma_Crystal	SNILGSQEG NTMKNDTYM KFSNLTYPEK SLQKEHRCIV RHENNNGVD
TRBC2_Human	SNILGSQEG NTMKNDTYM KFSNLTYPEK SLQKEHRCIV RHENNNGVD
TRBC1_Human	QEIEPPPIKT DVTIMQPKD-----NCSKD ANDTLILQLT
4LFI_Gamma_Crystal	QEIEPPPIKT DVTIMQPKD-----N-----
TRBC2_Human	QEIEPPPIKT DVTIVQPKS YSKDANDVIT MQPKDWSKD ANDTLILQLT
TRBC1_Human	NTSAYMYLL LLLKSVYFA IITCCLLRRT AFCNGEKS
4LFI_Gamma_Crystal	-ASG-----LVPR-----
TRBC2_Human	NTSAYMYLL LLLKSVYFA IITCCLLRRT AFCNGEKS

Figure 18E

【図 19 A】

アルファ鎖定常領域について規定された番号:

TRAC_Human	1	11	21	31	50
4L4T_Alpha_Crystal	PNIQNPDPAY VQLRDSKSSD KSVCLTFDFD SQTNVSQSKD SDVYITDKV				
E17_Design_2_QQQQ_IgG4	PDIQNPDPAY VQLRDSKSSD KSVCLTFDFD SQTNVSQSKD SDVYITDKV				
TRAC_Human	51	61	71	81	95
4L4T_Alpha_Crystal	LDMSMDPKS NSAWAWSNKS DPACANAFNN SIIPEDTFPP SPESS				239
E17_Design_2_QQQQ_IgG4	LDMSMDPKS NSAWAWSNKS DPACANAFNN SIIPEDTFPP SPESS				240
	LDMSMDPKS NSAWAWSNKS DPACANAFNN SIIPEDTFPP SPESS				241

Figure 19A

【図 19 B】

ベータ鎖定常領域について規定された番号:

TRBC1_Human	0	1	11	21	31	50
4L4T_Beta_Crystal	E DLKNVFPPEV	AVFEPSEAEI	SHTQKATLVC	LATGFYPDHV	ELSWNGKE	
E17_Design_2_QQQQ_IgG4	LE DLKNVFPPEV	AVFEPSEAEI	SHTQKATLVC	LATGFYPDHV	ELSWNGKE	
TRBC1_Human	51	61	71	81	100	
4L4T_Beta_Crystal	VHSGVSTDQ	PLKEQPALND	SRYALSSRLR	VSATFWQNPV	NHFRQVQFY	
E17_Design_2_QQQQ_IgG4	VHSGVSTDQ	PLKEQPALND	SRYALSSRLR	VSATFWQNPV	NHFRQVQFY	
TRBC1_Human	101	111	124	128	配列番号:	
4L4T_Beta_Crystal	GLSENDEWTQ	DRAPKPTQIV	SAEA	WGRA	242	
E17_Design_2_QQQQ_IgG4	GLSENDEWTQ	DRAPKPTQIV	SAEA	WGRA	243	
	GLSENDEWTQ	DRAPKPTQIV	SAEA	WGRA	244	

Figure 19B

【図 19 C】

プレーアルファ鎖定常領域について規定された番号:

PTCRA_Human	1	11	21	31	50
30F6_PreAlpha_Crystal	PTGVGGTFPP SLAPPIMLLV DGRQQMYYVC LVLDVAPPL DSPWFSAGN				
Design_6_Pre_TCR_Construction' 1_Cys14	PTGVGGTFPP CLAPPIMLLV DGRQQMYYVC LVLDVAPPL DSPWFSAGN				
PTCRA_Human	51	61	71	81	100
30F6_PreAlpha_Crystal	GSALDAPTYG PSPATDGTWT NLAHLSLPSE ELASWEPLVC HTGPAEGHS				
Design_6_Pre_TCR_Construction' 1_Cys14	GSALDAPTYG PSPATDGTWT NLAHLSLPSE ELASWEPLVC HTGPAEGHS				
PTCRA_Human	101	117			
30F6_PreAlpha_Crystal	RSTQPMHLSG EASTART	245			
Design_6_Pre_TCR_Construction' 1_Cys14	RSTQPMHLSG EASTART	246			
	RSTQPMHLSG EASTART	247			

Figure 19C

10

20

30

40

50

【図 19 D】

デルタ鎖定常領域について規定された番号:

	0	11	21	31	50		
TRM_Human	E	PRSQPHTRPS	VFMQNGTNV	ACLYKEFYPK	DIRINLYSSK	KITEFDP	PAIV
4LFH_Delta_Crystal	E	PRSQPHTRPS	VFMQNGTNV	ACLYKEFYPK	DIRINLYSSK	KITEFDP	PAIV
Design_2_Cys5_no_Glyco	E	PRSQPHTRPS	VFMQNGTNV	ACLYKEFYPK	DIRINLYSSK	KITEFDP	PAIV
	51	61	71	88	配列番号:		
TRA_Human	ISPSGKYNV	KLCKYEDSNS	VTCSVQHQMK	TVHSTDFE	246		
4LFH_Delta_Crystal	ISPSGKYNV	KLCKYEDSNS	VTCSVQHQMK	TVHSTDFE	249		
Design_2_Cys5_no_Glyco	ISPSGKYNV	KLCKYEDSNS	VTCSVQHQMK	TVHSTDFC	250		

Figure 19D

【図 19 E】

ガンマ鎖定常領域について規定された番号:

	0	1	11	21	31	50
TRGC1_Human	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSIAE	TKLQKAGTYL	CLLEKFFPDV	IKIHQGEKKS
4LH_Gamma_Crystal	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSIAE	TKLQKAGTYL	CLLEKFFPDV	IKIHQGEKKS
Design_2_Cys5_no_Glyco	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSICE	TKLQKAGTYL	CLLEKFFPDV	IKIHQGEKKS
	51	61	71	81	100	
TRGC1_Human	NTILGSQBN	TMTNDITYMK	FSWLTVPKES	LKKEHRCIVR	HENNKGVYDQ	
4LH_Gamma_Crystal	NTILGSQBN	TMTNDITYMK	FSWLTVPKES	LKKEHRCIVR	HENNKGVYDQ	
Design_2_Cys5_no_Glyco	NTILGSQBN	TMTQDTYMK	FSWLTVPKES	LKKEHRCIVR	HENNKGVYDQ	
	101	配列番号:				
TRGC1_Human	ETIF	251				
4LH_Gamma_Crystal	ETIF	252				
Design_2_Cys5_no_Glyco	ETIF	253				

Figure 19E

【図 20 A】

IgG1「ノブ」変異の位置

	1	50
IgG1_wild	EPKSCDKHTH CPPCPAPELL GGPSYFLFPP KPKDTLMISR TPETVCVVD	
IgG1_Knob	EPKSCDKHTH CPPCPAPELL GGPSYFLFPP KPKDTLMISR TPETVCVVD	
	51	100
IgG1_wild	VSHEDPEVKF NYVDGVEVH NAKTKFREEQ YNSTYRVVSY LTVLQDMLN	
IgG1_Knob	VSHEDPEVKF NYVDGVEVH NAKTKFREEQ YNSTYRVVSY LTVLQDMLN	
	101	150
IgG1_wild	GKEYKQVNS KALPAPIEKT ISKAAQAPRE PQVTLPPSR EDMTKNQVSL	
IgG1_Knob	GKEYKQVNS KALPAPIEKT ISKAAQAPRE PQVTLPPSR EDMTKNQVSL	
	151	200
IgG1_wild	TCLVKGFPYS DIAVERESNG QFENNNTKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS	
IgG1_Knob	TCLVKGFPYS DIAVERESNG QFENNNTKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS	
	201	232
IgG1_wild	RWQGNVFS SYMHEALINH YTKLSLSLSP GK	配列番号:
IgG1_Knob	RWQGNVFS SYMHEALINH YTKLSLSLSP GK	294

Figure 20A

【図 20 B】

IgG4「ノブ」変異の位置

	1	50
IgG4_wild	ESKVGPPCP CPAPEFLGG SVFLFPPKPK DILMISRTPE VTICVYVDVSQ	
IgG4_Knob	ESKVGPPCP CPAPEFLGG SVFLFPPKPK DILMISRTPE VTICVYVDVSQ	
	51	100
IgG4_wild	EDPEVQFNWY VDGVEVINAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDMLNGKE	
IgG4_Knob	EDPEVQFNWY VDGVEVINAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDMLNGKE	
	101	150
IgG4_wild	YKQKYSNGL PSSTERTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TNQVSLTCL	
IgG4_Knob	YKQKYSNGL PSSTERTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TNQVSLTCL	
	151	200
IgG4_wild	VKGYPYSDIA VERESNGQPE NNYKTTIPPVL DSGGSFFLYS RLTVKSRQK	
IgG4_Knob	VKGYPYSDIA VERESNGQPE NNYKTTIPPVL DSGGSFFLYS RLTVKSRQK	
	201	229
		配列番号:
IgG4_wild	EGNVFSCSV HEALHNHYTQ KSLSLSLKG	297
IgG4_Knob	EGNVFSCSV HEALHNHYTQ KSLSLSLKG	298

Figure 20B

【図 20 C】

IgG1「ホール」変異の位置

	1	50
IgG1_wild	EPKSCDKHTH CPFCAPPELL GGPSYFLFPP KPKDTLMISR TPETVCVVD	
IgG1_Hole	EPKSCDKHTH CPFCAPPELL GGPSYFLFPP KPKDTLMISR TPETVCVVD	
	51	100
IgG1_wild	VSHEDPEVK NYVDGVEVH NAKTKFREEQ YNSTYRVVSY LTVLQDMLN	
IgG1_Hole	VSHEDPEVK NYVDGVEVH NAKTKFREEQ YNSTYRVVSY LTVLQDMLN	
	101	150
IgG1_wild	GKEYKQVNS KALPAPIEKT ISKAAQAPRE PQVTLPPSR EDMTKNQVSL	
IgG1_Hole	GKEYKQVNS KALPAPIEKT ISKAAQAPRE PQVTLPPSR EDMTKNQVSL	
	151	200
IgG1_wild	TCLVKGFPYS DIAEVESNG QFENNYKTTIP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS	
IgG1_Hole	TCLVKGFPYS DIAEVESNG QFENNYKTTIP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS	
	201	232
IgG1_wild	RWQGNVFS SYMHEALINH YTKQSLSP GK	配列番号:
IgG1_Hole	RWQGNVFS SYMHEALINH YTKQSLSP GK	294

Figure 20C

【図 20 D】

IgG4「ホール」変異の位置

IgG4_wild	1	50
IgG4_Hole	ESKVGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DILMISRTPE VTICVYVDVSQ	
	51	100
IgG4_wild	EDPEVQFNWY VDGVEVINAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDMLNGKE	
IgG4_Hole	EDPEVQFNWY VDGVEVINAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDMLNGKE	
	101	150
IgG4_wild	YKQKYSNGL PSSTERTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TNQVSLTCL	
IgG4_Hole	YKQKYSNGL PSSTERTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TNQVSLTCL	
	151	200
IgG4_wild	VKGYPYSDIA VERESNGQPE NNYKTTIPPVL DSGGSFFLYS RLTVKSRQK	
IgG4_Hole	VKGYPYSDIA VERESNGQPE NNYKTTIPPVL DSGGSFFLYS RLTVKSRQK	
	201	229
IgG4_wild	EGNVFSCSV HEALHNHYTQ KSLSLSLKG	配列番号: 297
IgG4_Hole	EGNVFSCSV HEALHNHYTQ KSLSLSLKG	299

Figure 20D

10

20

30

40

50

【図 2 1 A】

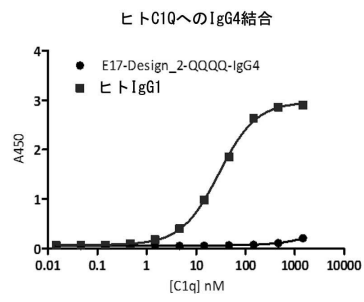


Figure 21A

【図 2 1 B】

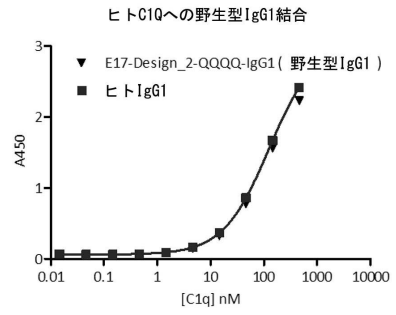


Figure 21B

10

【図 2 2】

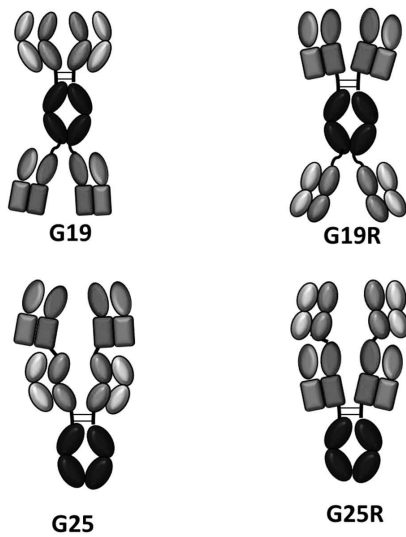


Figure 22

【図 2 3 A】

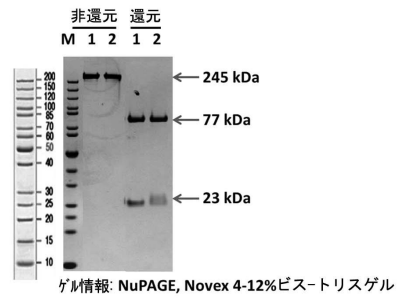


Figure 23A

20

30

40

50

【図 2 3 B】

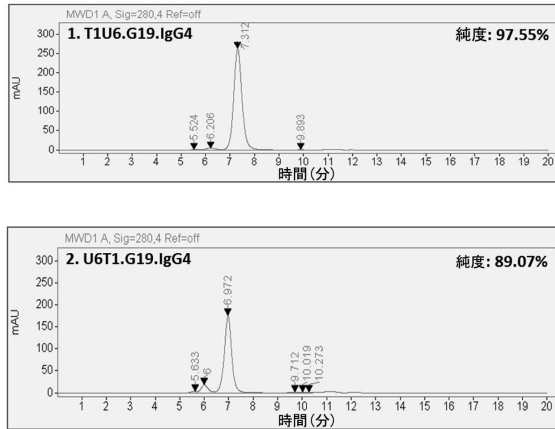


Figure 23B

【図 2 4 A】

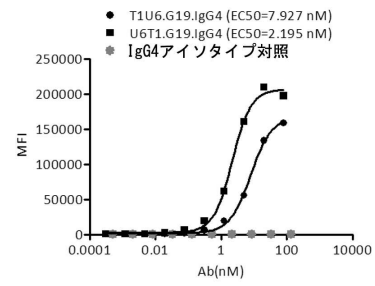


Figure 24A

10

【図 2 4 B】

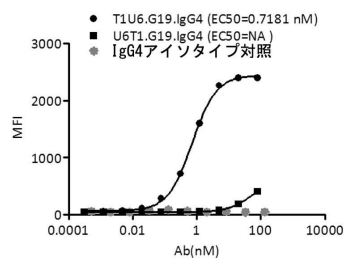


Figure 24B

【図 2 5 A】

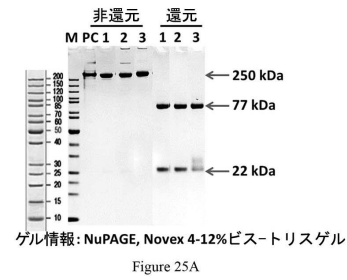


Figure 25A

20

30

40

50

【図 2 5 B】

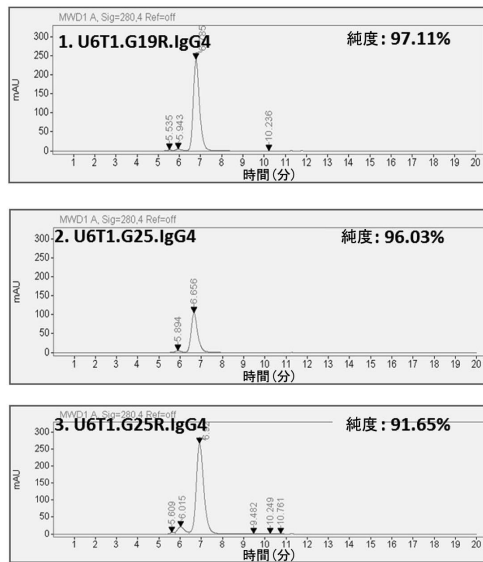


Figure 25B

【図 2 6 A】

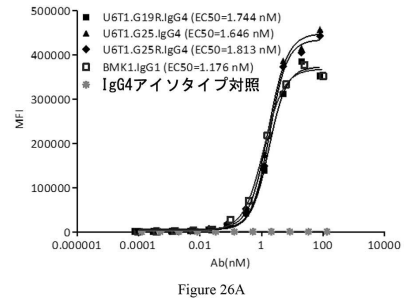


Figure 26A

10

【図 2 6 B】

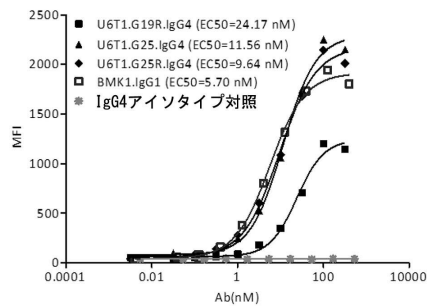


Figure 26B

【図 2 7 A】

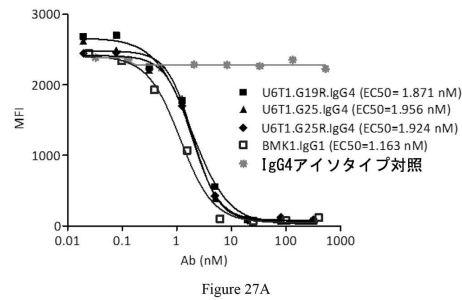


Figure 27A

30

40

50

【図 27 B】

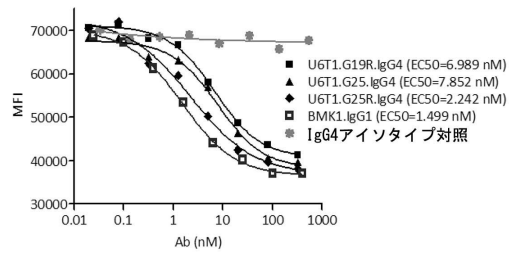


Figure 27B

【図 28 A】

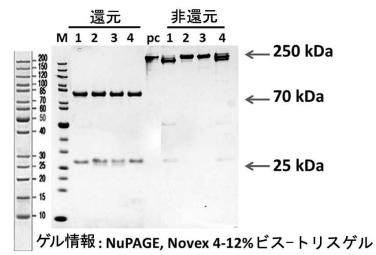


Figure 28A

【図 28 B】

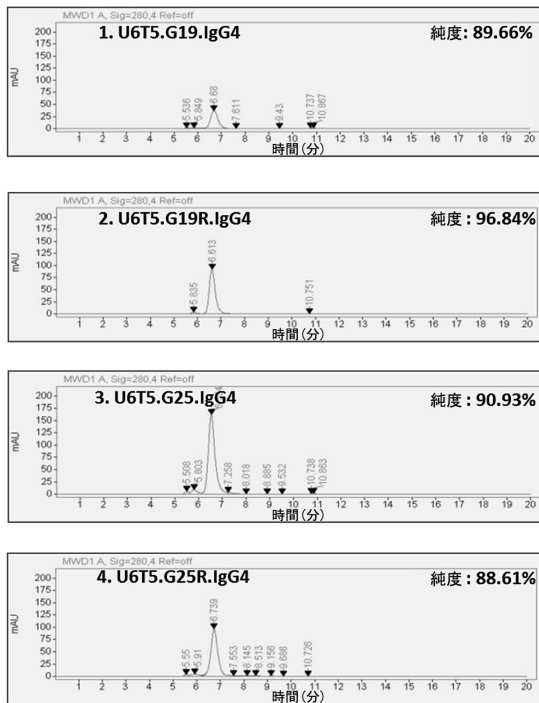


Figure 28B

【図 29 A】

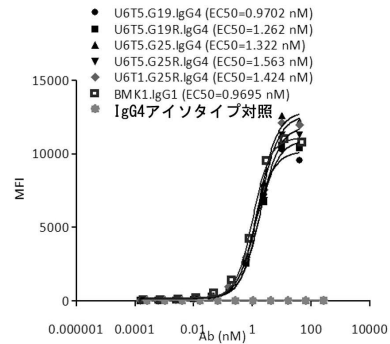


Figure 29A

10

20

30

40

50

【図 29 B】

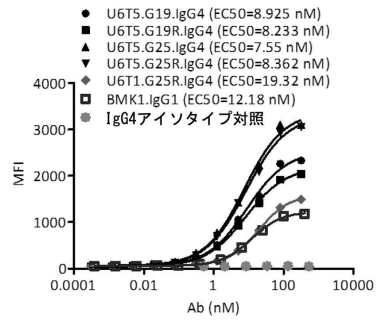


Figure 29B

【図 30】

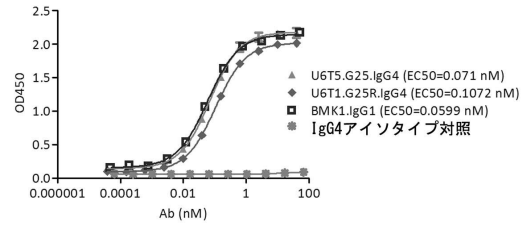


Figure 30

10

【図 31 A】

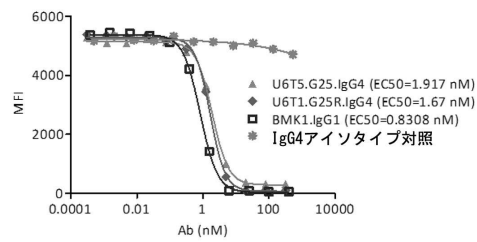


Figure 31A

【図 31 B】

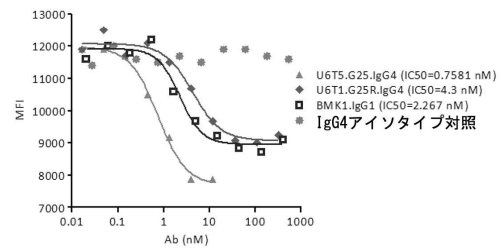


Figure 31B

20

【図 32】

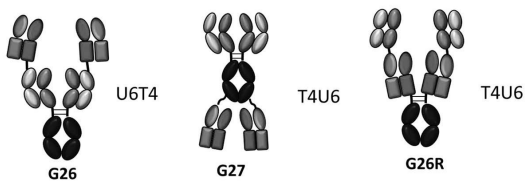
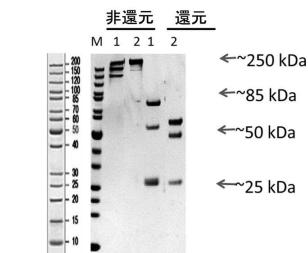


Figure 32

【図 33 A】



ゲル情報: NuPAGE, Novex 4-12%ビーストリスゲル

Figure 33A

30

40

50

【図 3 3 B】

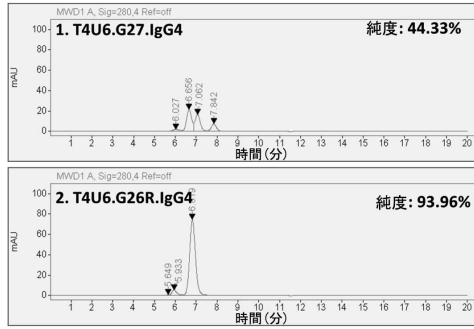


Figure 33B

【図 3 4 A】

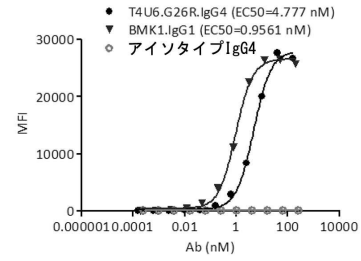


Figure 34A

10

【図 3 4 B】

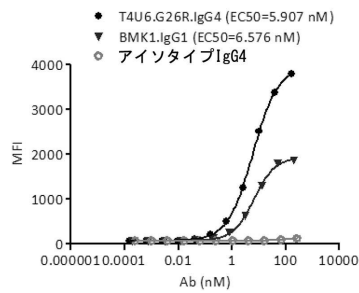


Figure 34B

【図 3 5 A】

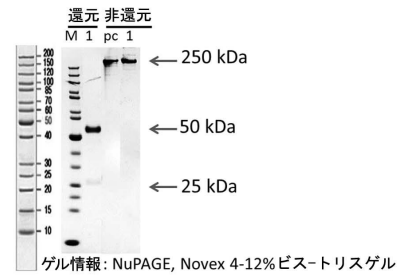


Figure 35A

20

【図 3 5 B】

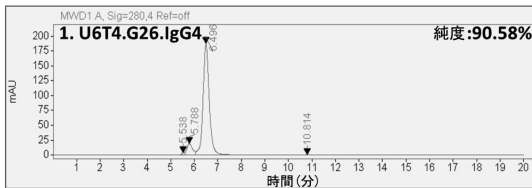


Figure 35B

【図 3 6 A】

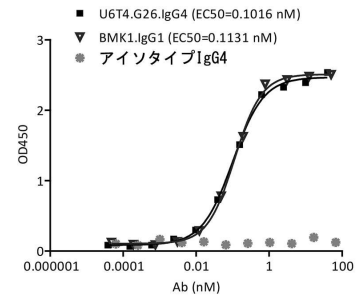


Figure 36A

30

40

50

【図 3 6 B】

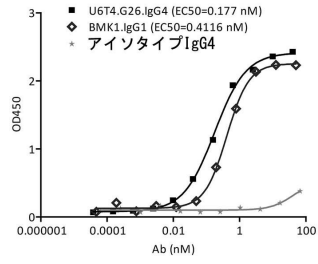


Figure 36B

【図 3 6 C】

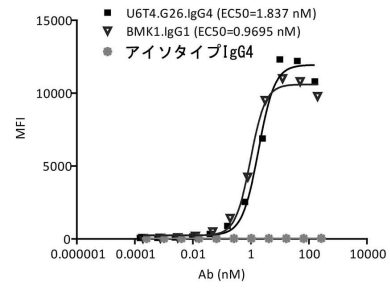


Figure 36C

10

【図 3 6 D】

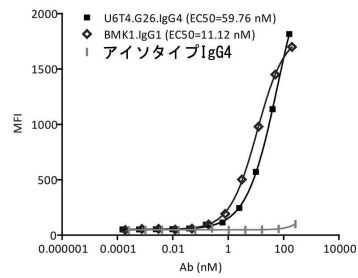


Figure 36D

【図 3 7】

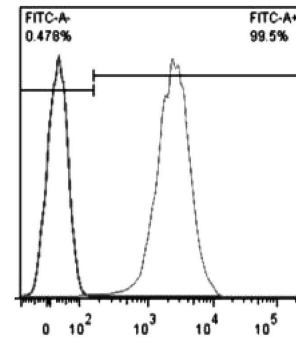


Figure 37

20

【図 3 8】

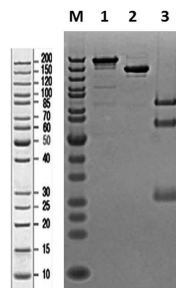


Figure 38

【図 3 9】

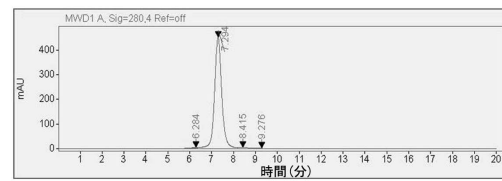


Figure 39

30

40

50

【図 4 0】

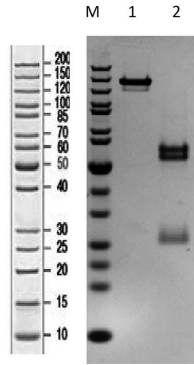


Figure 40

【図 4 1】

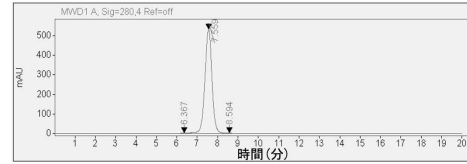


Figure 41

10

【図 4 2 A】

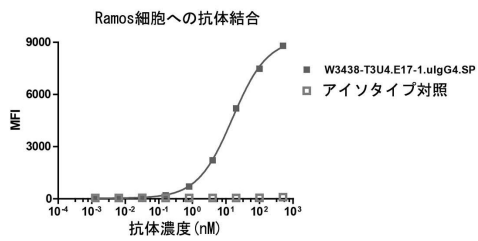


Figure 42A

【図 4 2 B】

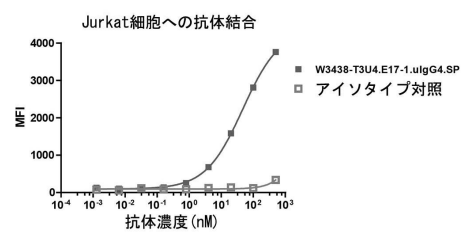


Figure 42B

20

【図 4 3 A】

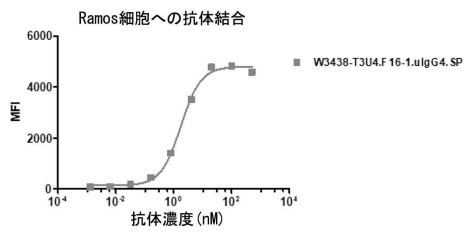


Figure 43A

【図 4 3 B】

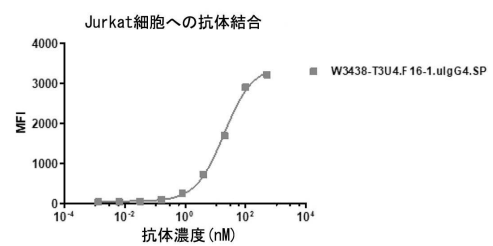


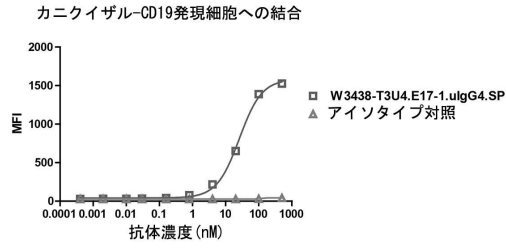
Figure 43B

30

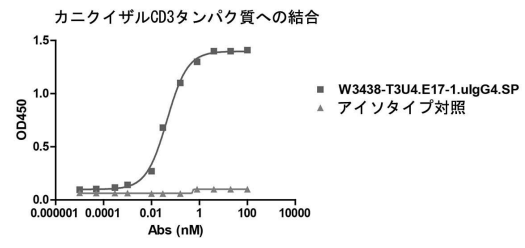
40

50

【図 4 4】

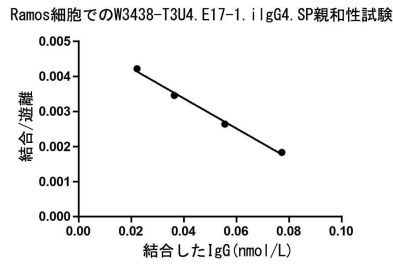


【図 4 5】

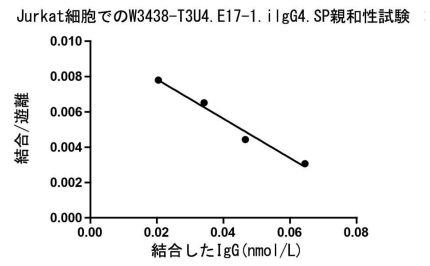


10

【図 4 6 A】

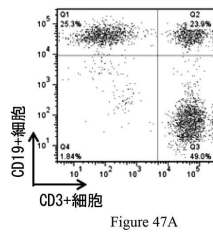


【図 4 6 B】

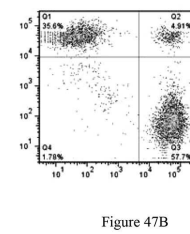


20

【図 4 7 A】



【図 4 7 B】



30

40

50

【図 48 A】

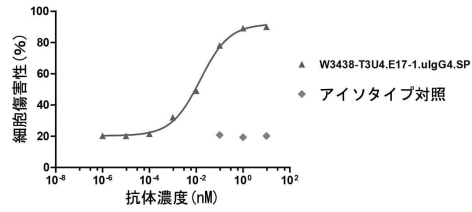


Figure 48A

【図 48 B】

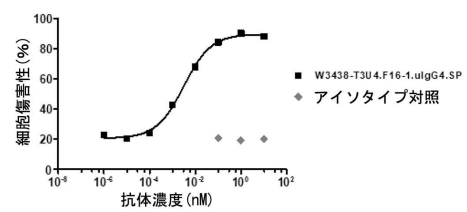


Figure 48B

10

【図 49 A】

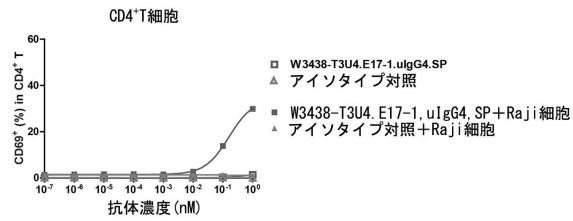


Figure 49A

【図 49 B】

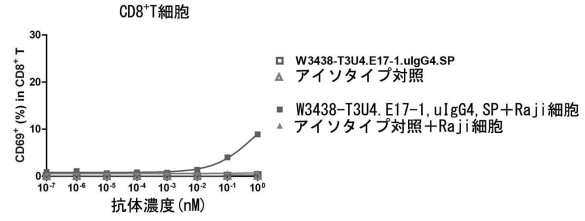


Figure 49B

20

【図 49 C】

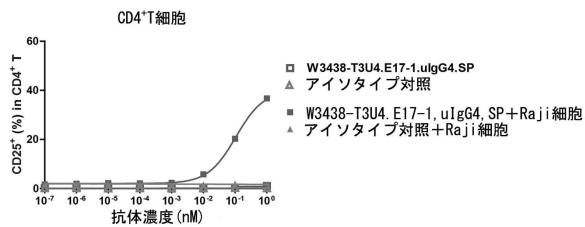


Figure 49C

【図 49 D】

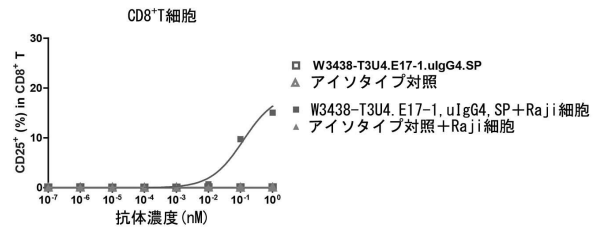


Figure 49D

30

40

50

【図 5 0 A】

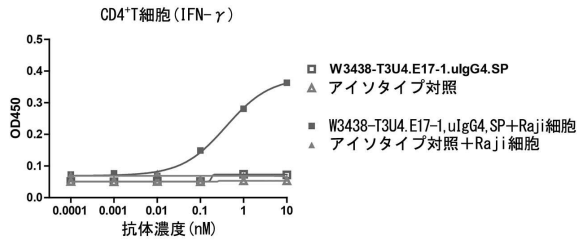


Figure 50A

【図 5 0 B】

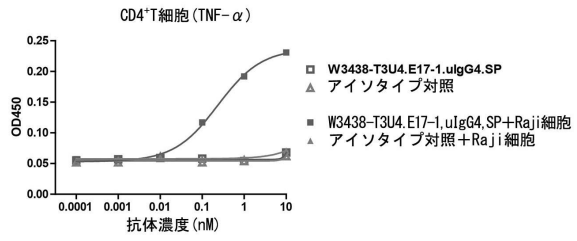


Figure 50B

10

【図 5 0 C】

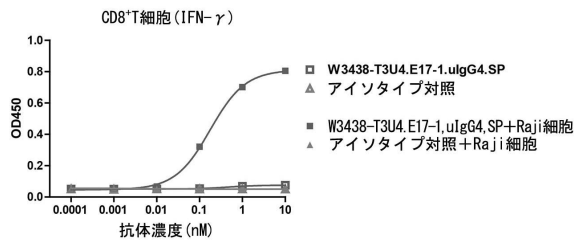


Figure 50C

【図 5 0 D】

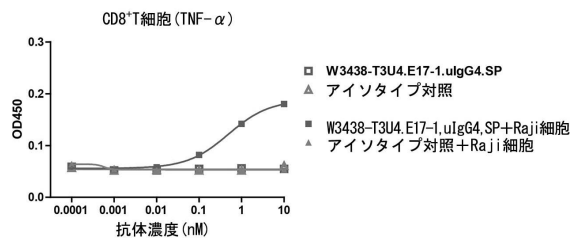


Figure 50D

20

【図 5 1 A】

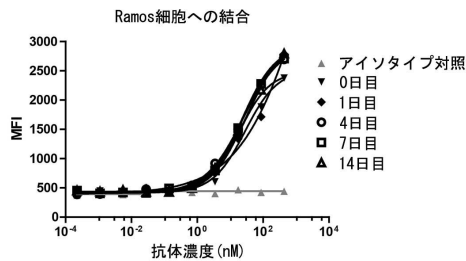


Figure 51A

【図 5 1 B】

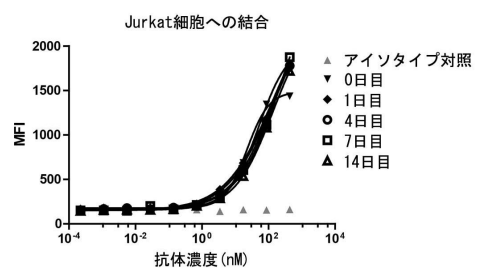


Figure 51B

30

40

50

【図 5 2】

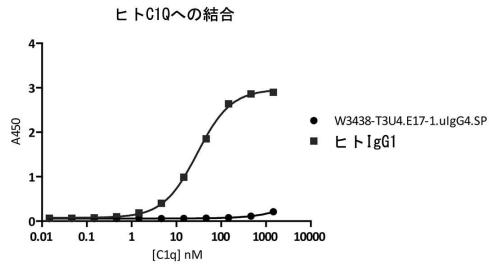


Figure 52

【図 5 3】

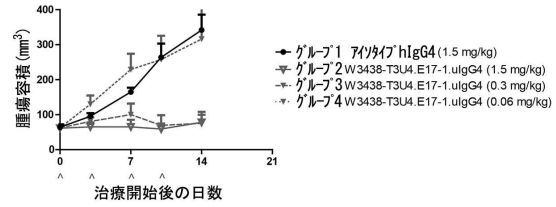


Figure 53

【図 5 4】

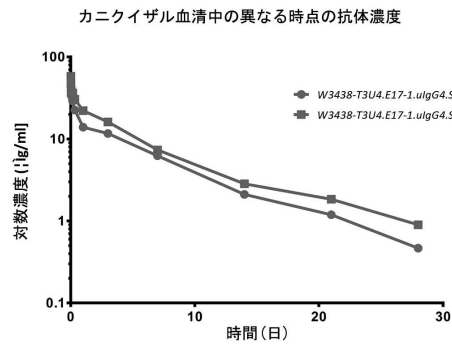


Figure 54

【図 5 5 A】

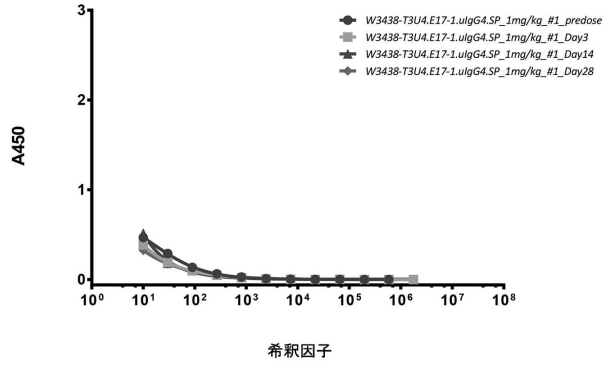


Figure 55A

【図 5 5 B】

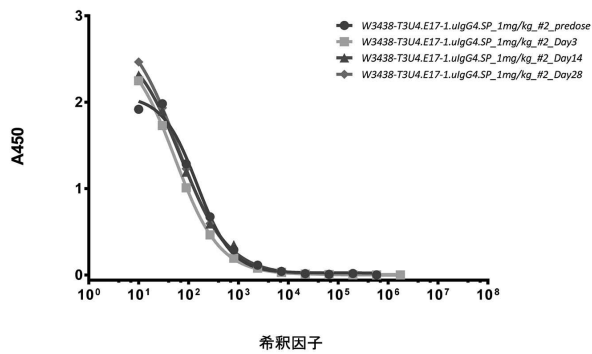


Figure 55B

【図 5 6 A】

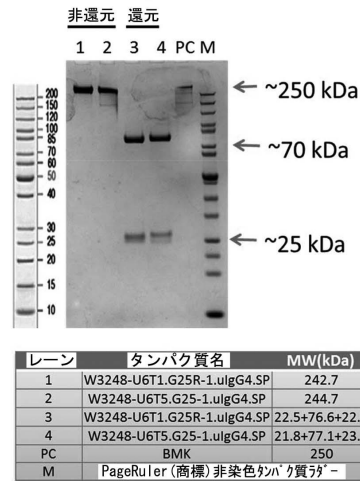


Figure 56A

【図 5 6 B】

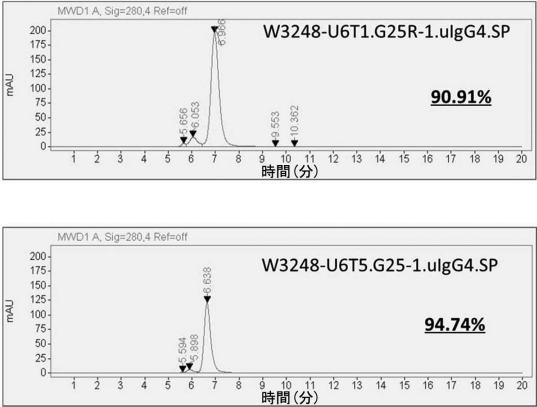


Figure 56B

【図 5 7】

抗体	アイソタイプ	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	hlgG4, κ	60.8	73.9
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	hlgG4, κ	63.4	-
W324-BMK1.ulgG1.KDL	hlgG1, κ	57.4	79.6

Figure 57

10

【図 5 8】

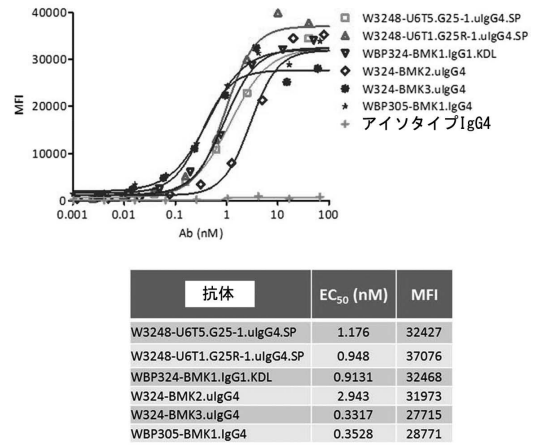


Figure 58

【図 5 9】

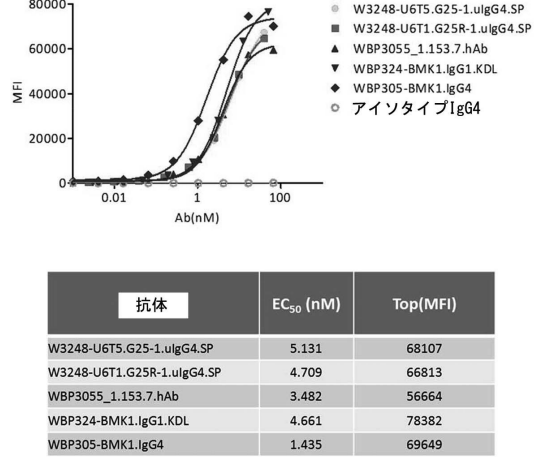


Figure 59

20

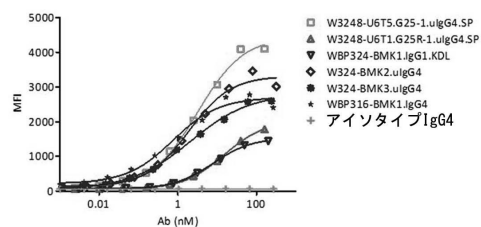
抗体	EC ₅₀ (nM)	Top(MFI)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	5.131	68107
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	4.709	66813
WBP3055_1.153.7.hAb	3.482	56664
WBP324-BMK1.lgG1.KDL	4.661	78382
WBP305-BMK1.lgG4	1.435	69649

30

40

50

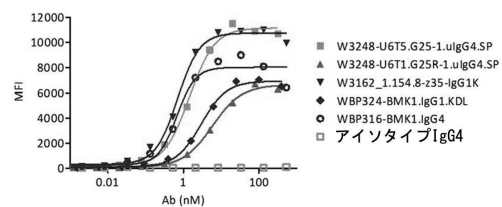
【図 60】



抗体	EC ₅₀ (nM)	MFI
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	3.173	4442
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	14.99	2021
WBP324-BMK1.lgG1.KDL	7.977	1535
W324-BMK2.ulgG4	1.91	3322
W324-BMK3.ulgG4	2.114	2811
WBP316-BMK1.lgG4	0.7471	2699

Figure 60

【図 61】



抗体	EC ₅₀ (nM)	Top(MFI)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	1.45	11156
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	5.872	6653
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	0.6994	10757
WBP324-BMK1.lgG1.KDL	2.98	6951
WBP316-BMK1.lgG4	0.6737	8052

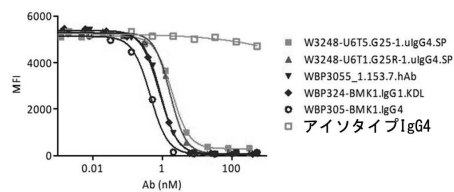
Figure 61

【図 62】

検査対象	リガンド	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CTLA4	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	8.08E+05	2.88E-05	3.56E-11
	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	1.83E+05	6.54E-05	3.57E-10
	WBP316-BMK1.ulgG4.SP	3.83E+05	4.97E-05	1.30E-10
PD-1	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	5.42E+05	6.75E-04	1.24E-09
	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	6.42E+05	8.44E-04	1.32E-09
	親Ab	3.27E+05	6.14E-04	1.88E-09

Figure 62

【図 63】



抗体	IC ₅₀ (nM)	阻害率 (%)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	1.917	94.4
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	1.670	98.6
WBP3055_1.153.7.hAb	0.888	98.6
WBP324-BMK1.lgG1.KDL	0.8308	99.4
WBP305-BMK1.lgG4	0.4536	99.1

Figure 63

10

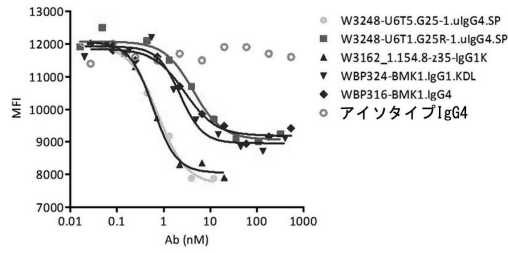
20

30

40

50

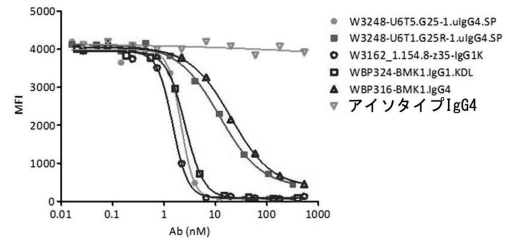
【図 6 4】



抗体	IC ₅₀ (nM)	阻害率 (%)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	0.7581	35.9
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	4.300	24.4
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	0.5935	32.9
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	2.267	25.3
WBP316-BMK1.IgG4	2.862	23.4

Figure 64

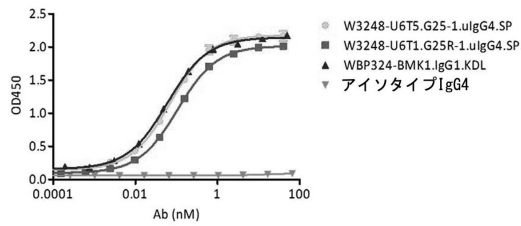
【図 6 5】



抗体	IC ₅₀ (nM)	阻害率 (%)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	2.138	98.2
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	11.98	91.0
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	1.468	97.6
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	2.553	97.9
WBP316-BMK1.IgG4	19.82	90.9

Figure 65

【図 6 6】



抗体	EC ₅₀ (nM)	Top(OD450)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	0.0710	2.178
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	0.1072	2.016
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	0.0599	2.145

Figure 66

【図 6 7】

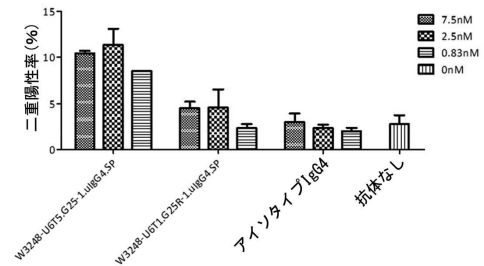


Figure 67

10

20

30

40

50

【図 6 8 A】

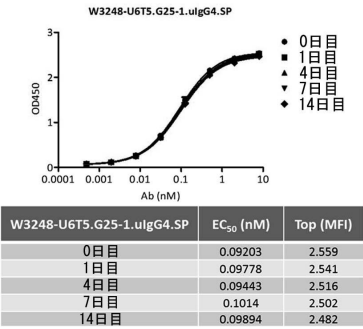


Figure 68A

【図 6 8 B】

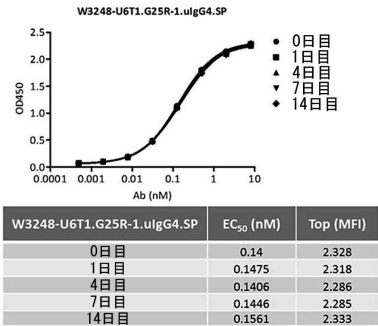


Figure 68B

10

【配列表】

0007387611000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

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	
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	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18	

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 シュイ チエンチン

中華人民共和国, シャンハイ 200131, プードン ニュー ディストリクト, フートー チョン
ロード ナンバー 299

(72)発明者 ワン チュオチー

中華人民共和国, シャンハイ 200131, プードン ニュー ディストリクト, フートー チョン
ロード ナンバー 299

(72)発明者 リー チン

中華人民共和国, シャンハイ 200131, プードン ニュー ディストリクト, フートー チョン
ロード ナンバー 299

審査官 山本 匡子

(56)参考文献

国際公開第2014/014796 (WO, A1)

国際公開第2017/070608 (WO, A1)

国際公開第2016/184258 (WO, A1)

特表2005-514006 (JP, A)

国際公開第2016/070061 (WO, A1)

特表2008-520223 (JP, A)

特開平11-069975 (JP, A)

MAbs., 2015年, Vol.7, No.2, p.364-376, doi: 10.1080/19420862.2015.1007826.

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-90

C 0 7 K

C 1 2 Q

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/CAPLUS/REGISTRY (ST
N)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)