

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7261158号
(P7261158)

(45)発行日 令和5年4月19日(2023.4.19)

(24)登録日 令和5年4月11日(2023.4.11)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

Z N A

A 6 1 K 38/02 (2006.01)

A 6 1 K 38/02

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

請求項の数 18 (全92頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-520869(P2019-520869)

(86)(22)出願日 平成29年10月18日(2017.10.18)

(65)公表番号 特表2019-534277(P2019-534277
A)

(43)公表日 令和1年11月28日(2019.11.28)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/057268

(87)国際公開番号 WO2018/075692

(87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

審査請求日 令和2年10月19日(2020.10.19)

(31)優先権主張番号 62/410,054

(32)優先日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/555,498

(32)優先日 平成29年9月7日(2017.9.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 514194417

インベンラ, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7
1 9, マディソン, エス. ローザ ロ
ード 5 0 5, スイート 2 3 5

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体構築物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1および第2のポリペプチド鎖を含む抗体構築物であって、

(a) 前記第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、

ドメインAはV Lアミノ酸配列を有し、ドメインBはC H 3アミノ酸配列を有し、ドメインDはC H 2アミノ酸配列を有し、ドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；

(b) 前記第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、

ドメインFはV Hアミノ酸配列を有し、ドメインGはC H 3アミノ酸配列を有し；

(c) 前記第1および前記第2のポリペプチド鎖は、前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用および前記Bドメインと前記Gドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記抗体構築物を形成し、

前記抗体構築物は第3および第4のポリペプチド鎖をさらに含み、

(d) 前記第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、

ドメインHは可变領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIはC Lアミノ酸配列を有し、ドメインJはC H 2アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配

列を有し；

(e) 前記第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、LーMの配向で配置され、

ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMはC H 1アミノ酸配列を有し；

(f) 前記第3および前記第4のポリペプチド鎖は、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用および前記Iドメインと前記Mドメインとの間の相互作用を介して会合し；

(g) 前記第1および前記第3のポリペプチド鎖は、前記Dドメインと前記Jドメインとの間の相互作用および前記Eドメインと前記Kドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記抗体構築物を形成し、ここで、前記Eドメインおよび前記Kドメインのアミノ酸配列が互いに異なり、それぞれ相補的なノブ・イン・ホール変異を含む、抗体構築物。

【請求項2】

前記Bドメインと前記Gドメインのアミノ酸配列が同一であり、前記配列は内在性C H 3配列である、請求項1に記載の抗体構築物。

【請求項3】

前記ドメインEがC H 3アミノ酸配列を有する、請求項1または2に記載の抗体構築物。

【請求項4】

前記Bドメインと前記Gドメインのアミノ酸配列が互いに異なり、それぞれ操作されたジスルフィド架橋を生成する変異および電荷対変異から選択される相補的な改変を含む、請求項1または請求項3に記載の抗体構築物。

【請求項5】

前記相補的な改変が、ドメインBとGとの間に操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含み、

操作されたジスルフィド架橋を生成する前記変異が、前記BドメインとGドメインの一方におけるS 3 5 4 C変異、ならびにGもしくはBの他方のドメインにおける3 4 9 Cである、

請求項4に記載の抗体構築物。

【請求項6】

前記相補的な改変が、電荷対変異を含み、

前記電荷対変異が、前記BドメインとGドメインの一方におけるT 3 6 6 K変異、ならびにGもしくはBの他方のドメインにおけるL 3 5 1 D変異である、請求項4に記載の抗体構築物。

【請求項7】

前記Eドメインおよび前記Kドメインのアミノ酸配列が、前記第1のポリペプチド鎖と前記第3のポリペプチド鎖との間の特異的会合を促進する特異的相互作用を有するように選択された2つの異なる抗体ドメインの内在性配列である、請求項1に記載の抗体構築物。

【請求項8】

前記ノブ・イン・ホール変異が、前記EドメインとKドメインの一方におけるT 3 6 6 W変異、ならびに他方のドメインにおけるT 3 6 6 S、L 3 6 8 AおよびY 4 0 7 V変異である、

請求項1に記載の抗体構築物。

【請求項9】

ドメインHがV L配列を有し、ドメインLがV H配列を有する、請求項1から8のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項10】

ドメインHがV Lアミノ酸配列を有し；

ドメインKがC H 3アミノ酸配列を有し；

ドメインLがV Hアミノ酸配列を有する、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記 A ドメインと前記 F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、前記 H ドメインと前記 L ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成する、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 2】

前記 A ドメインと前記 B ドメインとの間のジャンクションを形成する配列が、I K R T P R E P または I K R T V R E P である、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 3】

前記 F ドメインと前記 G ドメインとの間のジャンクションを形成する配列が、S S A S P R E P である、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 4】

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、前記 C H 3 アミノ酸配列とヒンジアミノ酸配列とを連結する C 末端トリペプチド挿入物を有し、ここで前記トリペプチド挿入物は、P G K、K S C および G E C からなる群から選択される、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 5】

前記配列が、ヒト配列である、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 6】

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、I g G 配列であり、前記 I g G 配列が I g G 1 配列である、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 7】

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、1 つまたは複数のイソアロタイプ変異を有し、前記イソアロタイプ変異が D 3 5 6 E および L 3 5 8 M である、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 8】

前記 C L アミノ酸配列が C カップ配列である、請求項 8 から 1 7 のいずれか一項に記載の抗体構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、3 5 U S C 1 1 9 (e) の下、同時係属の 2 0 1 7 年 9 月 7 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 5 5 , 4 9 8 号、2 0 1 7 年 8 月 2 4 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 5 4 9 , 8 9 4 号、2 0 1 6 年 1 0 月 1 9 日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 4 1 0 , 0 5 4 号の利益を主張し、その開示は、本明細書にその全体が参照により援用される。

【0 0 0 2】

2. 配列表

本出願は、E F S - W e b を介して提出され、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、配列表を含む。前記 A S C I I の写しは、2 0 1 7 年 X 月 X 日に作成され、X X X X X U S _ s e q u e n c e l i s t i n g . t x t と名付けられ、大きさは X , X X X , X X X バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

3. 背景

抗体は、医療分野における非常に貴重なツールである。特に、科学研究および医療診断における役割を含むモノクローナル抗体の重要性は、数十年にわたって広く認識されてきた。しかし、抗体の全潜在能力、特に治療剤として使用の成功は、アダリムマブ (H u m i r a) 、リツキシマブ (R i t u x a n) 、インフリキシマブ (R e m i c a d e) 、

10

20

30

40

50

ベバシズマブ (Avastin)、トラスツズマブ (Herceptin)、ペンブロリズマブ (Keytruda)、およびイピリムマブ (Yervoy) の治療法の成功によって示されるように、つい最近、実証された。これらの臨床での成功に続き、抗体治療への関心は、おそらく増加する一方であろう。したがって、研究薬物開発およびその下流にある臨床現場の両方で、抗体の効率的な生成および作製が当技術分野で必要とされている。

【0004】

抗体治療分野で活発な研究の領域は、多重特異性抗体、つまり、複数の標的を認識するように操作された単一抗体の設計および使用である。これらの抗体は、治療的制御をより高める将来的見込みを提供する。例えば、多くの抗体治療、特に抗体に基づく免疫治療の場合に付随するオフターゲット効果を低減するために、標的特異性を改善する必要性が存在する。加えて、多重特異性抗体は、特に免疫治療の状況において、複数の細胞受容体の相乗的ターゲティングなどの新たな治療戦略を提供する。

【0005】

多重特異性抗体の将来的見込みにもかかわらず、それらの製造および使用は、その実用化を制限する数多くの制約に悩まされてきた。一般的に、全ての多重特異性抗体プラットフォームは、コグネートの重鎖と軽鎖の対の間のハイフィデリティ対形成を確保する問題を解決しなければならない。しかしながら、多くの問題が、様々なプラットフォームにわたって存在している。例えば、抗体鎖工学は、アセンブルされた抗体の乏しい安定性、抗体鎖の乏しい発現およびフォールディング、ならびに／または免疫原性ペプチドの生成に至る可能性がある。他のアプローチには、複雑な *in vitro* アセンブリ反応または精製方法などの、実用的でない製造プロセスの問題がある。加えて、いくつかのプラットフォームには、異なる抗体結合ドメインに簡単かつ効率的にプラグインすることができないという問題がある。これらの多重特異性抗体製造に関連する様々な問題は、多くのプラットフォームの適用、特に多くの治療薬のパイプラインのために必要なハイスループットスクリーニングにおけるその使用を制限する。

【0006】

したがって、高レベル発現および効率的な精製が可能な抗体プラットフォームが必要とされている。特に、研究および治療現場の両方で直接適用性がある多重特異性抗体の製造能力を向上させる多重特異性抗体プラットフォームが必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

4. 概要

本発明者らは、様々な新規多価抗体構築物を設計した。これらの多価結合分子の構成は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、および四重特異性構築物の抗原結合部位を一緒に形成するコグネートポリペプチド鎖のハイフィデリティ対形成を駆動する。結合分子は、*in vitro* 無細胞翻訳系および哺乳類一過性トランスフェクション系を含む従来の抗体発現系を使用して容易に発現され、CH1 親和性樹脂を用いて単一ステップで精製することができる。ハイフィデリティアセンブリ、高レベルの *in vitro* 発現、および単一ステップで可能な発現産物精製により、これらの構築物は、可変領域のライブラリのハイスループットスクリーニングに良く適している。またこれらの構築物は長期安定性を示すことから、多重特異性治療剤として良く適している。

【0008】

したがって、第1の態様では、第1および第2のポリペプチド鎖を含む結合分子であって、(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAはVLアミノ酸配列を有し、ドメインBはCH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはCH2アミノ酸配列を有し、ドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(b) 第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFはVHアミノ酸配列を有し

、ドメインGはCH₃アミノ酸配列を有し；（c）第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する、結合分子である。

【0009】

ある特定の態様では、結合分子は、第3および第4のポリペプチド鎖をさらに含み、（a）第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJおよびドメインKを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-E-J-Kの配向で配置され、ドメインHは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインJはCH₂アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；（b）第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMは定常領域アミノ酸配列を有し；（c）第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；（d）第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0010】

ある特定の態様では、BおよびGドメインのアミノ酸配列は同一であり、ここで配列は内在性CH₃配列である。

【0011】

ある特定の態様では、BおよびGドメインのアミノ酸配列は異なり、それぞれ別個に直交型改変を内在性CH₃配列に含み、ここでBドメインはGドメインと相互作用し、BドメインとGドメインのどちらも、直交型改変を欠くCH₃ドメインと顕著に相互作用しない。ある特定の態様では、直交型改変は、ドメインBとGとの間に操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含む。ある特定の態様では、操作されたジスルフィド架橋を生成する変異は、BドメインとGドメインの一方におけるS354C変異、ならびに他方のドメインにおける349Cである。ある特定の態様では、直交型改変はノブ・イン・ホール（knob-in-hole）変異を含む。ある特定の態様では、ノブ・イン・ホール変異は、BドメインとGドメインの一方におけるT366W変異、ならびに他方のドメインにおけるT366S、L368AおよびY407V変異である。ある特定の態様では、直交型改変は、電荷対変異を含む。ある特定の態様では、電荷対変異は、BドメインとGドメインの一方におけるT366K変異、ならびに他方のドメインにおけるL351D変異である。

【0012】

ある特定の態様では、ドメインEはCH₃アミノ酸配列を有する。ある特定の態様では、EおよびKドメインのアミノ酸配列は同一であり、ここで配列は内在性CH₃配列である。

【0013】

ある特定の態様では、EおよびKドメインのアミノ酸配列は異なる。ある特定の態様では、異なる配列が、それぞれ別個に直交型改変を内在性CH₃配列に含み、ここでEドメインはKドメインと相互作用し、EドメインとKドメインのどちらも、直交型改変を欠くCH₃ドメインと顕著に相互作用しない。ある特定の態様では、直交型改変は、ドメインEとKとの間に操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含む。ある特定の態様では、操作されたジスルフィド架橋を生成する変異は、EドメインとKドメインの一方におけるS354C変異、ならびに他方のドメインにおける349Cである。ある特定の態様では、EドメインとKドメインにおける直交型改変はノブ・イン・ホール変異を含む。ある特定の態様では、ノブ・イン・ホール変異は、EドメインとKドメインの一方におけるT366W変異、ならびに他方のドメインにおけるT366S、L368AおよびY407V変異である。ある特定の態様では、直交型改変は、電荷対変異を含む。ある特定の態様では、電荷対変異は、EドメインまたはKドメインの一方におけるT366K変異、ならびに他方のドメインにおける対応するL351D変異である。

【0014】

ある特定の態様では、EドメインおよびKドメインのアミノ酸配列が、第1のポリペプチドと第3のポリペプチドとの間の特異的会合を促進する特異的相互作用を有するように選択された2つの異なる抗体ドメインの内在性配列である。ある特定の態様では、2つの異なるアミノ酸配列は、CH1配列およびCL配列である。ある特定の態様では、ドメインIはCL配列を有し、ドメインMはCH1配列を有する。

【0015】

ある特定の態様では、ドメインHはVL配列を有し、ドメインLはVH配列を有する。

【0016】

ある特定の態様では、ドメインHはVLアミノ酸配列を有し；ドメインIはCLアミノ酸配列を有し；ドメインKはCH3アミノ酸配列を有し；ドメインLはVHアミノ酸配列を有し；ドメインMはCH1アミノ酸配列を有する。

10

【0017】

ある特定の態様では、AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

【0018】

ある特定の態様では、結合分子は、第5のポリペプチド鎖をさらに含み、(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインNおよびドメインOをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインNはVLアミノ酸配列を有し、ドメインOはCH3アミノ酸配列を有し；(b) 結合分子は、第5のポリペプチド鎖をさらに含み、第5のポリペプチド鎖が、ドメインPおよびドメインQを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、ドメインPはVHアミノ酸配列を有し、ドメインQはCH3アミノ酸配列を有し；(c) 第1および第5のポリペプチドは、NドメインとPドメインとの間の相互作用およびOドメインとQドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

20

【0019】

ある特定の態様では、(a) ドメインNおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり、ドメインHのアミノ酸配列はドメインNおよびAのアミノ酸配列と異なり、ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインIのアミノ酸配列はドメインOおよびBのアミノ酸配列と異なり、ドメインPおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLのアミノ酸配列はドメインPおよびFのアミノ酸配列と異なり、ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMのアミノ酸配列はドメインQおよびGのアミノ酸配列と異なり；(b) AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

30

【0020】

ある特定の態様では、(a) ドメインN、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は異なり、ドメインO、ドメインB、およびドメインIのアミノ酸配列は異なり、ドメインP、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は異なり、ドメインQ、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列は異なり；(b) AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

40

【0021】

ある特定の態様では、結合分子は、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、(a) 第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインRはVLアミノ酸配列を有し、ドメインSは定常ドメインアミノ酸配列を有し；(b) 結合分子は、第6のポ

50

リペプチド鎖をさらに含み、第6のポリペプチド鎖が、ドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され、ドメインTはVHアミノ酸配列を有し、ドメインUは定常ドメインアミノ酸配列を有し；(c)第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0022】

ある特定の態様では、(a)ドメインRおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり、ドメインHのアミノ酸配列はドメインRおよびAのアミノ酸配列と異なり、ドメインSおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインEのアミノ酸配列はドメインSおよびBのアミノ酸配列と異なり、ドメインTおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLのアミノ酸配列はドメインTおよびFのアミノ酸配列と異なり、ドメインUおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMのアミノ酸配列はドメインUおよびGのアミノ酸配列と異なり；(b)AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

【0023】

ある特定の態様では、(a)ドメインRおよびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインAのアミノ酸配列はドメインRおよびHのアミノ酸配列と異なり、ドメインSおよびドメインEのアミノ酸配列は同一であり、ドメインBのアミノ酸配列はドメインSおよびEのアミノ酸配列と異なり、ドメインTおよびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインFのアミノ酸配列はドメインTおよびLのアミノ酸配列と異なり、ドメインUおよびドメインMのアミノ酸配列は同一であり、ドメインGのアミノ酸配列はドメインUおよびMのアミノ酸配列と異なり；(b)AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第2の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

【0024】

ある特定の態様では、(a)ドメインR、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は異なり、ドメインS、ドメインB、およびドメインEのアミノ酸配列は異なり、ドメインT、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は異なり、ドメインU、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列は異なり；(b)AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

【0025】

ある特定の態様では、結合分子は、さらに第5および第6のポリペプチド鎖を含み、(a)第1のポリペプチド鎖はさらにドメインNおよびドメインOを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置され；(b)第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置され；(c)結合分子はさらに第5および第6ポリペプチド鎖を含み、第5ポリペプチド鎖はドメインPおよびドメインQを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、第6ポリペプチド鎖はドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され；(d)第1および第5のポリペプチドは、NドメインとPドメインとの間の相互作用およびOドメインとQドメインとの間の相互作用を介して会合し、第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0026】

ある特定の態様では、(a)ドメインNおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり

10

20

30

40

50

、ドメインHおよびドメインRのアミノ酸配列は同一であり、ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインIおよびドメインSのアミノ酸配列は同一であり、ドメインPおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLおよびドメインTのアミノ酸配列は同一であり、ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMおよびドメインUのアミノ酸配列は同一であり；(b) AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成し、RドメインとTドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第4の抗原結合部位を形成する。

10

【0027】

ある特定の態様では、請求項36に記載の結合分子であって、ここで：(a) ドメインHおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり、ドメインNおよびドメインRのアミノ酸配列は同一であり、ドメインIおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインOおよびドメインSのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインPおよびドメインTのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインQおよびドメインUのアミノ酸配列は同一であり；(b) AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成し、RドメインとTドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第4の抗原結合部位を形成する。

20

【0028】

ある特定の態様では、AドメインとBドメインとの間のジャンクションを形成する配列は、IKRTPREPまたはIKRTVREPである。ある特定の態様では、FドメインとGドメインとの間のジャンクションを形成する配列は、SSASPREPである。

【0029】

ある特定の態様では、少なくとも1つのCH3アミノ酸配列は、CH3アミノ酸配列とヒンジアミノ酸配列とを連結するC末端トリペプチド挿入物を有し、ここでトリペプチド挿入物は、PGK、KSCおよびGECからなる群から選択される。

30

【0030】

ある特定の態様では、配列はヒト配列である。ある特定の態様では、少なくとも1つのCH3アミノ酸配列はIgG配列である。ある特定の態様では、IgG配列はIgG1配列である。ある特定の態様では、少なくとも1つのCH3アミノ酸配列は、1つまたは複数のイソアロタイプ変異を有する。ある特定の態様では、イソアロタイプ変異はD356EおよびL358Mである。ある特定の態様では、CLアミノ酸配列はCカップ配列である。

【0031】

また本明細書において、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を含む結合分子であって、(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAはVLアミノ酸配列を有し、ドメインBはCH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはCH2アミノ酸配列を有し、ドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(b) 第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFはVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはCH3アミノ酸配列を有し；(c) 第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJおよびドメインKを含み、ドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインJはCH2アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(d) 第4のポリペプチ

40

50

ド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；（e）第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合し；（f）第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；（g）第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合し、結合分子を形成する、結合分子が開示される。

【0032】

ある特定の態様では、ドメインEはCH3アミノ酸配列を有し；ドメインHはVLアミノ酸配列を有し；ドメインIはCLアミノ酸配列を有し、ドメインKはCH3アミノ酸配列を有し；ドメインLはVHアミノ酸配列を有し；ドメインMはCH1アミノ酸配列を有する。

【0033】

また本明細書において、本明細書に開示されたまたは記載されたいずれかの結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が開示される。

【0034】

また本明細書において、本明細書に開示されたまたは記載されたいずれかの結合分子と、本明細書に開示されたまたは記載されたいずれかの薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、処置方法が開示される。

5. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、CH1-CLと対になったCH3-CH3 IgG1二量体対のアライメントを示す。四次構造は、約1.6 Å²のRMSDで整列している。

【0036】

【図2】図2は、本明細書に記載の様々な結合分子（抗体構築物とも称される）について、それぞれの命名規則と共に、構成の概略図を示す。

【0037】

【図3】図3は、本明細書に記載の二価1×1抗体構築物について、それぞれの命名規則と共に、ポリペプチド鎖とそれらのドメインのより高解像度の概略図を示す。

【0038】

【図4】図4は、例示的な二価の単一特異性構築物の構成を示す。

【0039】

【図5】図5は、実施例1に記載のバイオレイヤー干渉（biolayer interferometry、BLI）実験からのデータを示し、ここでは、図4に示した構成を有する二価の単一特異性結合分子「ポリペプチド1：VL-CH3（ノブ）-CH2-CH3／ポリペプチド2：VH-CH3（ホール）」がアッセイされた。抗原結合部位は、TNFαに対して特異的であった。結合分子固定化および固定化された構築物へのTNFα結合からのBLI応答は、抗原への頑強で特異的な二価結合を示す。データは、分子が、ポリペプチド1とポリペプチド2との意図された対形成を高いパーセンテージで有していることと一致する。

【0040】

【図6】図6は、例示的な二価の1×1二重特異性結合分子「BC1」の特徴を示す。

【0041】

【図7】図7Aは、単一ステップのCH1親和性精製ステップ（Capture Select（商標）CH1親和性樹脂）により、ゲル濾過を介して、>98%が非凝集二価タンパク質である単一の単分散ピークが得られることを実証する、「BC1」のサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）解析を示す。図7Bは、CrossMab二価抗体構築物のSEC解析の比較文献データ [Schaeferら、(Proc Natl Acad Sci USA、2011年

10

20

30

40

50

7月5日；108巻（27号）：11187～92頁）からのデータ]を示す。

【0042】

【図8】図8Aは、Capture Select（商標）CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の「BC1」の陽イオン交換クロマトグラフィ溶出プロファイルであって、単一のタイトなピークが示されている。図8Bは、標準プロテインA精製を使用して精製した後の「BC1」の陽イオン交換クロマトグラフィの溶出プロファイルである。

【0043】

【図9】図9は、様々な精製段階での「BC1」の非還元SDS-PAGEゲルを示す。

【0044】

【図10】図10Aおよび10Bは、非還元および還元条件下の両方での単一ステップのCH1-親和性精製後の「BC1」のSDS-PAGEゲル（図10A）を、参考文献で公開されている非還元および還元条件下のCross Mab二重特異性抗体のSDS-PAGEゲル（図10B）と比較した図である。

10

【0045】

【図11】図11Aおよび11Bは、還元条件下の2つの別個の重鎖（図11A）、および2つの別個の軽鎖（図11B）を実証する「BC1」の質量分析の解析を示す。

【0046】

【図12】図12は、精製後の不完全な対形成の非存在を確認する、非還元条件下で精製された「BC1」の質量分析の解析を示す。

【0047】

【図13】図13は、2つのIgG対照抗体と比較した、「BC1」の40℃で8週間にわたる安定性を実証する、加速安定性試験データを示す。

20

【0048】

【図14】図14は、実施例3でさらに説明されている、例示的な二価1×1二重特異性結合分子「BC6」の特徴を示す。

【0049】

【図15】図15Aは、単一ステップのCH1親和性精製によって単一の単分散ピークが得られることと非共有結合凝集体が存在しないことを実証する、Capture Select（商標）CH1親和性樹脂を使用したワンステップ精製後の「BC6」のサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）解析を示す。図15Bは、非還元条件下での「BC6」のSDS-PAGEゲルを示す。

30

【0050】

【図16】図16は、実施例4でさらに説明されている、例示的な二価の二重特異性結合分子「BC28」の特徴を示す。

【0051】

【図17】図17は、「BC28」、「BC29」、「BC30」、「BC31」および「BC32」の単一ステップのCH1親和性精製後の非還元条件下のSDS-PAGE解析を示す。

【0052】

【図18】図18は、それぞれ、Capture Select（商標）CH1親和性樹脂を使用したワンステップ精製後の「BC28」および「BC30」のSEC解析を示す。

40

【0053】

【図19】図19は、実施例5でさらに説明されている、例示的な二価の二重特異性結合分子「BC44」の特徴を示す。

【0054】

【図20】図20Aおよび20Bは、それぞれ加速安定性試験条件下での、2つの二価結合分子「BC15」および「BC16」のサイズ排除クロマトグラフィデータを示す。「BC15」および「BC16」は、異なる可変領域-CH3ジャンクションを有する。

【0055】

【図21】図21は、本明細書に記載の三価の2×1抗体構築物について、それぞれの命

50

名規則と共に、ポリペプチド鎖とそれらのドメインの概略図を示す。

【0056】

【図22】図22は、実施例7でさらに説明されている、例示的な三価 2×1 二重特異性結合分子「BC1- 2×1 」の特徴を示す。

【0057】

【図23】図23は、様々な精製段階で、ThermoFisher Expi293一過性トランスフェクション系を使用して発現された「BC1」および「BC1- 2×1 」タンパク質の非還元SDS-PAGEを示す。

【0058】

【図24】図24は、Octet (Pall ForteBio) バイオレイヤー干渉解析を使用して、二価 1×1 構築物「BC1」のアビディティを、三価 2×1 構築物「BC1- 2×1 」のアビディティと比較したものである。

【0059】

【図25】図25は、三価 2×1 構築物「TB111」の顕著な特徴を示す。

【0060】

【図26】図26は、本明細書に記載の三価 1×2 抗体構築物について、それぞれの命名規則と共に、ポリペプチド鎖とそれらのドメインの概略図を示す。

【0061】

【図27】図27は、実施例10にさらに説明されている、例示的な三価 1×2 構築物「CTLA4- $4 \times$ Nivo $\times$ CTLA4-4」の特徴を示す。

【0062】

【図28】図28は、SDS-PAGEゲルであり、ここで非還元（「-DTT」）および還元（「+DTT」）条件下の三価 1×2 構築物「CTLA4- $4 \times$ Nivo $\times$ CTLA4-4」構築物を示すレーンを枠で囲っている。

【0063】

【図29】図29は、2つの抗体：二価 1×1 構築物「CTLA4- $4 \times$ OX40-8」および三価 1×2 構築物「CTLA4- $4 \times$ Nivo $\times$ CTLA4-4」の間の抗原結合の比較を示す。「CTLA4- $4 \times$ OX40-8」は、CTLA4に一価的に結合する一方、「CTLA4- $4 \times$ Nivo $\times$ CTLA4-4」は、CTLA4に二価的に結合する。

【0064】

【図30】図30は、実施例11にさらに説明されている、例示的な三価 1×2 三重特異性構築物「BC28- $1 \times 1 \times 1a$ 」の特徴を示す。

【0065】

【図31】図31は、単一の明確に確定されるピークを示す、一過性発現および単一ステップのCH1親和性樹脂精製後の「BC28- $1 \times 1 \times 1a$ 」のサイズ排除クロマトグラフィを示す。

【0066】

【図32】図32は、実施例12でさらに説明されるように、それぞれ一過性発現およびCapture Select (商標) CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の二価および三価構築物の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEの結果を示す。

【0067】

【図33】図33A~33Cは、3つの抗原：PD1、抗原「A」およびCTLA4へのOctet結合分析を示す。実施例13でさらに説明されるように、図33Aは、「BC1」の、PD1および抗原「A」への結合を示し；図33Bは、二価二重特異性構築物「CTLA4- $4 \times$ OX40-8」の、CTLA4、抗原「A」およびPD1への結合を示し；図33Cは、三価三重特異性「BC28- $1 \times 1 \times 1a$ 」の、PD1、抗原「A」およびCTLA4への結合を示す。

【0068】

【図34】図34は、本明細書に記載の特定の四価 2×2 構築物について、それぞれの命

10

20

30

40

50

名規則と共に、ポリペプチド鎖とそれらのドメインの概略図を示す。

【0069】

【図35】図35は、実施例14にさらに説明されている、例示的な四価 2×2 構築物「BC22- 2×2 」の特定の顕著な特徴を示す。

【0070】

【図36】図36は、様々な精製段階で、 2×2 四価「BC22- 2×2 」構築物を、 1×2 三価構築物「BC12- 1×2 」および 2×1 三価構築物「BC21- 2×1 」と比較する、非還元SDS-PAGEゲルである。

【0071】

【図37】図37は、例示的な四価 2×2 構築物の構成を示す。

10

【0072】

【図38】図38は、本明細書に記載の特定の四価構築物について、それぞれの命名規則と共に、ポリペプチド鎖とそれらのドメインの概略図を示す。

【0073】

【図39】図39は、二重特異性四価構築物の例示的な構成を示す。

【0074】

【図40】図40は、共通鎖戦略を利用した三重特異性四価構築物についての例示的な構成を示す。

【0075】

【図41】図41は、図39に概略化された四価構築物による二重特異性抗原係合を示し、この構築物が同時係合できたことを実証する。B-Body固定化および固定化された構築物へのTNF α 結合からのバイオレイヤー干渉(BLI)応答は、分子が、意図された鎖の対形成を高いパーセンテージで有していることと一致する。

20

【0076】

【図42】図42は、B-Bodyの細胞表面抗原への結合のフローサイトメトリー解析を示す。網掛けで示すシグナルは、抗原なしの細胞を示し；ドットで示すシグナルは、表面抗原で一過性にトランスフェクトされた細胞を示す。

【0077】

【図43】図43は、三価構築物の例示的な構成を示す。

【0078】

30

【図44】図44は、三価構築物の例示的な構成を示す。

【0079】

【図45】図45は、実施例17でさらに説明されているように、それぞれ一過性発現およびCapture Select (商標) CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の二価および三価構築物の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEの結果を示す。

【0080】

【図46】図46は、ジャンクションバリエーションの対形成安定性を評価するために測定された「BC24jv」、「BC26jv」および「BC28jv」の熱転移の差異を示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0081】

図面は、例示の目的のためのみに、本発明の様々な実施形態を示している。当業者は、本明細書に例示された構造および方法の代替的实施形態が、本明細書に記載の本発明の原理から逸脱することなく利用しうることを以下の説明から容易に認識する。

6. 詳細な説明

6.1. 定義

【0082】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されている意味を有する。本明細書で使用される場合、以下の用語は、下記で与えられる意味を有する。

50

【0083】

「抗原結合部位」は、所与の抗原またはエピトープを特異的に認識するまたはそれに特異的に結合する結合分子の領域を意味する。

【0084】

「B - B o d y」は、本明細書に記載される結合分子構築物のいずれかを意味する。

【0085】

本明細書で使用される場合、「処置する」または「処置」という用語は、治療的処置および予防的または防止的手段の両方を指し、ここで目的は、多発性硬化症、関節炎またはがんの進行などの望ましくない生理学的変化または障害を予防または減速（軽減）することである。有益または望ましい臨床結果としては、検出可能であろうとまたは検出不能であろうと、症状の緩和、疾患の範囲の縮減、疾患の安定した（つまり、悪化していない）状態、疾患の進行の遅延または減速、疾患の状態の回復または緩和、および寛解（部分的寛解または完全寛解）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けない場合の予測生存期間と比較した生存期間の延長も意味する。処置を必要とする対象には、すでに状態もしくは障害に罹患している対象、ならびに状態もしくは障害を有する傾向にある対象、または状態もしくは障害を予防すべき状態にある対象が含まれる。

【0086】

「対象」、「個体」、「動物」、「患者」または「哺乳動物」は、診断、予防または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象には、ヒト、家庭用動物、農業用動物、ならびに動物園、スポーツまたはペット動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、乳牛などが含まれる。

【0087】

「十分な量」という用語は、所望の効果を生じさせるために十分な量、例えば、細胞内のタンパク質凝集を調節するために十分な量を意味する。

【0088】

「治療有効量」は、疾患の症状を改善するために有効な量である。予防が治療と考えることができるように、治療有効量は「予防有効量」であることができる。

6. 2. その他の解釈上の規則

【0089】

別途指定しない限り、本明細書における配列に対する全ての参照は、アミノ酸配列に対するものである。

【0090】

別途指定しない限り、抗体定常領域残基ナンバリングは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHGnber.html#refs（2017年8月22日にアクセス）およびEdelmanら、Proc. Natl. Acad. USA、63巻：78～85頁（1969年）に記載のE u インデックスに従い、本明細書に記載される結合分子の鎖内の残基の物理的な位置にかかわらず、内在性定常領域配列におけるその位置にしたがって残基を識別する。「内在性配列」または「天然配列」は、生物、組織、または細胞に由来し、人工的に改変または変異されていない、核酸およびアミノ酸配列の両方を含む任意の配列を意味する。

【0091】

この開示において、「含む（comprises）」、「含むこと（comprising）」、「含有すること（containing）」、「有すること（having）」、「含む（includes）」、「含むこと（including）」およびその言語的变化形は、米国特許法でそれらが帰する意味を有し、明示的に列挙されている成分以外のさらなる成分の存在を許容する。

【0092】

本明細書で提供される範囲は、列挙される端点を含む範囲内の全ての値についての省略表現と理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36

10

20

30

40

50

、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50からなる群からの任意の数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

【0093】

特に明記されていない限りまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する「または」という用語は、包括的であると理解される。特に明記されていない限りまたは文脈から明らかでない限り、「a」、「an」および「the」という用語は、単数または複数であると理解される。

【0094】

特に明記されていない限りまたは文脈から明らかでない限り、本明細書で使用する「約」という用語は、当技術分野で通常許容される範囲内、例えば、平均の2標準偏差以内と理解される。約は、示された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%または0.01%以内と理解することができる。文脈から明らかでない限り、本明細書で提供される全ての数値は、約という用語によって修飾されている。

6.3. 結合分子

【0095】

第1の態様では、結合分子が提供される。

【0096】

図3を参照して、第1の一連の実施形態では、結合分子は、第1および第2のポリペプチド鎖を含み、(a)第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAはVLアミノ酸配列を有し、ドメインBはCH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはCH2アミノ酸配列を有し、およびドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(b)第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFはVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはCH3アミノ酸配列を有し；(c)第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0097】

また図3を参照して、第2の一連の実施形態では、結合分子はさらに、第3および第4のポリペプチド鎖を含み、(a)第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJおよびドメインKを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインJはCH2アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(b)第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(c)第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；(d)第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0098】

様々な実施形態において、第1と第3のポリペプチド鎖は、配列が互いに同一であり、第2と第4のポリペプチドは、配列が互いに同一である。これらの実施形態では、ドメインEとドメインKとの間の相互作用を介した第1と第3のポリペプチド鎖の会合（下記セクション6.3.15を参照）が、下記実施例1に例示される構築物などの二価の単一特異性抗体構築物を形成する。

【0099】

他の実施形態では、第1と第3のポリペプチド鎖は配列が互いに同一でなく、第2と第4のポリペプチドは配列が互いに同一でない。これらの実施形態では、ドメインEとドメ

10

20

30

40

50

インKとの間の相互作用を介した第1と第3のポリペプチド鎖の会合（下記セクション6.3.15を参照）が、二価の二重特異性抗体構築物を形成することができる。

6.3.1. ドメインA (VL)

【0100】

本明細書に記載される結合分子において、ドメインAは、VLアミノ酸配列を有する。本明細書に記載の結合分子において有用なVLアミノ酸配列は、抗体軽鎖可変ドメイン配列である。本明細書に記載の天然抗体および抗体構築物の両方における典型的な配列では、特異的VLアミノ酸配列が、特異的VHアミノ酸配列と会合して、抗原結合部位を形成する。様々な実施形態では、VLアミノ酸配列は、下記セクション6.3.1.1および6.3.1.2においてさらに詳細に記載されているように、ヒト配列、合成配列、または、ヒト配列、非ヒト哺乳動物配列、哺乳動物配列および／もしくは合成配列の組合せを含む、哺乳動物配列である。

10

【0101】

様々な実施形態では、VLアミノ酸配列は、天然に存在する配列の変異配列である。ある特定の実施形態では、VLアミノ酸配列は、ラムダ (λ) 軽鎖可変ドメイン配列である。ある特定の実施形態では、VLアミノ酸配列は、カッパ (κ) 軽鎖可変ドメイン配列である。好ましい実施形態では、VLアミノ酸配列は、カッパ (κ) 軽鎖可変ドメイン配列である。

【0102】

本明細書に記載の結合分子では、ドメインAのC末端は、ドメインBのN末端に連結されている。ある特定の実施形態では、ドメインAは、下記セクション6.3.19.1および実施例6においてさらに詳細に記載されているように、ドメインAとドメインBとの間のジャンクションにおいてそのC末端で変異しているVLアミノ酸配列を有する。

20

6.3.1.1. 相補性決定領域

【0103】

VLアミノ酸配列は、「相補性決定領域」(CDR)と称される高度に可変性の配列、典型的に3つのCDR(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む。様々な実施形態では、CDRは、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、CDRは、ヒト配列である。様々な実施形態では、CDRは、天然に存在する配列である。様々な実施形態では、CDRは、特定の抗原またはエピトープに対して抗原結合部位の結合親和性を変化させるように変異された天然に存在する配列である。ある特定の実施形態では、天然に存在するCDRは、親和性成熟および体細胞超変異を介して*in vivo*宿主で変異されている。ある特定の実施形態では、CDRは、PCR突然変異誘発および化学的突然変異誘発を含むがこれらに限定されない方法を介して*in vitro*で変異されている。様々な実施形態では、CDRは、ランダム配列CDRライブラリおよび合理的に設計されたCDRライブラリから得られたCDRを含むがこれらに限定されない、合成配列である。

30

6.3.1.2. フレームワーク領域およびCDRグラフト化

【0104】

VLアミノ酸配列は、「フレームワーク領域」(FR)配列を含む。FRは、一般的に、散在されたCDRの足場として作用する保存配列領域(セクション6.3.1.1.参照)であり、典型的には、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4配置(N末端からC末端へ)である。様々な実施形態では、FRは、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、FRは、ヒト配列である。様々な実施形態では、FRは、天然に存在する配列である。様々な実施形態では、FRは、合理的に設計された配列を含むがこれに限定されない、合成配列である。

40

【0105】

様々な実施形態では、FRおよびCDRは両方が、同じ天然に存在する可変ドメイン配

50

列に由来する。様々な実施形態では、FRおよびCDRは、異なる可変ドメイン配列に由来し、ここでCDRはFR足場にグラフト化され、CDRが特定の抗原に対する特異性を提供している。ある特定の実施形態では、グラフト化されたCDRは全て、同じ天然に存在する可変ドメイン配列に由来する。ある特定の実施形態では、グラフト化されたCDRは、異なる可変ドメイン配列に由来する。ある特定の実施形態では、グラフト化されたCDRは、ランダム配列CDRライブラリおよび合理的に設計されたCDRライブラリから得られたCDRを含むがこれらに限定されない、合成配列である。ある特定の実施形態では、グラフト化されたCDRおよびFRは、同じ種に由来する。ある特定の実施形態では、グラフト化されたCDRおよびFRは、異なる種に由来する。好ましいグラフト化されたCDR実施形態では、抗体は「ヒト化」されており、ここで、グラフト化されたCDRは、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバおよびヤギ配列を含むがこれらに限定されない非ヒト哺乳動物配列であり、FRはヒト配列である。ヒト化抗体は、教示する全てについてその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,407,213号においてより詳細に議論されている。様々な実施形態では、ある種に由来するFRの部分または特定の配列は、別の種のFRの部分または特定の配列を置き換えるために使用される。

10

6.3.2. ドメインB (CH3)

【0106】

結合分子では、ドメインBは、CH3アミノ酸配列である。CH3アミノ酸配列は、本明細書に記載されるように、抗体重鎖のC末端ドメインの配列である。

20

【0107】

様々な実施形態では、CH3配列は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、CH3配列は、ヒト配列である。ある特定の実施形態では、CH3配列は、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4アイソタイプに由来し、またはIgEもしくはIgMアイソタイプ由来のCH4配列である。好ましい実施形態では、CH3配列は、IgG1アイソタイプに由来する。

【0108】

ある特定の実施形態では、CH3配列は、内在性配列である。特定の実施形態では、CH3配列は、UniProt受託番号P01857アミノ酸224-330である。様々な実施形態では、CH3配列は、内在性CH3配列のセグメントである。特定の実施形態では、CH3配列は、N末端アミノ酸G224およびQ225を欠く内在性CH3配列を有する。特定の実施形態では、CH3配列は、C末端アミノ酸P328、G329およびK330を欠く内在性CH3配列を有する。特定の実施形態では、CH3配列は、N末端アミノ酸G224およびQ225ならびにC末端アミノ酸P328、G329およびK330を欠く内在性CH3配列を有する。好ましい実施形態では、結合分子は、CH3配列を有する複数のドメインを有し、ここで、CH3配列は、全長内在性CH3配列、ならびにN末端アミノ酸、C末端アミノ酸、またはその両方を欠くCH3配列の両方を指すことができる。

30

【0109】

ある特定の実施形態では、CH3配列は、1つまたは複数の変異を有する内在性配列である。特定の実施形態では、変異は、下記セクション6.3.14.1-6.3.14.3においてさらに詳細に記載されているように、内在性CH3配列に導入されて特定のCH3配列の特定の対形成をガイドする、1つまたは複数の直交型変異である。

40

【0110】

ある特定の実施形態では、教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれるSticklerら (Genes Immun., 2011年4月; 12巻(3号): 213~221頁)においてより詳細に記載されているように、CH3配列は、本明細書でイソアロタイプ変異と称される、あるアロタイプの特定のアミノ酸を別のアロタイプのアミノ酸に置き換えることによって、抗体の免疫原性を低減するように操作されている。特定の実施形態では、G

50

1 m 1 アロタイプの特定のアミノ酸が置き換えられている。好ましい実施形態では、C H 3 配列において、イソアロタイプ変異 D 3 5 6 E および L 3 5 8 M がなされている。

【0111】

好ましい実施形態では、ドメイン B は、以下の変異変化 P 3 4 3 V ; Y 3 4 9 C ; およびトリペプチド挿入物 4 4 5 P、4 4 6 G、4 4 7 K を有するヒト I g G 1 C H 3 アミノ酸配列を有する。他の好ましい実施形態では、ドメイン B は、以下の変異変化：T 3 6 6 K ; およびトリペプチド挿入物 4 4 5 K、4 4 6 S、4 4 7 C を有するヒト I g G 1 C H 3 配列を有する。さらなる他の好ましい実施形態では、ドメイン B は、以下の変異変化：Y 3 4 9 C およびトリペプチド挿入物 4 4 5 P、4 4 6 G、4 4 7 K を有するヒト I g G 1 C H 3 配列を有する。

10

【0112】

ある特定の実施形態では、ドメイン B は、それらと異なって、内在性 C H 3 配列に組み込まれた 4 4 7 C 変異を有するヒト I g G 1 C H 3 配列を有する。

【0113】

本明細書に記載される結合分子では、ドメイン B の N 末端が、ドメイン A の C 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、ドメイン B は、下記セクション 6 . 3 . 1 9 . 1 および実施例 6 においてさらに詳細に記載されているように、ドメイン A とドメイン B との間のジャンクションにおいてその N 末端で変異している C H 3 アミノ酸配列を有する。

【0114】

結合分子では、ドメイン B の C 末端は、ドメイン D の N 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、ドメイン B は、下記セクション 6 . 3 . 1 9 . 3 においてさらに詳細に記載されているように、ドメイン B とドメイン D との間のジャンクションに C 末端で伸長されている C H 3 アミノ酸配列を有する。

20

6 . 3 . 3 . ドメイン D (C H 2)

【0115】

本明細書に記載される結合分子では、ドメイン D は、C H 2 アミノ酸配列を有する。C H 2 アミノ酸配列は、本明細書に記載されるように、N 末端から C 末端へ参照して天然抗体重鎖の第 3 のドメインの C H 2 アミノ酸配列である。様々な実施形態では、C H 2 配列は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、C H 2 配列は、ヒト配列である。ある特定の実施形態では、C H 2 配列は、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 または I g M アイソタイプに由来する。好ましい実施形態では、C H 2 配列は、I g G 1 アイソタイプに由来する。

30

【0116】

ある特定の実施形態では、C H 2 配列は、内在性配列である。特定の実施形態では、配列は、UniProt 受託番号 P 0 1 8 5 7 アミノ酸 1 1 1 - 2 2 3 である。好ましい実施形態では、C H 2 配列は、下記セクション 6 . 3 . 1 9 . 3 においてより詳細が議論されているように、N 末端可変ドメイン - 定常ドメインセグメントを、C H 2 ドメインへ連結する N 末端ヒンジ領域ペプチドを有する。

【0117】

結合分子では、ドメイン D の N 末端が、ドメイン B の C 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、ドメイン B は、下記セクション 6 . 3 . 1 9 . 3 においてさらに詳細に記載されているように、ドメイン D とドメイン B との間のジャンクションにおいて C 末端で伸長されている C H 3 アミノ酸配列を有する。

40

【0118】

結合分子では、ドメイン D の C 末端が、ドメイン E の N 末端に連結されている。特定の実施形態では、ドメイン D は、下記セクション 6 . 3 . 1 9 . 5 においてさらに詳細に記載されているように、C H 1 アミノ酸配列または C L アミノ酸配列を有するドメイン E の N 末端に連結されている。

6 . 3 . 4 . ドメイン E (定常領域)

50

【0119】

結合分子では、ドメインEは、定常領域ドメインアミノ酸配列を有する。本明細書に記載される場合、定常領域ドメインアミノ酸配列は、抗体の定常領域ドメインの配列である。

【0120】

様々な実施形態では、定常領域配列は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、定常領域配列は、ヒト配列である。ある特定の実施形態では、定常領域配列は、抗体軽鎖由来である。特定の実施形態では、定常領域配列は、ラムダまたはカッパ軽鎖由来である。ある特定の実施形態では、定常領域配列は、抗体重鎖由来である。特定の実施形態では、定常領域配列は、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgMアイソタイプである抗体重鎖配列である。好ましい実施形態では、定常領域配列は、IgG1アイソタイプに由来する。ある特定の実施形態では、定常領域配列は、CH3配列である。CH3配列は、上記セクション6.3.2においてさらに詳細に記載されている。

10

【0121】

特定の実施形態では、定常領域配列は、1つまたは複数の直交型変異を含むように変異されている。好ましい実施形態では、ドメインEは、下記セクション6.3.14.2においてより詳細に記載されているように、ノブ・ホール（同義的に「ノブ・イン・ホール」、「KIH」）直交型変異、ならびに下記セクション6.3.14.1においてより詳細に記載されているように、直交型変異を含有するCH3ドメインと操作されたジスルフィド架橋を形成するS354CまたはY349C変異のいずれかを含むCH3配列である定常領域配列を有する。一部の好ましい実施形態では、ノブ・ホール直交型変異は、T366W変異である。

20

【0122】

ある特定の実施形態では、定常領域ドメイン配列は、CH1配列である。CH1配列は、下記セクション6.3.4.1においてさらに詳細に記載されている。ある特定の実施形態では、CH1ドメインのN末端は、下記で6.3.19.5においてさらに詳細に記載されているように、CH2ドメインのC末端に連結されている。

【0123】

ある特定の実施形態では、定常領域配列は、CL配列である。CL配列は、下記セクション6.3.4.2においてさらに詳細に記載されている。ある特定の実施形態では、下記で6.3.19.5においてさらに詳細に記載されているように、CLドメインのN末端は、CH2ドメインのC末端に連結されている。

30

6.3.4.1. CH1ドメイン

【0124】

CH1アミノ酸配列は、本明細書に記載される場合、N末端からC末端へ参照して抗体重鎖の第2のドメインの配列である。ある特定の実施形態では、CH1配列は、内在性配列である。様々な実施形態では、CH1配列は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、CH1配列は、ヒト配列である。ある特定の実施形態では、CH1配列は、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgMアイソタイプに由来する。好ましい実施形態では、CH1配列は、IgG1アイソタイプに由来する。好ましい実施形態では、CH1配列は、UniProt受託番号P01857アミノ酸1-98である。

40

6.3.4.2. CLドメイン

【0125】

本明細書に記載される結合分子において有用なCLアミノ酸配列は、抗体軽鎖定常ドメイン配列である。ある特定の実施形態では、CL配列は、内在性配列である。様々な実施形態では、CL配列は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヤギおよびヒト配列を含むがこれらに限定されない哺乳動物配列である。好ましい実施形態では、

50

C L 配列は、ヒト配列である。

【0126】

ある特定の実施形態では、C L アミノ酸配列は、ラムダ (λ) 軽鎖定常ドメイン配列である。特定の実施形態では、C L アミノ酸配列は、ヒトラムダ軽鎖定常ドメイン配列である。好ましい実施形態では、ラムダ (λ) 軽鎖配列は、UniProt 受託番号 P0CG04 である。

【0127】

ある特定の実施形態では、C L アミノ酸配列は、カップ (κ) 軽鎖定常ドメイン配列である。好ましい実施形態では、C L アミノ酸配列は、ヒトカップ (κ) 軽鎖定常ドメイン配列である。好ましい実施形態では、カップ軽鎖配列は、UniProt 受託番号 P01834 である。

10

6.3.5. ドメイン F (VH)

【0128】

結合分子では、ドメイン F は、VH アミノ酸配列を有する。本明細書に記載の結合分子における VH アミノ酸配列は、抗体重鎖可変ドメイン配列である。本明細書に記載の天然および結合分子の両方における典型的な抗体配置では、特定の VH アミノ酸配列が、特定の VL アミノ酸配列と会合して、抗原結合部位を形成する。様々な実施形態では、VH アミノ酸配列は、上記セクション 6.3.1.1 および 6.3.1.2 においてさらに詳細に記載されているように、ヒト配列、合成配列、または、非ヒト哺乳動物配列、哺乳動物配列および／もしくは合成配列の組合せを含む、哺乳動物配列である。様々な実施形態では、VH アミノ酸配列は、天然に存在する配列の変異配列である。

20

6.3.6. ドメイン G (CH3)

【0129】

結合分子では、ドメイン G は、CH3 アミノ酸配列を有する。CH3 配列は、上記セクション 6.3.2 においてさらに詳細に記載されている。

【0130】

ある特定の好ましい実施形態では、ドメイン G は、以下の変異変化：S354C；およびトリペプチド挿入物 445P、446G、447K を有するヒト IgG1 CH3 配列を有する。一部の好ましい実施形態では、ドメイン G は、以下の変異変化：S354C；および 445P、446G、447K トリペプチド挿入物を有するヒト IgG1 CH3 配列を有する。一部の好ましい実施形態では、ドメイン G は、以下の変化：L351D；および 445G、446E、447C トリペプチド挿入物を有するヒト IgG1 CH3 配列を有する。

30

6.3.7. ドメイン H (可変領域)

【0131】

結合分子では、ドメイン H は、可変領域ドメインアミノ酸配列を有する。可変領域ドメインアミノ酸配列は、本明細書に記載される場合、VL および VH 抗体ドメイン配列を含む抗体の可変領域ドメインアミノ酸配列である。VL および VH 配列は、それぞれ上記セクション 6.3.1 および 6.3.5 においてさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ドメイン H は、VL 抗体ドメイン配列を有する。

40

6.3.8. ドメイン I (定常領域)

【0132】

本明細書に記載される結合分子では、ドメイン I は、定常領域ドメインアミノ酸配列を有する。定常領域ドメインアミノ酸配列は、上記セクション 6.3.4 においてさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ドメイン I は、セクション 6.3.4.2 においてより詳細に議論されているように、カップ軽鎖由来の C L である定常領域配列を有する。

6.3.9. ドメイン J (CH2)

【0133】

結合分子では、ドメイン J は、CH2 アミノ酸配列を有する。CH2 アミノ酸配列は、

50

上記セクション 6. 3. 3 でさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、C H 2 アミノ酸配列は、下記セクション 6. 3. 19. 4 においてより詳細に記載されているように、ドメイン J をドメイン I へ連結する N 末端ヒンジ領域を有する。

【0134】

結合分子では、ドメイン J の C 末端は、ドメイン K の N 末端に連結されている。特定の実施形態では、ドメイン J は、下記セクション 6. 3. 19. 5 においてさらに詳細に記載されているように、C H 1 アミノ酸配列または C L アミノ酸配列を有するドメイン K の N 末端に連結されている。

6. 3. 10. ドメイン K (定常領域)

【0135】

結合分子では、ドメイン K は、定常領域ドメインアミノ酸配列を有する。定常領域ドメインアミノ酸配列は、上記セクション 6. 3. 4 においてさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ドメイン K は、下記セクション 6. 3. 14. 2 でさらに詳細に記載されているノブール直交型変異；上記 6. 3. 2 においてより詳細に記載されているイソアロタイプ変異；ならびに下記セクション 6. 3. 14. 1 においてより詳細に記載されている直交型変異を含有する C H 3 ドメインと操作されたジスルフィド架橋を形成する S 3 5 4 C または Y 3 4 9 C 変異のいずれかを含む C H 3 配列である定常領域配列を有する。一部の好ましい実施形態では、イソアロタイプ変異と組み合わせられたノブール直交型変異は、以下の変異変化：D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V である。

6. 3. 11. ドメイン L (可変領域)

【0136】

結合分子では、ドメイン L は、可変領域ドメインアミノ酸配列を有する。可変領域ドメインアミノ酸配列は、本明細書に記載される場合、V L および V H 抗体ドメイン配列を含む抗体の可変領域ドメインアミノ酸配列である。V L および V H 配列は、それぞれ上記セクション 6. 3. 1 および 6. 3. 5 においてさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ドメイン L は、V H 抗体ドメイン配列を有する。

6. 3. 12. ドメイン M (定常領域)

【0137】

結合分子では、ドメイン M は、定常領域ドメインアミノ酸配列を有する。定常領域ドメインアミノ酸配列は、上記セクション 6. 3. 4 においてさらに詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ドメイン M は、セクション 6. 3. 4. 1 においてより詳細に議論されているように、I g G 1 アイソタイプ由来の C H 1 である定常領域配列を有する。

6. 3. 13. ドメイン A および F の対形成

【0138】

結合分子では、ドメイン A V L アミノ酸配列およびドメイン F V H アミノ酸配列は会合して、抗原結合部位 (A B S) を形成する。A : F 抗原結合部位 (A B S) は、抗原のエピトープに特異的に結合することができる。A B S による抗原結合は、下記セクション 6. 3. 13. 1 においてさらに詳細に記載されている。

【0139】

様々な多価の実施形態では、ドメイン A および F (A : F) によって形成される A B S は、結合分子内の 1 つまたは複数の他の A B S と配列が同一であり、したがって、結合分子内の 1 つまたは複数の他の配列同一 A B S と同じ認識特異性を有する。

【0140】

様々な多価の実施形態では、A : F A B S は、結合分子内の 1 つまたは複数の他の A B S と配列が非同一である。ある特定の実施形態では、A : F A B S は、結合分子における 1 つまたは複数の他の配列非同一 A B S と異なる認識特異性を有する。特定の実施形態では、A : F A B S は、結合分子における少なくとも 1 つの他の配列非同一 A B S によって認識される抗原と異なる抗原を認識する。特定の実施形態では、A : F A B S は、結合分子における少なくとも 1 つの他の配列非同一 A B S によっても認識される抗原の

10

20

30

40

50

、異なるエピトープを認識する。この実施形態では、ドメインAおよびFによって形成されるABSは、抗原のエピトープを認識し、ここで、結合分子内の1つまたは複数の他のABSは、同じ抗原を認識するが、同じエピトープは認識しない。

6. 3. 13. 1. ABSによる抗原の結合

【0141】

ABSおよびそのようなABSを含む結合分子は、ABSが特異的に結合するエピトープ（またはより全体的には抗原）を「認識する」と言われ、エピトープ（またはより全体的には抗原）は、ABSの「認識特異性」または「結合特異性」と言われる。

【0142】

ABSは、特定の親和性で、その特定の抗原またはエピトープに結合すると言われる。

【0143】

本明細書で記載される場合、「親和性」は、1個の分子と別の分子との間の非共有結合性分子間力相互作用の強度を指す。親和性、つまり相互作用の強度は、解離平衡定数（ K_D ）として表すことができ、ここで K_D 値は低いほど、分子間の相互作用が強力であることを示す。抗体構築物の K_D 値は、当技術分野で周知の方法によって測定することができ、例えば、バイオレイヤー干渉法（例えば、Octet/FORTEBIO（登録商標））、表面プラズモン共鳴（SPR）技術（例えば、Biacore（登録商標））、および細胞結合アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書の目的のために、親和性は、Octet/FORTEBIO（登録商標）を使用してバイオレイヤー干渉法によって測定された解離平衡定数である。

【0144】

「特異的結合」は、本明細書で使用される場合、ABSとそのコグネート抗原またはエピトープとの間の親和性を指し、ここで K_D 値は、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満である。

【0145】

本明細書に記載される結合分子におけるABSの数は、結合分子の「価」を定義する。図2に概略化されるように、単一のABSを有する結合分子は「一価」である。複数のABSを有する結合分子は、「多価」であると言われる。2つのABSを有する多価結合分子は「二価」である。3つのABSを有する多価結合分子は「三価」である。4つのABSを有する多価結合分子は「四価」である。

【0146】

様々な多価の実施形態では、複数のABSは全て同じ認識特異性を有する。図2に概略化されているように、そのような結合分子は、「単一特異性」「多価」結合構築物である。他の多価の実施形態では、複数のABSの少なくとも2つが、異なる認識特異性を有する。そのような結合分子は、多価および「多重特異性」である。ABSが集約的に2つの認識特異性を有する多価の実施形態では、結合分子は二重特異性である。ABSが集約的に3つの認識特異性を有する多価の実施形態では、結合分子は三重特異性である。

【0147】

ABSが、集約的に、同じ抗原に存在する異なるエピトープに対して複数の認識特異性を有する多価の実施形態では、結合分子は、「多重パラトピック（multiparatopic）」である。ABSが、集約的に、同じ抗原の2つのエピトープを認識する多価の実施形態では、結合分子は、「二重パラトピック（biparatopic）」である。

【0148】

様々な多価の実施形態では、結合分子の多価性は、特定の標的に対する結合分子のアビディティを向上させる。本明細書で記載される場合、「アビディティ」は、2つまたはそれより多くの分子、例えば特定の標的に対する多価結合分子間の全体的な相互作用の強度を指し、ここで、アビディティは、複数のABSの親和性によって与えられる相互作用の累積強度である。アビディティは、上記で説明されているような、親和性を決定するために使用される方法と同じ方法によって測定することができる。ある特定の実施形態では、特定の標的に対する結合分子のアビディティは、相互作用が特異的結合相互作用であり、

10

20

30

40

50

ここで2つの分子間のアビディティは、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M未満の K_D 値を有する。ある特定の実施形態では、特定の標的に対する結合分子のアビディティが、相互作用が特異的結合相互作用である K_D 値であり、ここで個々のABSの1つまたは複数の親和性は、それらの各抗原またはエピトープ自体への特異的結合として十分な K_D 値を有していない。ある特定の実施形態では、アビディティは、共通の特定の標的または複合体の別個の抗原、例えば個々の細胞で見出される別個の抗原に対する複数のABSの親和性によって与えられる相互作用の累積強度である。ある特定の実施形態では、アビディティは、共通の個々の抗原の別個のエピトープに対する複数のABSの親和性によって与えられる相互作用の累積強度である。

6. 3. 14. ドメインBおよびGの対形成

【0149】

本明細書に記載の結合分子では、ドメインBのCH3アミノ酸配列とドメインGのCH3アミノ酸配列とが会合している。CH3配列は、上記セクション6. 3. 2においてさらに詳細に記載されている。

【0150】

様々な実施形態では、BおよびGドメインのアミノ酸配列は、同一である。これらの実施形態のいくつかでは、配列は、内在性CH3配列である。

【0151】

様々な実施形態では、BおよびGドメインのアミノ酸配列は異なっており、それぞれ別個に直交型改変を内在性CH3配列に含み、ここでBドメインはGドメインと相互作用し、BドメインとGドメインのどちらも、直交型改変を欠くCH3ドメインと顕著に相互作用しない。

【0152】

本明細書に記載される「直交型改変」または同義的に「直交型変異」は、直交型改変を有する第1のドメインの、相補的な直交型改変を有する第2のドメインに対する結合の親和性を増加させる抗体ドメインのアミノ酸配列における1つまたは複数の操作された変異である。ある特定の実施形態では、直交型改変は、直交型改変を有するドメインの、相補的な直交型改変を欠くドメインに対する親和性を減少させる。ある特定の実施形態では、直交型改変は、内在性抗体ドメイン配列における変異である。様々な実施形態では、直交型改変は、アミノ酸の付加または欠失を含むがこれらに限定されない、内在性抗体ドメイン配列のN末端またはC末端の改変である。特定の実施形態では、直交型改変には、下記セクション6. 3. 14. 1-6. 3. 14. 3においてさらに詳細に記載されている操作されたジスルフィド架橋、ノブ・イン・ホール変異および電荷対変異が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、直交型改変には、限定されないが、操作されたジスルフィド架橋、ノブ・イン・ホール変異および電荷対変異から選択される直交型改変の組合せが含まれる。特定の実施形態では、直交型改変は、上記セクション6. 3. 2においてさらに詳細に記載されているイソアロタイプ変異などの免疫原性を減少させるアミノ酸置換と組み合わせることができる。

6. 3. 14. 1. 直交型操作されたジスルフィド架橋

【0153】

様々な実施形態では、直交型改変は、第1のドメインと第2のドメインとの間の操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含む。本明細書に記載される場合、「操作されたジスルフィド架橋」は、2つまたはそれより多いドメインが会合するとき非天然ジスルフィド結合を形成するように、2つまたはそれより多いドメインに非内在性システインアミノ酸を提供する変異である。操作されたジスルフィド架橋は、教示する全てについて参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMerchantら (Nature Biotech (1998年) 16巻: 677~681頁) においてより詳細に記載されている。ある特定の実施形態では、操作されたジスルフィド架橋は、特定のドメイン間の直交型会合を改善させる。特定の実施形態では、操作されたジスルフィド架橋を生成する変異は、第1または第2のCH3ドメインの一方におけるK392C変異、ならびに他方のCH3ドメインにおけるD

10

20

30

40

50

399Cである。好ましい実施形態では、操作されたジスルフィド架橋を生成する変異は、第1または第2のCH3ドメインの一方におけるS354C変異、ならびに他方のCH3ドメインにおけるY349Cである。別の好ましい実施形態では、操作されたジスルフィド架橋を生成する変異は、KSCトリペプチド配列を組み込んだCH3ドメインのC末端の伸長によって提供される第1および第2のCH3ドメインの両方における447C変異である。

6.3.14.2. 直交型ノブ・ホール変異

【0154】

様々な実施形態では、直交型改変は、ノブ・ホール（同義的にノブ・イン・ホール）変異を含む。本明細書で記載される場合、ノブ・ホール変異は、第1のドメインが、相補的立体変異のないドメインとの会合と比較して、相補的立体変異を有する第2のドメインと優先的に会合するように、第1のドメインの表面の立体的特徴を変化させる変異である。ノブ・ホール変異は、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,821,333号および米国特許第8,216,805号において、より詳細に記載されている。様々な実施形態では、ノブ・ホール変異は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMerchantら（Nature Biotech（1998年）16巻：677～681頁）においてさらに詳細に記載されているように、操作されたジスルフィド架橋と組み合わせられる。様々な実施形態では、ノブ・ホール変異、イソアロタイプ変異、および操作されたジスルフィド変異が組み合わせられる。

【0155】

ある特定の実施形態では、ノブ・イン・ホール変異は、第1のドメインにおけるT366Y変異、ならびに第2のドメインにおけるY407T変異である。ある特定の実施形態では、ノブ・イン・ホール変異は、第1のドメインにおけるF405A、ならびに第2のドメインにおけるT394Wである。ある特定の実施形態では、ノブ・イン・ホール変異は、第1のドメインにおけるT366Y変異およびF405Aであり、第2のドメインにおけるT394WおよびY407Tである。ある特定の実施形態では、ノブ・イン・ホール変異は、第1のドメインにおけるT366W変異、ならびに第2のドメインにおけるY407Aである。ある特定の実施形態では、組み合わせられたノブ・イン・ホール変異および操作されたジスルフィド変異は、第1のドメインにおけるS354CおよびT366W変異、ならびに第2のドメインにおけるY349C、T366S、L368AおよびY407V変異である。好ましい実施形態では、組み合わせられたノブ・イン・ホール変異、イソアロタイプ変異、および操作されたジスルフィド変異は、第1のドメインにおけるS354CおよびT366W変異、ならびに第2のドメインにおけるY349C、D356E、L358M、T366S、L368AおよびY407V変異である。

6.3.14.3. 直交型電荷対変異

【0156】

様々な実施形態では、直交型改変は、電荷対変異である。本明細書で使用される場合、電荷対変異は、ドメインが、相補的電荷対変異の無いドメインとの会合と比較して、相補的電荷対変異を有する第2のドメインと優先的に会合するように、ドメインの表面のアミノ酸の電荷に影響を与える変異である。ある特定の実施形態では、電荷対変異は、特定のドメイン間の直交型会合を改善させる。電荷対変異は、それぞれ教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,592,562号、米国特許第9,248,182号、および米国特許第9,358,286号においてより詳細に記載されている。ある特定の実施形態では、電荷対変異は、特定のドメイン間の安定性を改善させる。好ましい実施形態では、電荷対変異は、第1のドメインにおけるT366K変異、および他のドメインにおけるL351D変異である。

6.3.15. ドメインEおよびKの対形成

【0157】

様々な実施形態では、Eドメインは、CH3アミノ酸配列を有する。

【0158】

様々な実施形態では、Kドメインは、CH₃アミノ酸配列を有する。

【0159】

様々な実施形態では、EおよびKドメインのアミノ酸配列は同一であり、配列は、内在性CH₃配列である。

【0160】

様々な実施形態では、EドメインとKドメインの配列は異なる。様々な実施形態では、異なる配列が、それぞれ別個に直交型改変を内在性CH₃配列に含み、ここでEドメインはKドメインと相互作用し、EドメインとKドメインのどちらも、直交型改変を欠くCH₃ドメインと顕著に相互作用しない。ある特定の実施形態では、直交型改変には、上記セクション6.3.14.1-6.3.14.3においてさらに詳細に記載されているように、操作されたジスルフィド架橋、ノブ・イン・ホール変異および電荷対変異が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、直交型改変には、限定されないが、操作されたジスルフィド架橋、ノブ・イン・ホール変異、および電荷対変異から選択される直交型改変の組合せが含まれる。特定の実施形態では、直交型改変は、イソアロタイプ変異などの免疫原性を減少させるアミノ酸置換と組み合わせることができる。

【0161】

様々な実施形態では、EドメインおよびKドメインのアミノ酸配列は、第1のポリペプチドと第3のポリペプチドとの間の特異的会合を促進する特異的相互作用を有するように選択された2つの異なる抗体ドメインの内在性配列である。様々な実施形態では、2つの異なるアミノ酸配列は、CH₁配列およびCL配列である。CH₁配列およびCL配列は、それぞれ上記セクション6.3.4.1および6.3.4.2においてさらに詳細に記載されている。特定の重鎖の会合を促進するために重鎖のC末端にCH₁およびCL配列を使用することが、教示する全てについて参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,242,247号に記載されている。ある特定の実施形態では、CH₁配列およびCL配列は両方とも内在性配列である。ある特定の実施形態では、CH₁配列およびCL配列は、それぞれ別個に直交型改変を内在性CH₁配列およびCL配列に含む。特定の実施形態では、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,053,562号および米国特許第9,527,927号においてナンバリングされ、より詳細が議論されているように、内在性CH₁およびCL配列における直交型改変は、CH₁配列における138位およびCL配列における116位、CH₁配列における128位およびCL配列における119位、またはCH₁配列における129位およびCL配列における210位の操作されたシステインから選択される、操作されたジスルフィド架橋である。好ましい実施形態では、操作されたシステインは、EuインデックスによってナンバリングされるCH₁配列における128位およびCLカップ配列における118位である。

6.3.16. ドメインIおよびMの対形成およびドメインHおよびLの対形成

【0162】

様々な実施形態では、ドメインIは、CL配列を有し、ドメインMは、CH₁配列を有する。様々な実施形態では、ドメインHは、VL配列を有し、ドメインLは、VH配列を有する。好ましい実施形態では、ドメインHは、VLアミノ酸配列を有し、ドメインIは、CLアミノ酸配列を有し、ドメインLは、VHアミノ酸配列を有し、およびドメインMは、CH₁アミノ酸配列を有する。別の好ましい実施形態では、ドメインHは、VLアミノ酸配列を有し、ドメインIは、CLアミノ酸配列を有し、ドメインLは、VHアミノ酸配列を有し、ドメインMは、CH₁アミノ酸配列を有し、ドメインKは、CH₃アミノ酸配列を有する。

【0163】

様々な実施形態では、IドメインおよびMドメインのアミノ酸配列は、それぞれ別個に直交型改変を内在性配列に含み、ここでIドメインはMドメインと相互作用し、IドメインとMドメインのどちらも、直交型改変を欠くドメインと顕著に相互作用しない。一連の実施形態では、Iドメインにおける直交型変異はCL配列にあり、Mドメインにおける直

交型変異はC H 1 配列にある。直交型変異は、上記セクション6 . 3 . 1 4 . 1 - 6 . 3 . 1 4 . 3 においてより詳細に記載されている。様々な実施形態では、C L 配列およびC H 1 配列における直交型変異は、電荷対変異である。特定の実施形態では、電荷対変異は、教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれるBonischら (Protein Engineering, Design & Selection、2017年、1~12頁) においてさらに詳細に記載されているように、E u インデックスによってナンバリングされるC L 配列におけるF 1 1 8 S、F 1 1 8 A またはF 1 1 8 V 変異と対応するC H 1 配列におけるA 1 4 1 L、またはC L 配列におけるT 1 2 9 R 変異と対応するC H 1 配列におけるK 1 4 7 D である。一連の好ましい実施形態では、電荷対変異は、E u インデックスによってナンバリングされるC L 配列におけるN 1 3 8 K 変異と対応するC H 1 配列におけるG 1 6 6 D、またはC L 配列におけるN 1 3 8 D 変異と対応するC H 1 配列におけるG 1 6 6 K である。

【0164】

様々な実施形態では、C L 配列およびC H 1 配列における直交型変異は、操作されたジスルフィド架橋を生成する。一連の好ましい実施形態では、非内在性システインアミノ酸を提供する変異は、E u インデックスによってナンバリングされるC L 配列におけるF 1 1 8 C 変異と対応するC H 1 配列におけるA 1 4 1 C、またはC L 配列におけるF 1 1 8 C 変異と対応するC H 1 配列におけるL 1 2 8 C、またはC L 配列におけるS 1 6 2 C 変異と対応するC H 1 配列におけるP 1 7 1 C 変異である。

【0165】

様々な実施形態では、HドメインおよびLドメインのアミノ酸配列は、それぞれ別個に直交型改変を内在性配列に含み、ここでHドメインはLドメインと相互作用し、HドメインとLドメインのどちらも、直交型改変を欠くドメインと顕著に相互作用しない。一連の実施形態では、Hドメインにおける直交型変異はV L 配列にあり、Lドメインにおける直交型変異はV H 配列にある。特定の実施形態では、直交型変異は、V H / V L 境界での電荷対変異である。好ましい実施形態では、V H / V L 境界での電荷対変異は、教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれるIgawaら (Protein Eng. Des. Sel.、2010年、23巻、667~677頁) においてより詳細に記載されているように、V H におけるQ 3 9 E と対応するV L におけるQ 3 8 K、またはV H におけるQ 3 9 K と対応するV L におけるQ 3 8 E である。

【0166】

ある特定の実施形態では、AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。ある特定の実施形態では、AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

6 . 3 . 1 7 . 三価結合分子

【0167】

別の一連の実施形態において、結合分子は、3つの抗原結合部位を有し、したがって「三価」と称される。

【0168】

図21を参照して、様々な三価の実施形態では、結合分子は、第5のポリペプチド鎖をさらに含み、(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインNおよびドメインOをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインNはV L アミノ酸配列を有し、ドメインOはC H 3 アミノ酸配列を有し；(b) 結合分子は、第5のポリペプチド鎖をさらに含み、第5のポリペプチド鎖が、ドメインPおよびドメインQを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、ドメインPはV H アミノ酸配列を有し、ドメインQはC H 3 アミノ酸配列を有し；(c) 第1および第5のポリペプチドは、NドメインとPドメインとの間の相互作用およびOドメインとQドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。図2

に概略化されているように、これらの三価の実施形態は、「 2×1 」三価構築物と称される。

【0169】

図26を参照して、さらなる一連の三価の実施形態では、結合分子は、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、(a)第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-E-J-Kの配向で配置され、ドメインRはVLアミノ酸配列を有し、ドメインSは定常ドメインアミノ酸配列を有し；(b)結合分子は、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、第6のポリペプチド鎖が、ドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され、ドメインTはVHアミノ酸配列を有し、ドメインUは定常ドメインアミノ酸配列を有し；(c)第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。図2に概略化されているように、これらの三価の実施形態は、「 1×2 」三価構築物と称される。

【0170】

様々な実施形態では、ドメインOは、ペプチドリンカーを介してドメインAに連結される。様々な実施形態では、ドメインSは、ペプチドリンカーを介してドメインHに連結される。好ましい実施形態では、ドメインOをドメインAに連結するかまたはドメインSをドメインHに連結するペプチドリンカーは、セクション6.3.19.6においてより詳細に記載されている6アミノ酸GSGSGSペプチド配列である。

6.3.17.1. 三価 2×1 二重特異性構築物 [$2(A-A) \times 1(B)$]

【0171】

図21を参照して、様々な実施形態では、ドメインNおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり、ドメインHのアミノ酸配列はドメインNおよびAのアミノ酸配列と異なり、ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインIのアミノ酸配列はドメインOおよびBのアミノ酸配列と異なり、ドメインPおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLのアミノ酸配列はドメインPおよびFのアミノ酸配列と異なり、ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMのアミノ酸配列はドメインQおよびGのアミノ酸配列と異なり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

6.3.17.2. 三価 2×1 二重特異性構築物 [$2(A-B) \times 1(A)$]

【0172】

図21を参照して、様々な実施形態では、ドメインNおよびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインAのアミノ酸配列はドメインNおよびHのアミノ酸配列と異なり、ドメインOおよびドメインIのアミノ酸配列は同一であり、ドメインBのアミノ酸配列はドメインOおよびIのアミノ酸配列と異なり、ドメインPおよびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインFのアミノ酸配列はドメインPおよびLのアミノ酸配列と異なり、ドメインQおよびドメインMのアミノ酸配列は同一であり、ドメインGのアミノ酸配列はドメインQおよびMのアミノ酸配列と異なり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第2の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

6.3.17.3. 三価 2×1 三重特異性構築物 [$2(A-B) \times 1(C)$]

【0173】

図21を参照して、様々な実施形態では、ドメインN、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は異なり、ドメインO、ドメインB、およびドメインIのアミノ酸配列は異なり、ドメインP、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は異なり、ドメインQ、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列は異なり；AドメインとFドメインと

の間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

【0174】

ある特定の実施形態では、セクション6.3.4.1および6.3.4.2においてより詳細に記載されているように、ドメインOは、カッパ軽鎖由来のCLである定常領域配列を有し、ドメインQは、IgG1アイソタイプ由来のCH1である定常領域配列を有する。好ましい実施形態では、上記セクション6.3.14においてより詳細が議論されているように、ドメインOおよびドメインQは、互いに特異的に会合するようにCH3配列を有する。

6.3.17.4. 三価2×1単一特異性構築物

【0175】

図21を参照して、様々な実施形態では、ドメインN、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインP、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

【0176】

図21を参照して、別の一連の実施形態において、ドメインN、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインO、ドメインB、およびドメインIのアミノ酸配列は同一であり、ドメインP、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインQ、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列は同一であり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインNおよびドメインPが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

6.3.17.5. 三価1×2二重特異性構築物 [1(A)×2(B-A)]

【0177】

図26を参照して、様々な実施形態では、ドメインRおよびドメインAのアミノ酸配列は同一であり、ドメインHのアミノ酸配列はドメインRおよびAのアミノ酸配列と異なり、ドメインSおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインIのアミノ酸配列はドメインSおよびBのアミノ酸配列と異なり、ドメインTおよびドメインFのアミノ酸配列は同一であり、ドメインLのアミノ酸配列はドメインTおよびFのアミノ酸配列と異なり、ドメインUおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり、ドメインMのアミノ酸配列はドメインUおよびGのアミノ酸配列と異なり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

6.3.17.6. 三価1×2二重特異性構築物 [1(A)×2(B-B)]

【0178】

図26を参照して、様々な実施形態では、ドメインRおよびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインAのアミノ酸配列はドメインRおよびHのアミノ酸配列と異なり、ドメインSおよびドメインIのアミノ酸配列は同一であり、ドメインBのアミノ酸配列はドメインSおよびIのアミノ酸配列と異なり、ドメインTおよびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインFのアミノ酸配列はドメインTおよびLのアミノ酸配列と異なり、ドメインUおよびドメインMのアミノ酸配列は同一であり、ドメインGのアミノ酸配列はドメインUおよびMのアミノ酸配列と異なり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインと

10

20

30

40

50

の間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第2の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

6. 3. 17. 7. 三価1×2三重特異性構築物 [1 (A) × 2 (B-C)]
【0179】

図26を参照して、様々な実施形態では、ドメインR、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は異なり、ドメインS、ドメインB、およびドメインIのアミノ酸配列は異なり、ドメインT、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は異なり、ドメインU、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列は異なり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

10

【0180】

ある特定の実施形態では、セクション6. 3. 4. 1および6. 3. 4. 2においてより詳細が議論されているように、ドメインSは、カッパ軽鎖由来のCLである定常領域配列を有し、ドメインUは、IgG1アイソタイプ由来のCH1である定常領域配列を有する。好ましい実施形態では、上記セクション6. 3. 14においてより詳細が議論されているように、ドメインSおよびドメインUは、互いに特異的に会合するようにCH3配列を有する。

6. 3. 17. 8. 三価1×2単一特異性構築物

【0181】

図26を参照して、様々な実施形態では、ドメインR、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列は同一であり、ドメインSおよびドメインBのアミノ酸配列は同一であり、ドメインT、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列は同一であり、ドメインUおよびドメインGのアミノ酸配列は同一であり；AドメインとFドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、ドメインRおよびドメインTが、第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

20

6. 3. 18. 四価2×2結合分子

【0182】

様々な実施形態では、結合分子は、4つの抗原結合部位を有し、したがって「四価」と称される。

30

【0183】

図34を参照して、さらなる一連の実施形態では、結合分子は、さらに第5および第6のポリペプチド鎖を含み、(a) 第1のポリペプチド鎖はさらにドメインNおよびドメインOを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置され；(b) 第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置され；(c) 結合分子はさらに第5および第6ポリペプチド鎖を含み、第5ポリペプチド鎖はドメインPおよびドメインQを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、第6ポリペプチド鎖はドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され；(d) 第1および第5のポリペプチドは、NドメインとPドメインとの間の相互作用およびOドメインとQドメインとの間の相互作用を介して会合し、第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

40

【0184】

様々な実施形態では、ドメインOは、ペプチドリinkerを介してドメインAに連結され、ドメインSは、ペプチドリinkerを介してドメインHに連結される。好ましい実施形態では、ドメインOをドメインAに連結し、ドメインSをドメインHに連結するペプチドリinkerは、セクション6. 3. 19. 6においてより詳細に記載されているように、6ア

50

ミノ酸 G S G S G S ペプチド配列である。

6. 3. 18. 1. 四価 2 × 2 二重特異性構築物

【0185】

図34を参照して、一連の四価 2 × 2 二重特異性結合分子では、ドメイン N およびドメイン A のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン H およびドメイン R のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン O およびドメイン B のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン E およびドメイン S のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン P およびドメイン F のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン L およびドメイン T のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン Q およびドメイン G のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン M およびドメイン U のアミノ酸配列は同一であり； A ドメインと F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、ドメイン N およびドメイン P が、第 1 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、H ドメインと L ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成し、R ドメインと T ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 4 の抗原結合部位を形成する。

10

【0186】

図34を参照して、別の一連の四価 2 × 2 二重特異性結合分子では、ドメイン H およびドメイン A のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン N およびドメイン R のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン E およびドメイン B のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン O およびドメイン S のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン L およびドメイン F のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン P およびドメイン T のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン M およびドメイン G のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン Q およびドメイン U のアミノ酸配列は同一であり； A ドメインと F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、ドメイン N およびドメイン P が、第 2 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、H ドメインと L ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成し、R ドメインと T ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 4 の抗原結合部位を形成する。

20

6. 3. 18. 2. 四価 2 × 2 単一特異性構築物

【0187】

図34を参照して、様々な実施形態では、ドメイン N、ドメイン A、ドメイン H、およびドメイン R のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン O およびドメイン B のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン E およびドメイン S のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン P、ドメイン F、ドメイン L、およびドメイン T のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン Q およびドメイン G のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン M およびドメイン U のアミノ酸配列は同一であり； A ドメインと F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、ドメイン N およびドメイン P が、第 1 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、H ドメインと L ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成し、および R ドメインと T ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 4 の抗原結合部位を形成する。

30

【0188】

図34を参照して、別の一連の四価 2 × 2 単一特異性実施形態では、ドメイン N、ドメイン A、ドメイン H、およびドメイン R のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン E およびドメイン B のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン O およびドメイン S のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン P、ドメイン F、ドメイン L、およびドメイン T のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン M およびドメイン G のアミノ酸配列は同一であり、ドメイン Q およびドメイン U のアミノ酸配列は同一であり； A ドメインと F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、ドメイン N およびドメイン P が、第 1 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、H ドメインと L ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成し、および R ドメインと T ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 4 の抗原結合部位を形成する。

40

6. 3. 19. ドメインジャンクション

50

6. 3. 19. 1. VLとCH3ドメインとを連結するジャンクション 【0189】

様々な実施形態では、VLドメインのC末端とCH3ドメインのN末端との間のジャンクションを形成するアミノ酸配列は、操作された配列である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸は、VLドメインのC末端で欠失または付加されている。ある特定の実施形態では、VLドメインのC末端とCH3ドメインのN末端とを連結しているジャンクションは、下記のセクション6. 12. 6の表2に記載されている配列の1つである。特定の実施形態では、A111が、VLドメインのC末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸が、CH3ドメインのN末端で、欠失または付加されている。特定の実施形態では、P343は、CH3ドメインのN末端で欠失されている。特定の実施形態では、P343およびR344は、CH3ドメインのN末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸が、VLドメインのC末端およびCH3ドメインのN末端の両方で欠失または付加されている。特定の実施形態では、A111が、VLドメインのC末端で欠失されており、P343が、CH3ドメインのN末端で欠失されている。好ましい実施形態では、A111およびV110が、VLドメインのC末端で欠失されている。別の好ましい実施形態では、A111およびV110が、VLドメインのC末端で欠失され、CH3ドメインのN末端が、P343V変異を有する。

10

6. 3. 19. 2. VHとCH3ドメインとを連結するジャンクション 【0190】

様々な実施形態では、VHドメインのC末端とCH3ドメインのN末端との間のジャンクションを形成するアミノ酸配列は、操作された配列である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸が、VHドメインのC末端で欠失または付加されている。ある特定の実施形態では、VHドメインのC末端とCH3ドメインのN末端を連結するジャンクションは、下記のセクション6. 12. 6の表3に記載されている配列の1つである。特定の実施形態では、K177およびG118が、VHドメインのC末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸が、CH3ドメインのN末端で欠失または付加されている。ある特定の実施形態では、P343は、CH3ドメインのN末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、P343およびR344は、CH3ドメインのN末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、P343、R344およびE345が、CH3ドメインのN末端で欠失されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸が、VHドメインのC末端およびCH3ドメインのN末端の両方で欠失または付加されている。好ましい実施形態では、T166、K177およびG118が、VHドメインのC末端で欠失されている。

20

30

6. 3. 19. 3. CH3のC末端をCH2のN末端に連結しているジャンクション（ヒンジ） 【0191】

本明細書に記載の結合分子では、CH2ドメインのN末端は、「ヒンジ」領域アミノ酸配列を有する。本明細書で使用される場合、ヒンジ領域は、抗体のN末端可変ドメインー定常ドメインセグメントと抗体のCH2ドメインとを連結している抗体重鎖の配列である。加えて、ヒンジ領域は、典型的に、N末端可変ドメインー定常ドメインセグメントとCH2ドメインとの間のフレキシビリティ、ならびに重鎖間のジスルフィド架橋を形成するアミノ酸配列モチーフ（例えば、第1および第3のポリペプチド鎖）の両方を提供する。本明細書で使用される場合、ヒンジ領域アミノ酸配列は、配列番号56である。

40

【0192】

様々な実施形態では、CH3アミノ酸配列は、CH3ドメインのC末端とCH2ドメインのN末端との間のジャンクションにおいてC末端で伸長されている。ある特定の実施形態では、CH3アミノ酸配列は、CH3ドメインのC末端とヒンジ領域との間のジャンクションにおいてC末端で伸長され、次いでCH2ドメインのN末端に連結されている。好ましい実施形態では、CH3アミノ酸配列は、PGKトリペプチド配列の挿入、続いてI

50

g G 1 ヒンジ領域の D K T H T モチーフの挿入によって伸長されている。

【0193】

特定の実施形態では、C H 3 ドメインの C 末端における伸長は、別の C H 3 ドメインの直交型 C 末端伸長とジスルフィド結合を形成することができるアミノ酸配列を組み込んでいる。好ましい実施形態では、C H 3 ドメインの C 末端における伸長は、K S C トリペプチド配列とそれに続く I g G 1 ヒンジ領域の D K T H T モチーフを組み込んでおり、I g G 1 ヒンジ領域の D K T H T モチーフは、カップ軽鎖の G E C モチーフを組み込んでいる別の C H 3 ドメインの直交型 C 末端伸長とジスルフィド結合を形成する。

6. 3. 19. 4. C L の C 末端と C H 2 の N 末端とを連結するジャンクション（ヒンジ）

【0194】

様々な実施形態では、C L アミノ酸配列は、その C 末端を介してヒンジ領域に連結され、次いで、C H 2 ドメインの N 末端に連結される。ヒンジ領域配列は、上記セクション 6. 3. 19. 3 においてより詳細に記載されている。好ましい実施形態では、ヒンジ領域アミノ酸配列は、配列番号 56 である。

6. 3. 19. 5. C H 2 の C 末端を定常領域ドメインに連結するジャンクション

【0195】

様々な実施形態では、C H 2 アミノ酸配列は、その C 末端を介して、定常領域ドメインの N 末端に連結されている。定常領域は、上記セクション 6. 3. 4 においてより詳細に記載されている。好ましい実施形態では、C H 2 配列は、その内在性配列を介して C H 3 配列に連結されている。他の実施形態では、C H 2 配列は、C H 1 または C L 配列に連結されている。C H 2 配列の C H 1 または C L 配列への連結を議論する例が、その全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 8, 242, 247 号においてより詳細に記載されている。

6. 3. 19. 6. 三価および四価分子においてドメイン O をドメイン A にまたはドメイン S をドメイン H に連結するジャンクション

【0196】

様々な実施形態では、抗体の重鎖（例えば、第 1 および第 3 のポリペプチド鎖）が、追加の A B S を提供する追加のドメインを含むようにその N 末端で伸長される。図 21、図 26 および図 34 を参照して、ある特定の実施形態では、ドメイン O および／またはドメイン S の定常領域ドメインアミノ酸配列の C 末端は、それぞれ、ドメイン A および／またはドメイン H の可変領域ドメインアミノ酸配列の N 末端に連結されている。一部の好ましい実施形態では、定常領域ドメインは、C H 3 アミノ酸配列であり、可変領域ドメインは、V L アミノ酸配列である。一部の好ましい実施形態では、定常領域ドメインは、C L アミノ酸配列であり、可変領域ドメインは、V L アミノ酸配列である。ある特定の実施形態では、定常領域ドメインは、ペプチドリンカーを介して可変領域ドメインに連結されている。好ましい実施形態では、ペプチドリンカーは、6 アミノ酸 G S G S G S ペプチド配列である。

【0197】

様々な実施形態では、抗体の軽鎖（例えば、第 2 および第 4 のポリペプチド鎖）が、抗体の追加の可変ドメインー定常ドメインセグメントを含むようにその N 末端で伸長される。ある特定の実施形態では、定常領域ドメインは、C H 1 アミノ酸配列であり、可変領域ドメインは、V H アミノ酸配列である。

6. 4. 特定の二価結合分子

【0198】

さらなる態様では、二価結合分子が提供される。

【0199】

図 3 を参照して、第 1 の一連の実施形態では、結合分子は、第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチド鎖を含み、ここで (a) 第 1 のポリペプチド鎖はドメイン A、ドメイン B、ドメイン D、およびドメイン E を含み、ここでドメインは、N 末端から C 末端へ、A - B - D - E の配向で配置され、ドメイン A は V L アミノ酸配列を有し、ドメイン B は

10

20

30

40

50

CH₃アミノ酸配列を有し、ドメインDはCH₂アミノ酸配列を有し、ドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(b)第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFはVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはCH₃アミノ酸配列を有し；(c)第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインJはCH₂アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(d)第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；(e)第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合し；(f)第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；(g)第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する。

【0200】

好ましい実施形態では、ドメインEは、CH₃アミノ酸配列を有し；ドメインHは、VLアミノ酸配列を有し；ドメインIは、CLアミノ酸配列を有し、ドメインKは、CH₃アミノ酸配列を有し；ドメインLは、VHアミノ酸配列を有し；ドメインMは、CH₁アミノ酸配列を有する。

【0201】

ある特定の実施形態では、AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、結合分子は、二重特異性二価結合分子である。ある特定の実施形態では、AドメインとFドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、HドメインとLドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、結合分子は、単一特異性二価結合分子である。

6. 4. 1. 二価の二重特異性B-Body「BC1」

【0202】

図3および図6を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を有し、ここで(a)第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAは第1のVLアミノ酸配列を有し、ドメインBは、T366K変異およびKSCトリペプチド配列とそれに続くIgG1ヒンジ領域のDKTHTモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH₃アミノ酸配列を有し、ドメインDはヒトIgG1 CH₂アミノ酸配列を有し、ドメインEはS354CおよびT366W変異を有するヒトIgG1 CH₃アミノ酸を有し；(b)第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFは第1のVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはL351D変異およびGECアミノ酸ジスルフィドモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH₃アミノ酸配列を有し；(c)第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは第2のVLアミノ酸配列を有し、ドメインIはヒトCLカップアミノ酸配列を有し、ドメインJはヒトIgG1 CH₂アミノ酸配列を有し、およびKはY349C、D356E、L358M、T366S、L368AおよびY407V変異を有するヒトIgG1 CH₃アミノ酸配列を有し；(d)第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを有し、ここでドメ

インは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは第2のVHアミノ酸配列を有し、ドメインMはヒトIgG1 CH1アミノ酸配列を有し；(e) 第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合し；(f) 第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；(g) 第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；(h) ドメインAおよびドメインFは、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し；(i) ドメインHおよびドメインLは、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

10

【0203】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号8の配列を有し、第2のポリペプチド鎖は、配列番号9の配列を有し、第3のポリペプチド鎖は、配列番号10の配列を有し、および第4のポリペプチド鎖は、配列番号11の配列を有する。

6. 4. 2. 二価の二重特異性B-Body「BC6」

【0204】

図3および図14を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を有し、ここで(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAは第1のVLアミノ酸配列を有し、ドメインBは、KSCトリペプチド配列とそれに続くIgG1ヒンジ領域のDKTHITモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、ドメインEはS354CおよびT366W変異を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸を有し；(b) 第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFは第1のVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはGECアミノ酸ジスルフィドモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(c) 第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは第2のVLアミノ酸配列を有し、ドメインIはヒトCLカップアミノ酸配列を有し、ドメインJはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、およびKはY349C、D356E、L358M、T366S、L368AおよびY407V変異を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(d) 第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは第2のVHアミノ酸配列を有し、ドメインMはヒトIgG1 CH1アミノ酸配列を有し；(e) 第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合し；(f) 第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；(g) 第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；(h) ドメインAおよびドメインFは、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し；(i) ドメインHおよびドメインLは、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

20

30

40

6. 4. 3. 二価の二重特異性B-Body「BC28」

【0205】

図3および図16を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を有し、ここで(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAは第1のVLアミノ酸配列を有し、ドメインBは、Y349C変異およびPGKトリペプチド配列とそれに続くIgG1ヒン

50

ジ領域のDKTHHTモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、ドメインEはS354CおよびT366W変異を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸を有し；(b) 第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFは第1のVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはS354C変異およびPGKトリペプチド配列を組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(c) 第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは第2のVLアミノ酸配列を有し、ドメインIはヒトCLカッパアミノ酸配列を有し、ドメインJはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、およびKはY349C、D356E、L358M、T366S、L368AおよびY407Vを有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(d) 第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは第2のVHアミノ酸配列を有し、ドメインMはヒトIgG1 CH1アミノ酸配列を有し；(e) 第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用を介して会合し；(f) 第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；(g) 第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；(h) ドメインAおよびドメインFは、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し；(i) ドメインHおよびドメインLは、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

【0206】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号24の配列を有し、第2のポリペプチド鎖は、配列番号25の配列を有し、第3のポリペプチド鎖は、配列番号10の配列を有し、および第4のポリペプチド鎖は、配列番号11の配列を有する。

6. 4. 4. 二価の二重特異性B-Body「BC44」

【0207】

図3および図19を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を有し、ここで(a) 第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAは第1のVLアミノ酸配列を有し、ドメインBは、Y349C変異、P343V変異、およびPGKトリペプチド配列とそれに続くIgG1ヒンジ領域のDKTHHTモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し、ドメインDはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、ドメインEはS354C変異およびT366W変異を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸を有し；(b) 第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFは第1のVHアミノ酸配列を有し、ドメインGはS354C変異およびPGKトリペプチド配列を組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(c) 第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは第2のVLアミノ酸配列を有し、ドメインIはヒトCLカッパアミノ酸配列を有し、ドメインJはヒトIgG1 CH2アミノ酸配列を有し、およびKはY349C、T366S、L368AおよびY407Vを有するヒトIgG1 CH3アミノ酸配列を有し；(d) 第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを有し、ここでドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは第2のVHアミノ酸配列を有し、ドメインMはヒトIgG1アミノ酸配列を有し；(e) 第1および第2のポリペプチドは、AドメインとFドメインとの間の相互作用およびBドメインとGドメインとの間の相互作用

10

20

30

40

50

を介して会合し；（f）第3および第4のポリペプチドは、HドメインとLドメインとの間の相互作用およびIドメインとMドメインとの間の相互作用を介して会合し；（g）第1および第3のポリペプチドは、DドメインとJドメインとの間の相互作用およびEドメインとKドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；（h）ドメインAおよびドメインFは、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し；（i）ドメインHおよびドメインLは、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成する。

【0208】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号32の配列を有し、第2のポリペプチド鎖は、配列番号25の配列を有し、第3のポリペプチド鎖は、配列番号10の配列を有し、および第4のポリペプチド鎖は、配列番号11の配列を有する。

10

6. 5. 特定の三価結合分子

6. 5. 1. 三価1×2二重特異性B-Body「BC28-1×2」

【0209】

セクション6. 4. 3および図26を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、ここで（a）第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインRは第1のVLアミノ酸配列を有し、ドメインSは、Y349C変異、およびPGKトリペプチド配列とそれに続くドメインSをドメインHに連結するGSGSGSリンカーペプチドを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1CH3アミノ酸配列を有し；（b）結合分子が、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、第6のポリペプチド鎖が、ドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され、ドメインTは第1のVHアミノ酸配列を有し、ドメインUはS354C変異およびPGKトリペプチド配列を組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1CH3アミノ酸配列を有し；（c）第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；（d）ドメインRおよびドメインTが第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

20

【0210】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号24の配列を有し、第2のポリペプチド鎖は、配列番号25の配列を有し、第3のポリペプチド鎖は、配列番号37の配列を有し、第4のポリペプチド鎖は、配列番号11の配列を有し、および第6のポリペプチド鎖は、配列番号25の配列を有する。

30

6. 5. 2. 三価1×2三重特異性B-Body「BC28-1×1×1a」

【0211】

セクション6. 4. 3ならびに図26および図30を参照して、一連の実施形態では、結合分子は、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、ここで（a）第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインRは第3のVLアミノ酸配列を有し、ドメインSは、T366K変異およびKSCトリペプチド配列とそれに続くドメインSをドメインHに連結するGSGSGSリンカーペプチドを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1CH3アミノ酸配列を有し；（b）結合分子が、第6のポリペプチド鎖をさらに含み、第6のポリペプチド鎖が、ドメインTおよびドメインUを含み、ここでドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され、ドメインTは第3のVHアミノ酸配列を有し、ドメインUはL351D変異およびGECアミノ酸ジスルフィドモチーフを組み込んだC末端伸長を有するヒトIgG1CH3アミノ酸配列を有し；（c）第3および第6のポリペプチドは、RドメインとTドメインとの間の相互作用およびSドメインとUドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成し；（d）ドメインRおよびドメインTが第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する。

40

【0212】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号24の配列を有し、第2の

50

ポリペプチド鎖は、配列番号 25 の配列を有し、第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 45 の配列を有し、第 4 のポリペプチド鎖は、配列番号 11 の配列を有し、および第 6 のポリペプチド鎖は、配列番号 53 の配列を有する。

6. 6. 抗原特異性

【0213】

本明細書に記載の結合分子の抗原結合部位は、多種多様な分子標的に特異的に結合するように選択しうる。例えば、抗原結合部位（単数または複数）は、E-Cad、CLDN7、FGFR2b、N-Cad、Cad-11、FGFR2c、ERBB2、ERBB3、FGFR1、FOLR1、IGF-Ira、GLP1R、PDGFRa、PDGFRb、EPHB6、ABCG2、CXCR4、CXCR7、インテグリン-avb3、SPARC、VCAM、ICAM、アネキシン、ROR1、ROR2、TNF α 、CD137、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、BAFF、ベータアミロイド、C5、CA-125、CD147、CD125、CD147、CD152、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD25、CD274、CD28、CD3、CD30、CD33、CD37、CD4、CD40、CD44、CD44v4、CD44v6、CD44v7、CD50、CD51、CD52、CEA、CSF1R、CTLA-2、DLL4、EGFR、EPCAM、HER3、GD2ガングリオシド、GDF-8、Her2/neu、CD2221、IL-17A、IL-12、IL-23、IL-13、IL-6、IL-23、インテグリン、CD11a、MUC1、Notch、TAG-72、TGF β 、TRAIL-R2、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2、VEGFc、ヘマトポエチン（4ヘリックスバンドル）（EPO（エリスロポエチン））、IL-2（T細胞増殖因子）、IL-3（マルチコロニーCSF）、IL-4（BCGF-1、BSF-1）、IL-5（BCGF-2）、IL-6 IL-4（IFN- β 2、BSF-2、BCDF）、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-13（P600）、G-CSF、IL-15（T細胞増殖因子）、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）、OSM（OM、オンコスタチンM）、およびLIF（白血病阻止因子）など；インターフェロン（IFN- γ 、IFN- α およびIFN- β など）；免疫グロブリンスーパーファミリー（B7.1（CD80）およびB7.2（B70、CD86）など）；TNFファミリー（TNF- α （カケクチン）、TNF- β （リンホトキシン、LT、LT- α ）、LT- β 、Fas、CD27、CD30、および4-1BBなど）；ならびに特定のファミリーに分類されないもの（TGF- β 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1RA、IL-10（サイトカイン合成阻害因子F）、IL-12（NK細胞刺激因子）、MIF、IL-16、IL-17（mCTLA-8）、および／またはIL-18（IGIF、インターフェロン- γ 誘導因子）など）に特異的に結合しうる；二重特異性抗体に関する実施形態では、抗体は、例えば、これらの標的のうちの2つに結合しうる。さらに、標的マスト細胞および好塩基球を標的とするためのIgE抗体のFc部分の使用など、Fc受容体発現細胞を標的とするために、抗体の重鎖のFc部分を使用してもよい。

【0214】

TNF受容体ファミリー、例えば、TNFR1（CD120aおよびTNFRSF1Aとしても公知）、TNFR2（CD120bおよびTNFRSF1Bとしても公知）、TNFRSF3（LT β Rとしても公知）、TNFRSF4（OX40およびCD134としても公知）、TNFRSF5（CD40としても公知）、TNFRSF6（FASおよびCD95としても公知）、TNFRSF6B（DCR3としても公知）、TNFRSF7（CD27としても公知）、TNFRSF8（CD30としても公知）、TNFRSF9（4-1BBとしても公知）、TNFRSF10A（TRAILR1、DR4、およびCD26としても公知）、TNFRSF10B（TRAILR2、DR5、およびCD262としても公知）、TNFRSF10C（TRAILR3、DCR1、CD263としても公知）、TNFRSF10D（TRAILR4、DCR2、およびCD264としても公知）、TNFRSF11A（RANKおよびCD265としても公知）、TNFRSF11B（OPGとしても公知）、TNFRSF12A（FN14、TWEAKR、およ

10

20

30

40

50

びCD266としても公知)、TNFRSF13B(TACIおよびCD267としても公知)、TNFRSF13C(BAFFR、BR3、およびCD268としても公知)、TNFRSF14(HVEMおよびCD270としても公知)、TNFRSF16(NGFR、p75NTR、およびCD271としても公知)、またはTNFRSF17(BCMAおよびCD269としても公知)、TNFRSF18(GITRおよびCD357としても公知)、TNFRSF19(TROY、TAJ、およびTRADEとしても公知)、TNFRSF21(CD358としても公知)、TNFRSF25(Apo-3、TRAMP、LARD、またはWS-1としても公知)、EDA2R(XEDARとしても公知)を含むがこれらに限定されないTNF受容体ファミリーに特異的に結合する抗原結合部位(単数または複数)を選択してもよい。

10

【0215】

がん免疫療法(immune-oncology)標的、例えば、PD1、PDL1、CTLA-4、PDL2、B7-H3、B7-H4、BTLA、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、BY55およびCGEN-15049などのチェックポイント阻害剤標的を含むがこれらに限定されない標的に特異的に結合する抗原結合部位(単数または複数)を選択してもよい。

【0216】

一連の実施形態では、腫瘍会合細胞を特異的に標的とする抗原結合部位(単数または複数)が選択されうる。様々な実施形態では、抗原結合部位(単数または複数)は、腫瘍会合免疫細胞を特異的に標的とする。ある特定の実施形態では、抗原結合部位(単数または複数)は、腫瘍会合制御性T細胞(Treg)を特異的に標的とする。特定の実施形態では、結合分子は、結合分子が腫瘍会合制御性T細胞を特異的に標的とするように、CD25、OX40、CTLA-4およびNRP1の1つまたは複数から選択される抗原に特異的な抗原結合部位を有する。特定の実施形態では、結合分子は、結合分子が腫瘍会合制御性T細胞を特異的に標的とするように、CD25およびOX40、CD25およびCTLA-4、CD25およびNRP1、OX40およびCTLA-4、OX40およびNRP1、またはCTLA-4およびNRP1に特異的に結合する抗原結合部位を有する。好ましい実施形態では、二重特異性二価結合分子は、結合分子が腫瘍会合制御性T細胞を特異的に標的とするように、CD25およびOX40、CD25およびCTLA-4、CD25およびNRP1、OX40およびCTLA-4、OX40およびNRP1、またはCTLA-4およびNRP1に特異的に結合する抗原結合部位を有する。特定の実施形態では、腫瘍会合制御性T細胞の特異的標的化は、制御性T細胞の枯渇(例えば、殺傷)に至る。好ましい実施形態では、制御性T細胞の枯渇は、下記セクション6.7.1においてより詳細に検討されているように、毒素ヘコンジュゲートされた抗体などの、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)改変によって媒介される。

20

30

【0217】

一連の実施形態では、結合分子は、CD3、ROR1およびROR2の1つまたは複数から選択される抗原結合部位を有する。特定の実施形態では、二重特異性二価は、CD3およびROR1に特異的に結合する抗原結合部位を有する。特定の実施形態では、二重特異性二価は、CD3およびROR2に特異的に結合する抗原結合部位を有する。特定の実施形態では、三重特異性三価は、CD3、ROR1およびROR2に特異的に結合する抗原結合部位を有する。

40

6.7.さらなる改変

【0218】

さらなる一連の実施形態では、結合分子は追加的改変を有する。

6.7.1.結合分子-薬物コンジュゲート

【0219】

様々な実施形態では、結合分子は、治療剤(つまり、薬物)にコンジュゲートされて、結合分子-薬物コンジュゲートを形成する。治療剤には、化学治療剤、画像化剤(例えば、放射性同位体)、免疫調節剤(例えば、サイトカイン、ケモカイン、またはチェックポ

50

イント阻害剤)、および毒素(例えば、細胞毒性剤)が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、治療剤は、下記セクション6.7.3においてより詳細に議論されているように、リンカーペプチドを介して結合分子に連結されている。薬物を本明細書に開示される結合分子にコンジュゲートするために適合しうる抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の調製方法は、例えば、それぞれ教示する全てについて参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,624,003号(ポット法)、米国特許第8,163,888号(ワンステップ法)、米国特許第5,208,020号(ツーステップ法)、米国特許第8,337,856号、米国特許第5,773,001号、米国特許第7,829,531号、米国特許第5,208,020号、米国特許第7,745,394号、WO2017/136623、WO2017/015502、WO2017/015496、WO2017/015495、WO2004/010957、WO2005/077090、WO2005/082023、WO2006/065533、WO2007/030642、WO2007/103288、WO2013/173337、WO2015/057699、WO2015/095755、WO2015/123679、WO2015/157286、WO2017/165851、WO2009/073445、WO2010/068759、WO2010/138719、WO2012/171020、WO2014/008375、WO2014/093394、WO2014/093640、WO2014/160360、WO2015/054659、WO2015/195925、WO2017/160754、Storz(MAbs、2015年11-12月;7巻(6号):989~1009頁)、Lambertら(Adv Ther、2017年34巻:1015頁)、Diamantisら(British Journal of Cancer、2016年、114巻、362~367頁)、Carricoら(Nat Chem Biol、2007年、3巻:321~2頁)、Weら(Proc Natl Acad Sci USA、2009年、106巻:3000~5頁)、Rabukaら(Curr Opin Chem Biol、2011年、14巻:790~6頁)、Hudakら(Angew Chem Int Ed Engl、2012年:4161~5頁)、Rabukaら(Nat Protoc、2012年、7巻:1052~67頁)、Agarwalら(Proc Natl Acad Sci USA、2013年、110巻:46~51頁)、Agarwalら(Bioconjugate Chem、2013年、24巻:846~851頁)、Barfieldら(Drug Dev. and D、2014年、14巻:34~41頁)、Drakeら(Bioconjugate Chem、2014年、25巻:1331~41頁)、Liangら(J Am Chem Soc、2014年、136巻:10850~3頁)、Drakeら(Curr Opin Chem Biol、2015年、28巻:174~80頁)およびYorkら(BMC Biotechnology、2016年、16巻(1号):23頁)に記載されている。

6.7.2. さらなる結合部分構造

【0220】

様々な実施形態では、結合分子は、1つまたは複数の追加の結合部分構造を含む改変を有する。ある特定の実施形態では、結合部分構造は、例えば、全長抗体、Fab断片、Fv、scFv、タンデムscFv、ダイアボディ、scダイアボディ、DART、tandAb、ミニボディ、カメリドVHH、および当業者に公知の他の抗体断片もしくはフォーマットを含むがこれらに限定されない抗体断片または抗体フォーマットである。例示的な抗体および抗体断片フォーマットは、教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれるBrinkmannら(MABS、2017年、9巻、2号、182~212頁)において詳細に記載されている。

【0221】

特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、第1または第3のポリペプチド鎖のC末端に連結されている。特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、第1および第3のポリペプチド鎖の両方のC末端に連結されている。特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、第1および第3のポリペプチド鎖の両方のC末端に連結されている。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造の個々の部分が、官能性結合部分構造を形成するように、第1および第3

10

20

30

40

50

のポリペプチド鎖のC末端に別個に連結されている。

【0222】

特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、ポリペプチド鎖のいずれか（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、または第6のポリペプチド鎖）のN末端に連結されている。ある特定の実施形態では、追加の結合部分構造の個々の部分が、官能性結合部分構造を形成するように、異なるポリペプチド鎖のN末端に別個に連結されている。

【0223】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、結合分子内のA B Sの異なる抗原またはエпитープに特異的である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、結合分子内のA B Sの同じ抗原またはエпитープに特異的である。改変が2つまたはそれより多い追加の結合部分構造である特定の実施形態では、追加の結合部分構造は、同じ抗原またはエпитープに特異的である。改変が2つまたはそれより多い追加の結合部分構造である特定の実施形態では、追加の結合部分構造は、異なる抗原またはエпитープに特異的である。

【0224】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、下記セクション6.7.3においてより詳細が議論されているように、例えば、反応性化学および親和性タグシステムを含むがこれらに限定されない *in vitro* 方法を使用して結合分子に連結される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、Fc媒介結合（例えば、プロテインA/G）を介して結合分子に連結される。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加の結合部分構造は、例えば、結合分子と追加の結合部分構造との融合産物のヌクレオチド配列を同じ発現ベクター（例えば、プラスミド）にコード化するなどの組換えDNA技術を使用して、結合分子に連結される。

6.7.3. 官能基／反応基

【0225】

様々な実施形態では、結合分子は、例えば追加の部分構造（例えば、上記セクション6.7.1および6.7.2においてより詳細が議論されている薬物コンジュゲートおよび追加の結合部分構造）の連結などの下流プロセスおよび下流精製プロセスにおいて使用することができる、官能基または化学的反応性基を含む改変を有する。

【0226】

ある特定の実施形態では、改変は、例えば、反応性チオール（例えば、マレイミド系反応性基）、反応性アミン（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド系反応性基）、「クリック化学」基（例えば、反応性アルキン基）、およびホルミルグリシン（F G l y）を保持するアルデヒド類を含むがこれらに限定されない化学的反応性基である。ある特定の実施形態では、改変は、親和性ペプチド配列（例えば、H A、H I S、F L A G、G S T、M B PおよびS t r e p システムなど）を含むがこれらに限定されない官能基である。ある特定の実施形態では、官能基または化学的反応性基は、開裂可能なペプチド配列を有する。特定の実施形態では、開裂可能なペプチドは、光開裂、化学開裂、プロテアーゼ開裂、還元条件、およびpH条件を含むがこれらに限定されない手段によって開裂される。特定の実施形態では、プロテアーゼ開裂は、細胞内プロテアーゼによって実施される。特定の実施形態では、プロテアーゼ開裂は、細胞外または膜会合プロテアーゼによって実施される。プロテアーゼ開裂を採用するADC治療は、教示する全てについて参照によりその全体が本明細書に組み込まれるChoiら（Theranostics、2012年；2巻（2号）：156～178頁）においてより詳細に記載されている。

6.8. 医薬組成物

【0227】

別の態様では、本明細書に記載される結合分子と、薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物が提供される。典型的な実施形態では、医薬組成物は滅菌される。

【0228】

様々な実施形態では、医薬組成物は、結合分子を $0.1 \text{ mg/ml} \sim 100 \text{ mg/ml}$ の濃度で含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、結合分子を、 0.5 mg/ml 、 1 mg/ml 、 1.5 mg/ml 、 2 mg/ml 、 2.5 mg/ml 、 5 mg/ml 、 7.5 mg/ml または 10 mg/ml の濃度で含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、結合分子を、 10 mg/ml を超える濃度で含む。ある特定の実施形態では、結合分子は、 20 mg/ml 、 25 mg/ml 、 30 mg/ml 、 35 mg/ml 、 40 mg/ml 、 45 mg/ml 、またはさらには 50 mg/ml もしくはそれより高い濃度で存在する。特定の実施形態では、結合分子は、 50 mg/ml を超える濃度で存在する。

【0229】

様々な実施形態では、医薬組成物は、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 8,961,964 号、米国特許第 8,945,865 号、米国特許第 8,420,081 号、米国特許第 6,685,940 号、米国特許第 6,171,586 号、米国特許第 8,821,865 号、米国特許第 9,216,219 号、米国特許出願第 10/813,483 号、WO 2014/066468、WO 2011/104381 および WO 2016/180941 においてより詳細に記載されている。

6.9. 製造法

【0230】

本明細書に記載の結合分子は、抗体製造のために現在使用されている標準的な無細胞翻訳、一過性トランスフェクションおよび安定なトランスフェクションアプローチを使用して、発現によって容易に製造することができる。特定の実施形態では、結合分子の製造のために、Exp 293 細胞 (ThermoFisher) を、ThermoFisher からのプロトコールおよび試薬、例えば Exp 1 Fectamine、または教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれる Fangら (Biological Procedures Online、2017 年、19 巻：11 頁) に詳細に記載されているようにポリエチレンイミンなどの当業者に公知の他の試薬を用いて、使用することができる。

【0231】

下記の実施例でさらに説明されているように、発現タンパク質は、Capture Select CH1 樹脂などの CH1 親和性樹脂、および ThermoFisher から提供されているプロトコールを使用して、容易に精製することができる。さらなる精製は、当技術分野で常套的に使用されているイオン交換クロマトグラフィを使用して行ってもよい。

6.10. 処置方法

【0232】

別の態様では、患者に、本明細書に記載される結合分子を、患者を処置するために有効な量で投与することを含む、処置方法が提供される。

【0233】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、がんを処置するために使用されうる。がんは、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯茎、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、首、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮のがんでありうる。一部の実施形態では、がんは、新生物、悪性疾患；癌腫；未分化癌腫；巨細胞紡錘形細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ腫；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；混合型肝細胞癌・胆管細胞癌；小柱腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリープの腺癌；腺腫性家族性大腸ポリポーシス；固形癌；カルチノイド悪性腫瘍；細気管支肺腺癌 (branchiolo-alveolar adenocarcinoma)；乳頭状腺癌；嫌色素性癌；好酸性癌 (acidophil carcinoma)；好酸性腺癌；好塩基球腫；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭状・濾胞腺癌；非被包性硬化性癌 (nonencapsulating sclerosing carcinoma)；副腎皮質癌；子宮内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液腺癌；印環細胞癌；ダクト癌浸潤；髓様癌；小葉癌；炎症性腫；乳腺パジェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生随伴腺癌；悪

性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜細胞腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性男性細胞腫；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫瘍；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性エキストラ乳腺傍神経節腫；褐色細胞腫；糸球体肉腫；悪性黒色腫；メラニン欠乏メラノーマ；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑の悪性黒色腫（malig melanoma）；類上皮細胞メラノーマ；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺泡横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミュー管混合腫瘍；腎芽；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周囲細胞腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉系軟骨肉腫；骨の巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル上皮線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星細胞腫；原形質性星細胞腫；線維性星細胞腫；星芽腫；神経膠芽腫；乏突起；乏突起膠芽腫；原始神経外胚葉；小脳肉腫；神経節；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅覚神経原性腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン；側肉芽腫；悪性小リンパ球性リンパ腫；悪性びまん性大細胞型リンパ腫；悪性濾胞性リンパ腫；菌状息肉症；他の特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髄腫；マスト細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；マスト細胞白血病；巨核芽球性白血病；顆粒球肉腫；および有毛細胞白血病でありうる。

【0234】

本開示の抗体は、例えば、がん、自己免疫、移植拒絶反応、外傷後の免疫応答、移植片対宿主病、虚血、脳卒中、および感染症の処置のために、例えば、HIVのgp120などのウイルス抗原を標的とすることにより、それ自体または医薬組成物の形態で、対象に投与することができる。

6. 11. さらなる態様および実施形態

【0235】

他の態様および実施形態を、番号を付した以下の項目で示す。

1. VH-CH3で構成される重鎖（HC）およびVL-CH3-CH2-CH3を含む軽鎖（LC）を含むドメイン交換抗体であって、HCのVH-CH3は、LCのVL-CH3と二量体化して、CH3LC/CH3HCドメイン対を含む第1のドメイン交換LC/HC二量体を形成する、ドメイン交換抗体。

2. 軽鎖はVL-CH3（ノブ）-CH2-CH3としてさらに定義され、重鎖はVH-CH3（ホール）としてさらに定義される、項目1に記載の抗体。

3. 軽鎖はVL-CH3（ホール）-CH2-CH3としてさらに定義され、重鎖はVH-CH3（ノブ）としてさらに定義される、項目1に記載の抗体。

4. 軽鎖が、第2のLC/HC二量体をさらに含み、ここで軽鎖はVL-CH3-CH2-CH3-VX1-CHXとしてさらに定義され、軽鎖はVX2-CHX2とさらに二量体化している、項目1～3のいずれかに記載の抗体。

5. VX1が第2のVH領域であり、VX2が第2のVL領域である、項目4に記載の抗体。

6. VX1が第2のVL領域であり、VX2が第2のVH領域である、項目4に記載の抗体。

7. CHXおよびCHX2が、CH3/CH3二量体を形成する、項目4～6のいずれかに記載の抗体。

8. CHXおよびCHX2が、CH1/CL二量体を形成する、項目4～6のいずれかに記載の抗体。

9. 軽鎖が、VL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH1としてさらに定義され、VX2-CHX2がVL1-CLである、項目4に記載の抗体。

10. 抗体が、2つの軽鎖を含み、第1の軽鎖がVL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH1としてさらに定義され、第2の軽鎖がVL-CH3-CH2-CH3-VL1-CLとしてさらに定義され、VH1-CH1がVL1-CLと二量体化している、項目1～3のいずれかに記載の抗体。

11. 抗体が、2つの軽鎖を含み、第1の軽鎖がVL-CH3-CH2-CH3-VH1-CH3としてさらに定義され、第2の軽鎖がVL-CH3-CH2-CH3-VL1-CH3としてさらに定義され、VH1-CH3がVL1-CH3と二量体化している、項目1～3のいずれかに記載の抗体。

12. VL1-CH3が、VL1-CH3（ノブ）としてさらに定義され、VH1-CH3が、VH1-CH3（ホール）としてさらに定義される、項目11に記載の抗体。

13. 重鎖が、第2のLC/HC二量体をさらに含み、重鎖がVX1-CHX-VH-CH3としてさらに定義され、重鎖がVX2-CHX2とさらに二量体化している、項目1～3のいずれかに記載の抗体。

14. VX1が第2のVH領域であり、VX2が第2のVL領域である、項目13に記載の抗体。

15. VX1が第2のVL領域であり、VX2が第2のVH領域である、項目13に記載の抗体。

16. CHXおよびCHX2が、CH3/CH3二量体を形成する、項目13～15のいずれかに記載の抗体。

17. CHXおよびCHX2が、CH1/CL二量体を形成する、項目13～15のいずれかに記載の抗体。

18. 重鎖が、VH1-CH1-VH-CH3としてさらに定義され、VX2-CHX2がVL1-CLである、項目4に記載の抗体。

19. 第1のLC/HC二量体が、第1のエピトープを認識する第1の結合部位を含み、第2のLC/HC二量体が、第1のエピトープと異なるかまたは異なる抗原に由来する第2のエピトープを認識する第2の結合部位を含み、ここで第1のLC/HC二量体または第2のLC/HC二量体のいずれかはドメイン交換されている、項目4～18のいずれかに記載の抗体。

20. 2つの第1のLC/HC二量体と単一の第2のLC/HC二量体とを含む二重特異性抗体である、項目19に記載の抗体。

21. 2つの第1のLC/HC二量体と2つの第2のLC/HC二量体とを含む二重特異性抗体である、項目19に記載の抗体。

22. HCまたはLCが、下記の表Aに示す変異を含む、項目1～21のいずれかに記載の抗体。

10

20

30

40

50

【表 A】

表 A - HC および LC 変異	
HC	LC
G166D	N138K
G166D	N138D
G166K	N138K
G166K	N138D
P127E	E123K
P127E	WT
P127K	E123K
P127K	WT
A141C	F118C
H168C	T164C
L128C	F118C
P171C	S162C

23. IgG 抗体である、項目 1～22 のいずれかに記載の抗体。

24. LC が、VL-CH3-CH2-CH3 からなり、任意選択で 1 つまたは複数のリンカー／ジャンクションまたはヒンジ領域をさらに含む、項目 1～23 のいずれかに記載の抗体。

25. 第 1 の LC／HC 二量体が、CH3（ノブ）／CH3（ホール）二量体、CH3 Hc／CH3 Hc 二量体によって特徴付けられるか、または CH3 LC／CH3 HC ドメインのコグネート対を生ずることができる操作された CH3 ドメインを含んでおり；軽鎖が、CH2-CH3 を含む Fc 鎖とさらに二量体化され、それによって Fc 領域を形成する、項目 1～24 のいずれかに記載の抗体。

26. 軽鎖が、CH2-CH3 を含む Fc 鎖とさらに二量体化され、それによって Fc 領域を形成し；Fc 領域が、CH3（ノブ）／CH3（ホール）二量体、CH3 Hc／CH3 Hc 二量体によって特徴付けられるか、または CH3 LC／CH3 HC ドメインのコグネート対を生ずることができる操作された CH3 ドメインを含んでいる、項目 1～25 のいずれかに記載の抗体。

27. 操作された CH3 ドメインが、ヒト IgG1 の CH3 のアミノ酸配列またはヒト IgG1 の CH3 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するその機能的バリエーションを含み、操作された CH3 ドメインは、以下：

a) 1 つもしくは複数のノブもしくはホール変異、好ましくは T366Y／Y407T、F405A／T394'W、T366Y：F405A／T394'W：Y407T、T366W／Y407'A および S354C：T366W／Y349'C：T366'S：L368'A：Y407V のいずれかのノブもしくはホール変異；

b) 他のコグネート CH3 ドメインのシステイン残基と共有結合的に連結し、それによりドメイン間ジスルフィド架橋を導入し、好ましくは両方の CH3 ドメインの C 末端を連結する、システイン残基；

c) ヒト IgA および IgG CH3 配列の交互のセグメントで構成される SEED CH3 ヘテロ二量体；および／または

d) 反発する電荷がヘテロ二量体形成を抑制する 1 つもしくは複数の変異、好ましくは、K409D／D399、K409D／D399'R、K409E／D399、K409E／D399'R、K409D：K392D／D399'K：E356'K もしくは K409D

10

20

30

40

50

： K 3 9 2 D : K 3 7 0 D / D 3 9 9 ' K : E 3 5 6 ' K : E 3 5 7 ' K のいずれかである 1 つもしくは複数の変異；および／または

e) ヘテロ二量体形成および／もしくは熱安定性のために選択された 1 つもしくは複数の変異、好ましくは、 T 3 5 0 V : L 3 5 1 Y : F 4 0 5 A : Y 4 0 7 V / T 3 5 0 V : T 3 6 6 L : K 3 9 2 L : T 3 9 4 W、 T 3 5 0 V : L 3 5 1 Y : F 4 0 5 A : Y 4 0 7 V / T 3 5 0 V : T 3 6 6 L : K 3 9 2 M : T 3 9 4 W、 L 3 5 1 Y : F 4 0 5 A : Y 4 0 7 V / T 3 6 6 L : K 3 9 2 M : T 3 9 4 W、 F 4 0 5 A : Y 4 0 7 V / T 3 6 6 L : K 3 9 2 M : T 3 9 4 W、もしくは F 4 0 5 A : Y 4 0 7 V / T 3 6 6 L : T 3 9 4 W のいずれかである 1 つしくは複数の変異の 1 つまたは複数を含み、ここでナンバリングは E u インデックスに従う、項目 2 5 ～ 2 6 のいずれかに記載の抗体。

10

2 8 . V H または V L ドメインのいずれかと C H 3 ドメインとの間のジャンクションがアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、

a) ヒト I g G 抗体の C H 2 ドメインと C H 3 ドメインとの間のジャンクションの少なくとも一部であるか、および／または

b) ヒト I g G 抗体の V L ドメインと C L ドメインとの間のジャンクションの少なくとも一部であるか；および／または

c) ヒト I g G 抗体の V H ドメインと C H 1 ドメインとの間のジャンクションの少なくとも一部であるか；および／または

d) 5 ～ 2 0 アミノ酸長、好ましくは 8 ～ 1 5 アミノ酸長を有する人工連結配列である、項目 1 ～ 2 5 のいずれかに記載の抗体。

20

2 9 . a) C H 2 および／もしくは C H 3 ドメインのいずれかに位置する F c ガンマ受容体結合部位および／もしくは C 1 q 結合部位を含むエフェクター機能競合抗体；

b) F c ガンマ受容体および／もしくは C 1 q への結合が欠損している F c 領域を含むエフェクター陰性抗体であるか、または

c) C H 2 および／もしくは C H 3 ドメインのいずれかに位置する p H 依存性 F c R n 結合部位を含む、項目 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の抗体。

3 0 . 抗体が、標的を認識する結合部位を組み込んだ一対の重鎖および軽鎖を含む一価の結合部位によって第 1 の標的を特異的に認識し、ここで軽鎖は、定常領域で構成される別の軽鎖に結合され、それによって F c 領域を形成する、項目 1 ～ 2 9 のいずれかに記載の抗体。

30

3 1 . 抗体が、第 2 の標的を特異的に認識する二重特異性抗体であり、ここで第 1 の標的は T N F - α、C D 3、C D 1 6、C D 4 7 または P D - 1 であり、第 2 の標的は E G F R、R O R 1 または H E R 2、H E R 3、L a g - 3 である、項目 3 0 に記載の抗体。

3 2 . 抗体の定常ドメインが、ヒト起源であるか、ヒト化されたものであるか、または各ヒト I g G 1 抗体ドメインに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその機能的に活性なバリエーションである、項目 1 ～ 3 1 のいずれかに記載の抗体。

3 3 . 項目 1 ～ 3 2 のいずれかに記載の抗体をコードする、単離された核酸。

【実施例】

40

【0 2 3 6】

6 . 1 2 . 実施例

以下の実施例は、例示として提供されるものであり、限定するものではない。

6 . 1 2 . 1 .

(実施例 1)

二価単一特異性構築物および二価の二重特異性構築物

【0 2 3 7】

T N F α を認識する二価単一特異性 B - B o d y を、標準的な分子生物学的手法を使用して、以下の構成 (V L (セルトリズマブ) - C H 3 (ノブ) - C H 2 - C H 3 / V H (セルトリズマブ) - C H 3 (ホール)) で構築した。この構築物において、

50

第1のポリペプチド鎖（配列番号1）

ドメインA=VL（セルトリズマブ）

ドメインB=CH3（IgG1）（ノブ：S354C+T366W）

ドメインD=CH2（IgG1）

ドメインE=CH3（IgG1）

第2のポリペプチド鎖（配列番号2）

ドメインF=VH（セルトリズマブ）

ドメインG=CH3（IgG1）（ホール：Y349C、T366S、L368A、Y407V）

第3のポリペプチド鎖：

第1のポリペプチド鎖と同一

第4のポリペプチド鎖：

第2のポリペプチド鎖と同一。

【0238】

ドメインおよびポリペプチド鎖の参照は、図3に従う。構築物の全体の構成を図4に示す。「（VL）」と略記して特定されているドメインAを有する第1のポリペプチド鎖の配列は、配列番号1で提供される。「（VH）」と略記して特定されているドメインFを有する第2のポリペプチド鎖の配列は、配列番号2で提供される。

【0239】

全長構築物を、E.coli無細胞タンパク質合成発現系で、約18時間、26℃で穏やかに攪拌しながら発現させた。発現後、無細胞抽出物を遠心分離して、不溶性物質をペレット化し、上清を、10×カインティックバッファー（Forte Bio）で2倍希釈して、バイオレイヤー干渉のための検体として使用した。

【0240】

ビオチン化TNFαを、ストレプトアビジンセンサーに固定化し、約1.5nmのウェーブシフト応答に付した。10×カインティックバッファーでベースラインを確立した後、センサーを、抗体構築物検体溶液中に浸漬した。構築物は、セルトリズマブの従来のIgGフォーマットに匹敵する約3nmの応答を与え、機能性の全長抗体へと組み立てられる二価単一特異性構築物の能力を実証した。結果を図5に示す。

【0241】

本発明者らはまた、以下のドメイン構成を有する二価の二重特異性抗体を構築した：

第1のポリペプチド鎖：VL-CH3-CH2-CH3（ノブ）

第2のポリペプチド鎖：VH-CH3

第3のポリペプチド鎖：VL-CL-CH2-CH3（ホール）

第4のポリペプチド鎖：VH-CH1。

【0242】

配列（可変領域配列を除く）を、配列番号3（第1のポリペプチド鎖）、配列番号4（第2のポリペプチド鎖）、配列番号5（第3のポリペプチド鎖）、配列番号6（第4のポリペプチド鎖）でそれぞれ示す。

6.12.2.

（実施例2）

二価の二重特異性B-Body「BC1」

【0243】

本発明者らは、PD1および第2の抗原「抗原A」に特異的な「BC1」と称する二価の二重特異性構築物を構築した。「BC1」構成の顕著な特徴を、図6に示す。

【0244】

さらに詳細に、図3に従ってドメインおよびポリペプチド鎖の参照を示し、天然の配列からの改変を括弧内に示すと、構成は、以下の通りであった：

第1のポリペプチド鎖（配列番号8）

ドメインA=VL（「抗原A」）

10

20

30

40

50

ドメインB=CH₃ (T366K; 445K、446S、447Cトリペプチド挿入物)

ドメインD=CH₂

ドメインE=CH₃ (T366W、S354C)

第2のポリペプチド鎖 (配列番号9) :

ドメインF=VH (「抗原A」)

ドメインG=CH₃ (L351D; 445G、446E、447Cトリペプチド挿入物)

第3のポリペプチド鎖 (配列番号10) :

ドメインH=VL (「Nivo」)

ドメインI=CL (カップ)

ドメインJ=CH₂

ドメインK=CH₃ (Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V)

第4のポリペプチド鎖 (配列番号11) :

ドメインL=VH (「Nivo」)

ドメインM=CH₁。

【0245】

Aドメイン (配列番号12) およびFドメイン (配列番号16) は、「抗原A」に特異的な抗原結合部位 (A:F) を形成する。Hドメインは、ニボルマブ由来のVH配列を有し、Lドメインは、ニボルマブ由来のVL配列を有し; HおよびLは会合して、ヒトPD1に特異的な抗原結合部位 (H:L) を形成する。

【0246】

Bドメイン (配列番号13) は、いくつかの変異、つまりT366K、445K、446Sおよび447C挿入物を有するヒトIgG1 CH₃の配列を有する。T366K変異は、ドメインGにおけるL351D残基の電荷対コグネートである。ドメインBにおける「447C」残基は、C末端KSCトリペプチド挿入物に由来するものである。

【0247】

ドメインD (配列番号14) は、ヒトIgG1 CH₂の配列を有する。

【0248】

ドメインE (配列番号15) は、変異T366WおよびS354Cを有するヒトIgG1 CH₃の配列を有する。366Wは、「ノブ」変異である。354Cは、ドメインKにおけるコグネート349C変異とジスルフィド結合を形成することができるシステインを導入する。

【0249】

ドメインG (配列番号17) は、以下の変異: L351D、および445G、446E、447Cトリペプチド挿入物を有する、ヒトIgG1 CH₃の配列を有する。L351D変異は、ドメインB T366K変異に対する電荷対コグネートを導入する。ドメインGの「447C」残基は、C末端GECトリペプチド挿入物に由来する。

【0250】

ドメインI (配列番号19) は、ヒトCカップ軽鎖 (Cκ) の配列を有する。

【0251】

ドメインJ [配列番号20] は、ヒトIgG1 CH₂ドメインの配列を有し、ドメインDの配列と同一である。

【0252】

ドメインK [配列番号21] は、以下の変化: Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 CH₃の配列を有する。349C変異は、ドメインEのコグネート354C変異とジスルフィド結合を形成することができるシステインを導入する。356EおよびL358Mは、免疫原性を減少させるイソアロタイプアミノ酸を導入する。366S、368Aおよび407Vは、「ホール」変

10

20

30

40

50

異である。

【0253】

ドメインM〔配列番号23〕は、ヒトIgG1 CH1領域の配列を有する。

【0254】

「BC1」は、哺乳動物発現を使用して100 μg/mlを超える濃度で、高レベルで容易に発現することができる。

【0255】

本発明者らは、二価の二重特異性「BC1」タンパク質が、ThermoFisherからのCH1特異的CaptureSelect（商標）親和性樹脂を使用して単一ステップで容易に精製することができることを見出した。

【0256】

図7Aに示すように、SEC解析は、単一ステップのCH1親和性精製ステップにより、ゲル濾過を介して、>98%がモノマーである単一の単分散ピークが得られることを実証する。図7Bは、CrossMab二価抗体構築物のSEC解析の比較文献データを示す。

【0257】

図8Aは、CaptureSelect（商標）CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の「BC1」の陽イオン交換クロマトグラフィ溶出プロファイルであって、単一のタイトなピークが示されている。図8Bは、標準的なプロテインA精製を使用して精製した後の「BC1」の陽イオン交換クロマトグラフィ溶出プロファイルであり、不完全な組み立て産物の同時精製と一致する追加的な溶出ピークを示す。

【0258】

図9は、非還元条件下のSDS-PAGEゲルを示す。レーン3でみられるように、CH1親和性樹脂を用いた「BC1」の単一ステップの精製により、ほぼ均一な単一バンドが得られる。レーン4は、続いて陽イオン交換仕上げ工程で最小の追加的な精製を行ったものを示す。レーン7は、比較による、標準的なプロテインA精製を使用した軽度の精製を示し、レーン8～10は、陽イオン交換クロマトグラフィを使用した、プロテインA精製物質のさらなる精製を示す。

【0259】

図10は、非還元および還元条件下の両方での単一ステップのCH1-親和性精製後の「BC1」のSDS-PAGEゲル（パネルA）を、参考文献で公開されている非還元および還元条件下のCrossMab二重特異性抗体のSDS-PAGEゲル（パネルB）と比較した図である。

【0260】

図11は、還元条件下の2つの別個の重鎖（図11A）、および2つの別個の軽鎖（図11B）を実証する「BC1」の質量分析の解析を示す。図12における質量分析データは、精製後の不完全対形成の非存在を確認する。

【0261】

加速安定性試験を実行して、「BC1」B-Body設計の長期安定性を評価した。精製されたB-BodyをPBSバッファー中8.6 mg/mlに濃縮して40℃でインキュベートした。構造的完全性をShodex KW-803カラムを備えた分析的サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）を使用して毎週測定した。構造的完全性を、凝集物の形成と関連させて、無傷のモノマーのパーセンテージ（%モノマー）を測定することによって決定した。データを図13に示す。IgG対照1は、良好な安定性特性を有する陽性対照である。IgG対照2は、インキュベーション条件下で凝集することが公知の陰性対照である。「BC1」B-Bodyは、分析的SECで決定されるように、構造的完全性を何ら失うことなく、8週間、インキュベートされた。

【0262】

また、二価構築物のTMは約72℃であり、本発明者らは、「BC1」が高い耐熱性を有すると決定した。

10

20

30

40

50

【0263】

表1は、重要な開発性特徴について、「BC1」とCrossMabとを比較する。

【表1】

表 1			
パラメータ	単位	Roche CrossMab*	“BC1”
プロテインA/SEC後の精製収率	mg/L	58.5	300
精製後の均一性	% SEC 面積	50-85	98
変性温度 (Tm)	摂氏度 C	69.2	72

*Schaefer *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Jul 5;108(27):11187-92) からのデータ

6. 12. 3.

(実施例3)

二価の二重特異性B-Body「BC6」

【0264】

本発明者らは、「BC6」と称する二価の二重特異性B-Bodyを構築した。「BC6」は、「BC1」と同様であるが、ドメインBの残基366およびドメインGの残基351で野生型残基を保持していることを除いてBC1と同一であった。したがって「BC6」は、「BC1」のドメインBとドメインGにおける正しい対形成を容易にするように設計された電荷対コグネートT366KおよびL351Dを欠く。「BC6」構成の顕著な特徴を図14に示す。

【0265】

「BC1」に存在する電荷対残基の非存在にもかかわらず、CH1親和性樹脂を使用した「BC6」の単一ステップの精製は、高度に均質な試料をもたらすことが分かった。図15Aは、Capture Select (商標) CH1親和性樹脂を使用したワンステップ精製後の「BC6」のSEC解析を示す。データは、単一のステップCH1親和性精製によって、「BC1」での観察と同様に、単一の単分散ピークが得られることを実証し、ポリペプチド鎖1とポリペプチド鎖2との間およびポリペプチド鎖3とポリペプチド鎖4との間のジスルフィド結合が無傷のままであることを実証する。またクロマトグラムは、非共有結合性の凝集物が存在しないことも示す。

【0266】

図15Bは、非還元条件下のSDS-PAGEゲルを示し、レーン1は単一ステップのCH1親和性精製後の「BC6」の第1のロットをローディングしたものであり、レーン2は、単一ステップのCH1親和性精製後の「BC6」の第2のロットをローディングしたものである。レーン3および4は、CH1親和性精製に続けてイオン交換クロマトグラフィを用いて達成しうるさらなる精製を実証する。

6. 12. 4.

(実施例4)

二価の二重特異性B-Body「BC28」、「BC29」、「BC30」、「BC31」

【0267】

本発明者らは、ドメインBおよびGのCH3境界内の操作されたジスルフィドを「BC1」および「BC6」に存在するC末端ジスルフィドに対する代替的S-S連結として有する二価1×1二重特異性B-Body「BC28」、「BC29」、「BC30」および「BC31」を構築した。文献は、CH3境界のジスルフィド結合が、Fc CH3ドメインの状況で直交性を行使するには不十分であることを示している。これらのB-Body構築物の全体の構成を図16に概略化し、「BC28」の顕著な特徴を下記に示す：

ポリペプチド鎖1：「BC28」鎖1（配列番号24）

ドメインA=VL（抗原「A」）

ドメインB=CH3（Y349C；445P、446G、447K挿入物）

ドメインD=CH2

ドメインE=CH3（S354C、K366W）

ポリペプチド鎖2：「BC28」鎖2（配列番号25）

ドメインF=VH（抗原「A」）

ドメインG=CH3（S354C；445P、446G、447K挿入物）

ポリペプチド鎖3：「BC1」鎖3（配列番号10）

ドメインH=VL（「Nivo」）

ドメインI=CL（カッパ）

ドメインJ=CH2

ドメインK=CH3（Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V）

ポリペプチド鎖4：「BC1」鎖4（配列番号11）

ドメインL=VH（「Nivo」）

ドメインM=CH1。

【0268】

「BC28」A：F抗原結合部位は、「抗原A」に特異的である。「BC28」H：L抗原結合部位は、PD1（ニボルマブ配列）に特異的である。「BC28」ドメインBは、野生型CH3と比較して以下の変化：Y349C；445P、446G、447K挿入物を有する。「BC28」ドメインEは、野生型CH3と比較して以下の変化：S354C、K366Wを有する。「BC28」ドメインGは、野生型と比較して以下の変化：S354C；445P、446G、447K挿入物を有する。

【0269】

したがって、「BC28」は、ドメインBの残基349Cに操作されたシステイン、およびドメインGの残基354Cに操作されたシステインを有する（「349C-354C」）。

【0270】

「BC29」は、ドメインBの残基351CおよびドメインGの351Cに、操作されたシステインを有する（「351C-351C」）。「BC30」は、ドメインBの残基354CおよびドメインGの349Cに操作されたシステインを有する（「354C-349C」）。BC31は、残基394Cに操作されたシステイン、およびドメインGの394Cに操作されたシステイン（「394C-394C」）を有する。BC32は、ドメインBの残基407CおよびドメインGの407Cに操作されたシステインを有する（「407C-407C」）。

【0271】

図17は、Capture Select（商標）CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の非還元条件下でのSDS-PAGE解析を示す。レーン1および3は、無傷の「BC28」（レーン1）および「BC30」（レーン3）の高レベルの発現および実質的な均一性を示す。レーン2は、BC29のオリゴマー化を示す。レーン4および5は、BC31およびBC32の乏しい発現をそれぞれ示し、BC32の連結が不十分であることを示す。別の構築物BC9（Genentechによって報告された、ドメインBの残基392およびドメインGの399に導入されたシステインを有し（「392C-399C」）、ジスルフィド対を形成する構築物）は、SDS-PAGEでオリゴマー化を示した（データは示さず）。

【0272】

図18は、Capture Select（商標）CH1親和性樹脂を使用したワンステップ精製後の「BC28」および「BC30」のSEC解析を示す。さらに本発明者らは、「BC28」が、プロテインA樹脂を使用した単一ステップの精製を使用して容易に精

10

20

30

40

50

製することができることを実証した（結果は示さず）。

6. 12. 5.

（実施例5）

二価の二重特異性 B-B o d y 「B C 4 4」

【0273】

図19は、本発明者らの現行の好ましい二価の二重特異性1×1構築物である二価の二重特異性1×1 B-B o d y 「B C 4 4」の一般的構成を示す。

第1のポリペプチド鎖（「B C 4 4」鎖1）（配列番号32）

ドメインA=V L（抗原「A」）

ドメインB=CH3（P343V；Y349C；445P、446G、447K挿入物）

ドメインE=CH2

ドメインE=CH3（S354C、K366W）

第2のポリペプチド鎖（＝「B C 2 8」ポリペプチド鎖2）（配列番号25）

ドメインF=V H（抗原「A」）

ドメインG=CH3（S354C；445P、446G、447K挿入物）

第3のポリペプチド鎖（＝「B C 1」ポリペプチド鎖3）（配列番号10）

ドメインH=V L（「N i v o」）

ドメインI=C L（カップ）

ドメインJ=CH2

ドメインK=CH3（Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V）

第4のポリペプチド鎖（＝「B C 1」ポリペプチド鎖4）（配列番号11）

ドメインL=V H（「N i v o」）

ドメインM=CH1

6. 12. 6.

（実施例6）

可変-CH3ジャンクション操作

【0274】

本発明者らは、ドメインAとBとの間のV L-CH3ジャンクション、ならびにドメインFとGとの間のV H-CH3ジャンクションを変異させた一連のバリエーションを作製し、二価1×1 B-B o d y 構築物の発現レベル、組み立て、および安定性を評価した。多くの解決策がありうるが、本発明者らは、T細胞エピトープの導入を減少させるために、V L、V HおよびCH3ドメイン内で天然に見出される残基のみを使用することを選択した。ドメイン構成の構造的評価は、好ましい配列組合せをさらに限定する。下記表2および表3は、「B C 1」および他の二価構築物に基づくいくつかのジャンクションバリエーションについてのジャンクションを示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表2-第1のポリペプチド鎖についての可変ドメイン/定常ドメインジャンクションのバリエーション											
	VL						CH3				配列
バリエーション	106	107	108	109	110	111	343	344	345	346	
BC1	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC13	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC14	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC15	I	K	R	T	V			R	E	P	IKRTVREP (配列番号 58)
BC16	I	K	R	T				R	E	P	IKRTREP (配列番号 59)
BC17	I	K	R	T	V		P	R	E	P	IKRTVPREP (配列番号 60)
BC24	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC25	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC26	I	K	R	T	V	A			E	P	IKRTVAEP (配列番号 61)
BC27	I	K	R	T	V	A	P	R	E	P	IKRTVAPREP (配列番号 62)
BC44	I	K	R	T				R	E	P	IKRTREP (配列番号 59)
BC45	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC5	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC6	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC28	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)
BC30	I	K	R	T			P	R	E	P	IKRTPREP (配列番号 57)

10

20

30

40

50

【表 3】

表3-第2のポリペプチド鎖についての可変ドメイン/定常ドメインジャンクションのパリアント												
	VH							CH3				配列
パリアント	112	113	114	115	116	117	118	343	344	345	346	
BC1	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC13	S	S	A	S	T				R	E	P	SSASTREP (配列番号 64)
BC14	S	S	A	S	T			P	R	E	P	SSASTPREP (配列番号 65)
BC15	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC16	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC17	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC24	S	S	A	S	T	K	G			E	P	SSASTKGEP (配列番号 66)
BC25	S	S	A	S	T	K	G		R	E	P	SSASTKGREP (配列番号 67)
BC26	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC27	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC44	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC45	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC5	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC6	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC28	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)
BC30	S	S	A	S				P	R	E	P	SSASPREP (配列番号 63)

【0275】

図20は、40℃での加速安定性試験プロトコールにおける示された週数での「BC15」および「BC16」試料のサイズ排除クロマトグラフィを示す。「BC15」は安定なままであった；「BC16」は、経時的に不安定となることが分かった。

6.12.7.

(実施例7)

三価2×1二重特異性B-Body構築物(「BC1-2×1」)

【0276】

本発明者らは、「BC1」に基づいて三価2×1二重特異性B-Body「BC1-2×1」を構築した。構成の顕著な特徴を図22に示す。

【0277】

より詳細には、図21に要約されているドメインおよびポリペプチド鎖の参照を使用し

て、

第1のポリペプチド鎖

ドメインN=VL (「抗原A」)
ドメインO=CH3 (T366K、447C)
ドメインA=VL (「抗原A」)
ドメインB=CH3 (T366K、477C)
ドメインD=CH2
ドメインE=CH3 (ノブ、354C)

第5のポリペプチド鎖 (=「BC1」鎖2)

ドメインP=VH (「抗原A」)
ドメインQ=CH3 (L351D、447C)

第2のポリペプチド鎖 (=「BC1」鎖2)

ドメインF=VH (「抗原A」)
ドメインG=CH3 (L351D、447C)

第3のポリペプチド鎖 (=「BC1」鎖3)

ドメインH=VL (「Nivo」)
ドメインI=CL (カッパ)
ドメインJ=CH2

ドメインK=CH3 (ホール、349C)

第4のポリペプチド鎖 (=「BC1」鎖4)

ドメインL=VH (「Nivo」)
ドメインM=CH1

【0278】

図23は、ThermoFisher Expi293一過性トランスフェクション系を使用して発現されたタンパク質の非還元SDS-PAGEを示す。

【0279】

レーン1は、CaptureSelect (商標) CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の三価2×1「BC1-2×1」タンパク質の溶離液を示す。レーン2は、CaptureSelect (商標) CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の、より分子量が低く、移動が速い、二価「BC1」タンパク質を示す。レーン3～5は、プロテインAを使用した「BC1-2×1」の精製を示す。レーン6および7は、CH1親和性樹脂を使用した「BC1-2×1」の精製を示す。

【0280】

図24は、Octet (Pall ForteBio) 解析を使用して、二価「BC1」構築物のアビディティを、三価2×1「BC1-2×1」構築物のアビディティと比較したものである。ビオチン化抗原「A」を表面に固定化し、その表面上を、結合解析のために、抗体構築物に通過させる。

6.12.8.

(実施例8)

三価2×1三重特異性B-Body構築物 (「TB111」)

【0281】

本発明者らは、図25に概略化された構成を有する三価2×1三重特異性分子「TB111」を設計した。図21に示すドメイン命名規則を参照して、TB111は、以下の構成を有する (「Ada」は、アダリムマブ由来のV領域を示す) :

ポリペプチド鎖1

ドメインN:VH (「Ada」)
ドメインO:CH3 (T366K、394C)
ドメインA:VL (「抗原A」)
ドメインB:CH3 (T366K、349C)
ドメインD:CH2

ドメインE：CH3（ノブ、354C）

ポリペプチド鎖5

ドメインP：VL（「Ada」）

ドメインQ：CH3（L351D、394C）

ポリペプチド鎖2

ドメインF：VH（「抗原A」）

ドメインG：CH3（L351D、351C）

ポリペプチド鎖3

ドメインH：VL（「Nivo」）

ドメインI：CL（カップ）

ドメインJ：CH2

ドメインK：CH3（ホール、349C）

ポリペプチド鎖4（＝「BC1」鎖4）

ドメインL：VH（「Nivo」）

ドメインM：CH1

この構築物は、発現しなかった。

6.12.9.

（実施例9）

三価1×2二重特異性構築物（「BC28-1×2」）

【0282】

本発明者らは、以下のドメイン構造を有する三価1×2二重特異性B-Bodyを構築した：

第1のポリペプチド鎖（＝「BC28」鎖1）（配列番号24）

ドメインA＝VL（抗原「A」）

ドメインB＝CH3（Y349C；445P、446G、447K挿入物）

ドメインD＝CH2

ドメインE＝CH3（S354C、K366W）

第2のポリペプチド鎖（＝「BC28」鎖2）（配列番号25）

ドメインF＝VH（抗原「A」）

ドメインG＝CH3（S354C；445P、446G、447K挿入物）

第3のポリペプチド鎖（配列番号37）

ドメインR＝VL（抗原「A」）

ドメインS＝CH3（Y349C；445P、446G、447K挿入物）

リンカー＝GSGSGS

ドメインH＝VL（「Nivo」）

ドメインI＝CL

ドメインJ＝CH2

ドメインK＝CH3（Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V）

第4のポリペプチド鎖（＝「BC1」鎖4）（配列番号11）：

ドメインL＝VH（「Nivo」）

ドメインM＝CH1。

第6のポリペプチド鎖（＝「BC28」鎖2）（配列番号25）

ドメインT＝VH（抗原「A」）

ドメインU＝CH3（S354C；445P、446G、447K挿入物）

【0283】

H：L結合抗原結合部位と同様に、A：F抗原結合部位は「抗原A」に特異的である。R：T抗原結合部位は、PDに対して特異的である。この構築物の特異性は、したがって抗原「A」×（PD1-抗原「A」）である。

6.12.10.

10

20

30

40

50

(実施例 10)

三価 1×2 二重特異性構築物 (「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」)

【0284】

本発明者らは、図 27 に概略化した一般構造を有する、三価 1×2 二重特異性分子 (「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」) を構築した。ドメインの命名法を図 26 に示す。

【0285】

図 28 は、SDS-PAGE ゲルであり、ここで非還元および還元条件下の「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」構築物を示すレーンを枠で囲っている。

【0286】

図 29 は、2 つの抗体「CTLA4-4×OX40-8」および「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」の抗原結合を比較している。「CTLA4-4×OX40-8」は、CTLA4 に一価的に結合する一方、「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」は、CTLA4 に二価的に結合する。

6. 12. 11.

(実施例 11)

三価 1×2 三重特異性構築物「BC28-1×1×1a」

【0287】

本発明者らは、図 30 に概略化した一般構造を有する三価 1×2 三重特異性分子を構築した。図 26 に示すドメインの命名法を参照して、

第 1 のポリペプチド鎖 (=「BC28」鎖 1) [配列番号 24]

ドメイン A = VL (抗原「A」)

ドメイン B = CH3 (Y349C; 445P、446G、447K 挿入物)

ドメイン D = CH2

ドメイン E = CH3 (S354C、K366W)

第 2 のポリペプチド鎖 (=「BC28」鎖 2) (配列番号 25)

ドメイン F = VH (抗原「A」)

ドメイン G = CH3 (S354C; 445P、446G、447K 挿入物)

第 3 のポリペプチド鎖 (配列番号 45)

ドメイン R = VL (CTLA4-4)

ドメイン S = CH3 (T366K; 445K、446S、447C 挿入物)

リンカー = GSGSGS

ドメイン H = VL (「Nivo」)

ドメイン I = CL

ドメイン J = CH2

ドメイン K = CH3 (Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、Y407V)

第 4 のポリペプチド鎖 (=「BC1」鎖 4) (配列番号 11)

ドメイン L = VH (「Nivo」)

ドメイン M = CH1。

第 6 のポリペプチド鎖 (=hCTLA4-4 鎖 2) (配列番号 53)

ドメイン T = VH (CTLA4)

ドメイン U = CH3 (L351D、445G、446E、447C 挿入物)

【0288】

この三重特異性構築物の抗原結合部位は、以下の通りであった：

抗原結合部位 A：F は、「抗原 A」に特異的であった；

抗原結合部位 H：L は、PD1 (ニボルマブ配列) に特異的であった；

抗原結合部位 R：T は、CTLA4 に特異的であった。

【0289】

図 31 は、単一の明確に確定されるピークを示す、一過性発現および Capture S

10

20

30

40

50

elect (商標) CH1 親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の「BC28-1×1×1a」のサイズ排除クロマトグラフィを示す。

6.12.12.

(実施例12)

二価および三価構築物のSDS-PAGE解析

【0290】

図32は、それぞれ一過性発現およびCapture Select (商標) CH1 親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の様々な構築物の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEゲルを示す。

【0291】

レーン1 (非還元条件) およびレーン2 (還元条件、+DTT) は、二価1×1二重特異性構築物「BC1」である。レーン3 (非還元) およびレーン4 (還元) は、三価の二重特異性2×1構築物「BC1-2×1」である (実施例7参照)。レーン5 (非還元) およびレーン6 (還元) は、三価1×2二重特異性構築物「CTLA4-4×Nivo×CTLA4-4」である (実施例10参照)。レーン7 (非還元) およびレーン8 (還元) は、実施例11に記載の三価1×2三重特異性「BC28-1×1×1a」構築物である。

【0292】

SDS-PAGEゲルは、各構築物の完全なアセンブリを実証しており、各構築物について、非還元ゲルの主要なバンドが、予測される分子量で示されている。

6.12.13.

(実施例13)

結合解析

【0293】

図33は、3つの抗原：PD1、抗原「A」およびCTLA-4へのOctet 結合解析を示す。それぞれの場合において、抗原が固定化され、B-Bodyが検体である。参照のために、1×1二重特異性の「BC1」と「CTLA4-4×OX40-8」も比較すると、1×1 B-Bodyが、抗原結合部位が選択される抗原のみに特異的に結合することが実証された。

【0294】

図33Aは、「BC1」がPD1および抗原「A」に結合するが、CTLA4に結合しないことを示す。図33Bは、二価の二重特異性1×1構築物「CTLA4-4×OX40-8」がCTLA4に結合するが、抗原「A」またはPD1に結合しないことを示す。図33Cは、三価三重特異性1×2構築物「BC28-1×1×1a」がPD1、抗原「A」およびCTLA4に結合することを示す。

6.12.14.

(実施例14)

四価構築物

【0295】

図35は、2×2四価二重特異性構築物「BC22-2×2」の全体の構成を示す。2×2四価二重特異性は、それぞれの可変ドメイン-定常ドメインセグメントを複製することによって「BC1」足場で構築した。ドメインの命名法を図34に概略化する。

【0296】

図36は、SDS-PAGEゲルである。レーン7~9は、Capture Select (商標) CH1 親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後 (「CH1 溶離液」)、およびさらにイオン交換クロマトグラフィ精製した後 (レーン8、「IEX後のpk1」; レーン9、「IEX後のpk2」) の「BC22-2×2」四価構築物をそれぞれ示す。レーン1~3は、CH1 親和性精製した後 (レーン1)、レーン2および3はさらにイオン交換クロマトグラフィした後の三価2×1構築物「BC21-2×1」である。レーン4~6は、1×2三価構築物「BC12-1×2」である。

10

20

30

40

50

【0297】

図37は、 2×2 四価構築物全体の構成を示す。

【0298】

図39および40は、代替的な構成を有する四価構築物の概略図である。ドメインの命名法を図38に示す。

6.12.15.

(実施例15)

B-Bodyによる二重特異性抗原係合

【0299】

四価二重特異性 2×2 B-Body「B-Body-IgG 2×2 」を構築した。より詳細には、図38にまとめたドメインおよびポリペプチド鎖の参照を使用して、

10

第1のポリペプチド鎖

ドメインA=VL (セルトリズマブ)

ドメインB=CH3 (IgG1、ノブ)

ドメインD=CH2 (IgG1)

ドメインE=CH3 (IgG1)

ドメインW=VH (抗原「A」)

ドメインX=CH1 (IgG1)

第3のポリペプチド鎖 (第1のポリペプチド鎖と同一)

ドメインH=VL (セルトリズマブ)

20

ドメインI=CH3 (IgG1、ノブ)

ドメインJ=CH2 (IgG1)

ドメインK=CH3 (IgG1)

ドメインWW=VH (抗原「A」)

ドメインXX=CH1 (IgG1)

第2のポリペプチド鎖

ドメインF=VH (セルトリズマブ)

ドメインG=CH3 (IgG1、ホール)

第4のポリペプチド鎖 (第3のポリペプチド鎖と同一)

ドメインF=VH (セルトリズマブ)

30

ドメインG=CH3 (IgG1、ホール)

第7のポリペプチド鎖

ドメインY=VH (「抗原A」)

ドメインZ=CLカッパ

第8のポリペプチド鎖 (第7のポリペプチド鎖と同一)

ドメインYY=VH (「抗原A」)

ドメインZZ=CLカッパ。

【0300】

これを、実施例1に記載されるようにクローニングし、発現させた。ここで、BLI実験は、ビオチン化抗原「A」のストレプトアビジンセンサー上への固定化、その後の $10 \times$ カイネティックバッファーを用いたベースラインの確立で構成した。次いで、センサーを、無細胞発現された「B-Body-IgG 2×2 」中に浸漬し、次いで、新たなベースラインを確立した。最終的に、センサーを、第2の結合事象が観察された 100 nM TNF α に浸漬し、単一の「B-Body-IgG 2×2 」構築物による両方の抗原の二重特異性結合を確認した。結果を図41に示す。

40

6.12.16.

(実施例16)

「BB-IgG 2×2 」の抗原特異的細胞結合

【0301】

Exp i-293細胞を、Exp i-293トランスフェクションキット (Life

50

Technologies) を使用して、mock トランスフェクトするかまたは抗原「B」で一過性トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、Exp i-293細胞を回収し、4%パラホルムアルデヒド中で15分間、室温で固定化した。細胞を、PBS中で2回洗浄した。200,000抗原BまたはMockトランスフェクトされたExp i-293細胞を、V底96ウェルプレート内の100 μ LのPBS中に入れた。細胞を、3 μ g/mLの濃度の「B-Body-IgG 2 $\times$ 2」と1.5時間、室温でインキュベートした。細胞を、300 $\times$ Gで7分間遠心分離し、PBSで洗浄し、8 μ g/mLの濃度の100 μ LのFITC標識ヤギ抗ヒト第2抗体と室温で1時間インキュベートした。細胞を300 $\times$ Gで7分間遠心分離し、PBSで洗浄し、細胞結合をGuava easy Cytometerを使用してフローサイトメトリーによって確認した。結果を図42に示す。

10

6.12.17.

(実施例17)

二価および三価構築物のSDS-PAGE解析

【0302】

図45は、それぞれ一過性発現およびCapture Select (商標) CH1親和性樹脂を使用してワンステップ精製した後の様々な構築物の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEゲルを示す。

【0303】

レーン1 (非還元条件) およびレーン2 (還元条件、+DTT) は、二価1 $\times$ 1二重特異性構築物「BC1」である。レーン3 (非還元) およびレーン4 (還元) は、二価1 $\times$ 1二重特異性構築物「BC28」である (実施例4参照)。レーン5 (非還元) およびレーン6 (還元) は、二価1 $\times$ 1二重特異性構築物「BC44」である (実施例5参照)。レーン7 (非還元) およびレーン8 (還元) は、三価1 $\times$ 2二重特異性「BC28-1 $\times$ 2」構築物である (実施例9参照)。レーン9 (非還元) およびレーン10 (還元) は、実施例11に記載の三価1 $\times$ 2三重特異性「BC28-1 $\times$ 1 $\times$ 1a」構築物である。

20

【0304】

SDS-PAGEゲルは、各構築物の完全なアセンブリを実証しており、各構築物について、非還元ゲルの主要なバンドが、予測される分子量で示されている。

6.12.18.

30

(実施例18)

可変-CH3ジャンクション操作の安定性解析

【0305】

様々なジャンクションバリエーションの組合せ間の対形成安定性を評価した。示差走査蛍光定量を行って、鎖1のVL-CH3ポリペプチド (ドメインAおよびB) と鎖2のVH-CH3ポリペプチド (ドメインFおよびG) との間の様々なジャンクションバリエーション対形成の融点を決定した。ジャンクションバリエーション「BC6jv」、「BC28jv」、「BC30jv」、「BC44jv」および「BC45jv」 (それぞれ、上記表2および表3でみられる「BC6」、「BC28」、「BC30」、「BC44」および「BC45」の対応するジャンクション配列を有する) は、76~77度の範囲のT_mを有し、対形成安定性の増加を実証する (表4参照)。図46は、「BC24jv」、「BC26jv」および「BC28jv」の熱転移の差異を示し、「BC28jv」が3つの中で安定性が最も大きいことを実証している。図のx軸は温度であり、y軸は温度変化で割った蛍光変化 (-dFluor/dTemp) である。実験は、教示する全てについて参照により本明細書に組み込まれるNiesenら (Nature Protocols、(2007年) 2巻、2212~2221頁) に記載されているように行った。

40

【表 4】

表4-ジャンクションバリエーション対の融点		
ジャンクションバリエーション対	融点 #1 (°C)	融点 #2 (°C)
BC1jv	69.7	55.6
BC5jv	71.6	
BC6jv	77	
BC15jv	68.2	54
BC16jv	65.9	
BC17jv	68	
BC24jv	69.7	
BC26jv	70.3	
BC28jv	76.7	
BC30jv	76.8	
BC44jv	76.2	
BC45jv	76	

10

6. 1 3. 配列

【化 1】

>実施例1、二価単一特異性構築物 鎖1[配列番号1]

20

(VL)~VEIKRTPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>実施例1、二価単一特異性構築物 鎖2[配列番号2]

(VH)~VTVSSASPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

50

【化 2】

> 実施例1、二価の二重特異性構築物 鎖1[配列番号3]

(VL)~VEIKRTPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

VL- CH3- ヒンジ - CH2- CH3 (ノブ)

10

> 実施例1、二価の二重特異性構築物 鎖2[配列番号4]

(VH)~VTVSSASPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

VH- CH3

20

> 実施例1、二価の二重特異性構築物 鎖3[配列番号5]

(VL)~VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

VL- CL- ヒンジ - CH2- CH3 (ホール)

30

> 実施例1、二価の二重特異性構築物 鎖4[配列番号6]

(VH)~VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC

VH- CH1

40

50

【化 3】

>ヒトIgG1のFc断片[配列番号7]

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP

>BC1 鎖1[配列番号8]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

ドメイン配置:

A- B- ヒンジ - D- E
VL- CH3- ヒンジ - CH2- CH3 (ノブ)

20

第1のCH3(ドメインB)における変異:

T366K; 445K, 446S, 447C 挿入物

第2のCH3(ドメインE)における変異:

S354C, K366W

>BC1 鎖2[配列番号9]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYDIHWVRQAPGKGLEWVGDIPTPDGT
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGT
LVTVSSASPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

30

ドメイン配置:

F- G
VH- CH3

CH3(ドメインG)における変異:

L351D; 445G, 446E, 447C 挿入物

40

【化 4】

>BC1 鎖3[配列番号10]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
CTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

ドメイン配置:

H- I- ヒンジ - J- K
VL- CL- ヒンジ - **CH2**- CH3 (ホール)

CH3(ドメインK)における変異:

Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

20

>BC1 鎖4[配列番号11]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSK
RYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGT LTVTSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC

30

ドメイン配置:

L- M
VH- CH1

40

50

【化 5】

>BC1 ドメインA[配列番号12]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSGSRSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

>BC1 ドメインB[配列番号13]

PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLKS

10

>BC1 ドメインD[配列番号14]

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

>BC1 ドメインE[配列番号15]

GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

>BC1 ドメインF[配列番号16]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDIPTPDGT
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGT
LVTVSSAS

>BC1 ドメインG[配列番号17]

PREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

30

>BC1 ドメインH[配列番号18]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

>BC1 ドメインI[配列番号19]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

【化 6】

>BC1 ドメインJ[配列番号20]

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFKNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

>BC1 ドメインK[配列番号21]

GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>BC1 ドメインL[配列番号22]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSK
RYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVTVSS

>BC1 ドメインM[配列番号23]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC

20

30

40

50

【化 7】

>BC28 鎖1[配列番号24]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSRSRGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTPREPQ
VCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

ドメイン配置:

A- B- ヒンジ - D- E
 VL- CH3- ヒンジ - CH2- CH3 (ノブ)

ドメインBにおける変異:

Y349C; 445P, 446G, 447K 挿入物

20

ドメインEにおける変異:

S354C, K366W

>BC28 鎖2[配列番号25]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDIPTPDGT
 TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGT
 LVTVSSASPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

ドメイン配置:

F- G
 VH- CH3

ドメインGにおける変異

S354C; 445P, 446G, 447K 挿入物

40

【化 8】

>BC28 ドメインA[配列番号26]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

>BC28 ドメインB[配列番号27]

PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>BC28 ドメインD[配列番号28]

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

>BC28 ドメインE[配列番号29]

GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

>BC28 ドメインF[配列番号30]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIHWVRQAPGKGLEWVGDIPTPDGT
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLVGEIATGFDYWGQGT
LVTVSSAS

>BC28 ドメインG[配列番号31]

PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

50

【化 9】

>BC44 鎖1[配列番号32]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSRSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVREPQVCTLPISRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK

10

ドメイン配置:

A- B- ヒンジ- D- E
VL- CH3- ヒンジ- CH2- CH3 (ノブ)

ドメインBにおける変異:

P343V; Y349C; 445P, 446G, 447K 挿入物

ドメインEにおける変異:

S354C, K366W

20

>BC44 ドメインA[配列番号33]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

>BC44 ドメインB[配列番号34]

VREPQVCTLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

>BC44 ドメインD[配列番号35]

APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

>BC44 ドメインE[配列番号36]

GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>配列番号10に等しいBC28二価鎖3

40

50

【化 10】

> 配列番号11に等しいBC28二価鎖4

> BC28 1×2 鎖3[配列番号37]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSRSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTPREPO
VCTLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSEIVLTQSP
ATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGS
GSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL*
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRE
EMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

ドメイン配置:

R-	S-	リンカー-	H-I-	ヒンジ-	J-	K-
VL-	<u>CH3-</u>	リンカー-	VL-	<u>CL-</u>	ヒンジ-	CH2- <u>CH3 (ホール)</u>

ドメインSにおける変異:

Y349C; 445P, 446G, 447K 挿入物

6アミノ酸リンカー挿入物: GSGSGS

30

ドメインKにおける変異:

Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

40

50

【化 1 1】

>BC28 1x2 ドメインR[配列番号38]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

>BC28 1x2 ドメインS[配列番号39]

PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>BC28 1x2 リンカー[配列番号40]

GSGSGS

>BC28 1x2 ドメインH[配列番号41]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

20

>BC28 1x2 ドメインI[配列番号42]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BC28 1x2 ドメインJ[配列番号43]

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

30

>BC28 1x2 ドメインK[配列番号44]

GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

■

40

50

【化 1 2】

>BC28-1×1×1a 鎖3[配列番号45]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSG
 VPSRFSGSRSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQRDSYLWTFGQGTKVEIKRTPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSKSCGSGSGSEIVLTQSP
 ATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
 GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE
 EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD
 KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

ドメイン配置:

20

R- S- リンカー - H-I- ヒンジ- J- K-
 VL- CH3- リンカー - VL- CL- ヒンジ- CH2- CH3 (ホール)

ドメインSにおける変異:

T366K; 445K, 446S, 447C 挿入物

6アミノ酸リンカー挿入物:GSGSGS

ドメインKにおける変異:

Y349C, D356E, L358M, T366S, L368A, Y407V

30

40

50

【化 1 3】

>BC28-1x1x1a ドメインR[配列番号46]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSG
VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRDSYLTWTFGQGTKVEIKRT

>BC28-1x1x1a ドメインS[配列番号47]

PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>BC28-1x1x1a リンカー[配列番号48]

GSGSGS

>BC28-1x1x1a ドメインH[配列番号49]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

20

>BC28-1x1x1a ドメインI[配列番号50]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>BC28-1x1x1a ドメインJ[配列番号51]

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

30

>BC28-1x1x1a ドメインK[配列番号52]

GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

50

【化 1 4】

>hCTLA4-4. 鎖2[配列番号53]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYIHWRQAPGKGLEWVAVIYPYTGF
 TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEYTVLDYWGQGLVT
 VSSASPREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

10

ドメイン配置:

F- G

VH- CH3

ドメインGにおける変異

L351D, 445G, 446E, 447C 挿入物

>hCTLA4-4 ドメインF[配列番号54]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYIHWRQAPGKGLEWVAVIYPYTGF
 TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEYTVLDYWGQGLVT
 VSSAS

20

>hCTLA4-4 ドメインG[配列番号55]

PREPQVYTDPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSGEC

他の配列:

30

>ヒンジ:DKTHTCPPCP [配列番号56]

>BC1-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTPREP [配列番号57]

>BC15-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTVREP [配列番号58]

>BC16-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTREP [配列番号59]

>BC17-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTVPREP [配列番号60]

>BC26-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTVAEP [配列番号61]

>BC27-ポリペプチド1 ドメインジャンクション:IKRTVAPREP [配列番号62]

40

>BC1-ポリペプチド2 ドメインジャンクション:SSASPREP [配列番号63]

>BC13-ポリペプチド2 ドメインジャンクション:SSASTREP [配列番号64]

>BC14-ポリペプチド2 ドメインジャンクション:SSASTPREP [配列番号65]

>BC24-ポリペプチド2 ドメインジャンクション:SSASTKGEP [配列番号66]

>BC25-ポリペプチド2 ドメインジャンクション:SSASTKGREP [配列番号67]

50

7. 参照による組み込み

【0306】

本出願で引用された全ての公開文献、特許、特許出願および他の文献は、あたかも個別の公開文献、特許、特許出願または他の文献が、あらゆる目的のために参照により個別に示されて組み込まれているのと同程度に、あらゆる目的のためにそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

8. 均等物

【0307】

様々な特定の実施形態を例証および記載してきたが、上記明細書は限定的なものではない。様々な変更が、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく行われうることが理解される。多くの変形が、本明細書を検討すると、当業者には明らかになる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

第1および第2のポリペプチド鎖を含む結合分子であって、

(a) 前記第1のポリペプチド鎖はドメインA、ドメインB、ドメインD、およびドメインEを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインAはV L アミノ酸配列を有し、ドメインBはC H 3 アミノ酸配列を有し、ドメインDはC H 2 アミノ酸配列を有し、ドメインEは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；

(b) 前記第2のポリペプチド鎖はドメインFおよびドメインGを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、F-Gの配向で配置され、ドメインFはV H アミノ酸配列を有し、ドメインGはC H 3 アミノ酸配列を有し；

(c) 前記第1および前記第2のポリペプチドは、前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用および前記Bドメインと前記Gドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記結合分子を形成する、結合分子。

(項目2)

第3および第4のポリペプチド鎖をさらに含み、

(a) 前記第3のポリペプチド鎖はドメインH、ドメインI、ドメインJ、およびドメインKを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、H-I-J-Kの配向で配置され、ドメインHは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインIは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインJはC H 2 アミノ酸配列を有し、およびKは定常領域ドメインアミノ酸配列を有し；

(b) 前記第4のポリペプチド鎖はドメインLおよびドメインMを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、L-Mの配向で配置され、ドメインLは可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメインMは定常領域アミノ酸配列を有し；

(c) 前記第3および前記第4のポリペプチドは、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用および前記Iドメインと前記Mドメインとの間の相互作用を介して会合し；

(d) 前記第1および前記第3のポリペプチドは、前記Dドメインと前記Jドメインとの間の相互作用および前記Eドメインと前記Kドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記結合分子を形成する、項目1に記載の結合分子。

(項目3)

前記Bドメインと前記Gドメインのアミノ酸配列が同一であり、前記配列は内在性C H 3 配列である、項目1または2のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目4)

前記Bドメインと前記Gドメインのアミノ酸配列が異なり、それぞれ別個に直交型改変を内在性C H 3 配列に含み、ここで前記Bドメインは前記Gドメインと相互作用し、前記Bドメインと前記Gドメインのどちらも、前記直交型改変を欠くC H 3 ドメインと顕著に相互作用しない、項目1または2のいずれか一項に記載の結合分子。

10

20

30

40

50

(項目 5)

前記直交型改変が、ドメイン B と G との間に操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含む、項目 4 に記載の結合分子。

(項目 6)

操作されたジスルフィド架橋を生成する前記変異が、前記 B ドメインと G ドメインの一方における S 3 5 4 C 変異、ならびに他方のドメインにおける 3 4 9 C である、項目 5 に記載の結合分子。

(項目 7)

前記直交型改変がノブ・イン・ホール変異を含む、項目 4 から 6 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 8)

前記ノブ・イン・ホール変異が、前記 B ドメインと G ドメインの一方における T 3 6 6 W 変異、ならびに他方のドメインにおける T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 変異である、項目 7 に記載の結合分子。

(項目 9)

前記直交型改変が、電荷対変異を含む、項目 4 から 8 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 10)

前記電荷対変異が、前記 B ドメインと G ドメインの一方における T 3 6 6 K 変異、ならびに他方のドメインにおける L 3 5 1 D 変異である、項目 9 に記載の結合分子。

(項目 11)

前記ドメイン E が C H 3 アミノ酸配列を有する、項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 12)

前記 E および K ドメインのアミノ酸配列が同一であり、前記配列は内在性 C H 3 配列である、項目 2 から 11 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 13)

前記 E および K ドメインのアミノ酸配列が異なる、項目 2 から 11 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 14)

前記異なる配列が、それぞれ別個に直交型改変を内在性 C H 3 配列に含み、ここで前記 E ドメインは前記 K ドメインと相互作用し、前記 E ドメインと前記 K ドメインのどちらも、前記直交型改変を欠く C H 3 ドメインと顕著に相互作用しない、項目 13 に記載の結合分子。

(項目 15)

前記直交型改変が、ドメイン E と K との間に操作されたジスルフィド架橋を生成する変異を含む、項目 14 に記載の結合分子。

(項目 16)

操作されたジスルフィド架橋を生成する前記変異が、前記 E ドメインと K ドメインの一方における S 3 5 4 C 変異、ならびに他方のドメインにおける 3 4 9 C である、項目 15 に記載の結合分子。

(項目 17)

前記 E および K ドメインにおける前記直交型改変がノブ・イン・ホール変異を含む、項目 14 から 16 のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目 18)

前記ノブ・イン・ホール変異が、前記 E ドメインまたは K ドメインの一方における T 3 6 6 W 変異、ならびに他方のドメインにおける T 3 6 6 S、L 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 変異である、項目 17 に記載の結合分子。

(項目 19)

前記直交型改変が、電荷対変異を含む、項目 14 から 18 のいずれか一項に記載の結合分子。

10

20

30

40

50

(項目 2 0)

前記電荷対変異が、前記 E ドメインまたは K ドメインの一方における T 3 6 6 K 変異、
ならびに他方のドメインにおける対応する L 3 5 1 D 変異である、項目 1 9 に記載の結合
分子。

(項目 2 1)

前記 E ドメインおよび前記 K ドメインのアミノ酸配列が、前記第 1 のポリペプチドと前
記第 3 のポリペプチドとの間の特異的会合を促進する特異的相互作用を有するように選択
された 2 つの異なる抗体ドメインの内在性配列である、項目 1 3 に記載の結合分子。

(項目 2 2)

2 つの異なるアミノ酸配列が、C H 1 配列および C L 配列である、項目 2 1 に記載の結
合分子。

10

(項目 2 3)

ドメイン I が C L 配列を有し、ドメイン M が C H 1 配列を有する、項目 2 から 2 2 のい
ずれか一項に記載の結合分子。

(項目 2 4)

ドメイン H が V L 配列を有し、ドメイン L が V H 配列を有する、項目 2 から 2 3 のい
ずれか一項に記載の結合分子。

(項目 2 5)

ドメイン H が V L アミノ酸配列を有し；

ドメイン I が C L アミノ酸配列を有し；

ドメイン K が C H 3 アミノ酸配列を有し；

ドメイン L が V H アミノ酸配列を有し；

ドメイン M が C H 1 アミノ酸配列を有する、項目 2 から 2 4 のいずれか一項に記載の結
合分子。

20

(項目 2 6)

前記 A ドメインと前記 F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗
原結合部位を形成し、前記 H ドメインと前記 L ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原
に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成する、項目 2 から 2 5 のいずれか一項に記載の結合
分子。

(項目 2 7)

第 1、第 2、第 3、および第 4 のポリペプチド鎖を含む結合分子であって：

(a) 前記第 1 のポリペプチド鎖はドメイン A、ドメイン B、ドメイン D、およびドメ
イン E を含み、

ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、A - B - D - E の配向で配置され、
ドメイン A は V L アミノ酸配列を有し、ドメイン B は C H 3 アミノ酸配列を有し、ドメ
イン D は C H 2 アミノ酸配列を有し、ドメイン E は定常領域ドメインアミノ酸配列を有し
；

(b) 前記第 2 のポリペプチド鎖はドメイン F およびドメイン G を含み、

ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、F - G の配向で配置され、
ドメイン F は V H アミノ酸配列を有し、ドメイン G は C H 3 アミノ酸配列を有し；

40

(c) 前記第 3 のポリペプチド鎖はドメイン H、ドメイン I、ドメイン J、およびドメ
イン K を含み、

ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、H - I - J - K の配向で配置され、
ドメイン H は可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメイン I は定常領域ドメインア
ミノ酸配列を有し、ドメイン J は C H 2 アミノ酸配列を有し、および K は定常領域ドメイ
ンアミノ酸配列を有し；

(d) 前記第 4 のポリペプチド鎖はドメイン L およびドメイン M を含み、

ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、L - M の配向で配置され、
ドメイン L は可変領域ドメインアミノ酸配列を有し、ドメイン M は定常領域ドメインア
ミノ酸配列を有し；

50

(e) 前記第1および前記第2のポリペプチドは、前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用および前記Bドメインと前記Gドメインとの間の相互作用を介して会合し；

(f) 前記第3および前記第4のポリペプチドは、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用および前記Iドメインと前記Mドメインとの間の相互作用を介して会合し；

(g) 前記第1および前記第3のポリペプチドは、前記Dドメインと前記Jドメインとの間の相互作用および前記Eドメインと前記Kドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する、結合分子。

(項目28)

前記ドメインEがCH3アミノ酸配列を有し；

ドメインHがVLアミノ酸配列を有し；

ドメインIがCLアミノ酸配列を有し；

ドメインKがCH3アミノ酸配列を有し；

ドメインLがVHアミノ酸配列を有し；

ドメインMがCH1アミノ酸配列を有する、項目27に記載の結合分子。

(項目29)

第5のポリペプチド鎖をさらに含み、

(a) 前記第1のポリペプチド鎖がドメインNおよびドメインOをさらに含み、ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置され、ドメインNはVLアミノ酸配列を有し、ドメインOはCH3アミノ酸配列を有し；

(b) 前記結合分子が、第5のポリペプチド鎖をさらに含み、第5のポリペプチド鎖が、ドメインPおよびドメインQを含み、

ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、ドメインPはVHアミノ酸配列を有し、ドメインQはCH3アミノ酸配列を有し；

(c) 前記第1および前記第5のポリペプチドは、前記Nドメインと前記Pドメインとの間の相互作用および前記Oドメインと前記Qドメインとの間の相互作用を介して会合して、結合分子を形成する、項目2から26のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目30)

(a) ドメインNおよびドメインAのアミノ酸配列が同一であり、ドメインHのアミノ酸配列がドメインNおよびAのアミノ酸配列と異なり、ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列が同一であり、ドメインIのアミノ酸配列がドメインOおよびBのアミノ酸配列と異なり、ドメインPおよびドメインFのアミノ酸配列が同一であり、ドメインLのアミノ酸配列がドメインPおよびFのアミノ酸配列と異なり、ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列が同一であり、ドメインMのアミノ酸配列がドメインQおよびGのアミノ酸配列と異なり；

(b) 前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、前記ドメインNおよびドメインPが、前記第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する、項目29に記載の結合分子。

(項目31)

(a) ドメインN、ドメインA、およびドメインHのアミノ酸配列が異なり、ドメインO、ドメインB、およびドメインIのアミノ酸配列が異なり、ドメインP、ドメインF、およびドメインLのアミノ酸配列が異なり、ドメインQ、ドメインG、およびドメインMのアミノ酸配列が異なり；

(b) 前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、

前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、

前記ドメインNおよびドメインPが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する、項目29に記載の結合分子。

10

20

30

40

50

(項目 3 2)

第 6 のポリペプチド鎖をさらに含み、

(a) 前記第 3 のポリペプチド鎖はドメイン R およびドメイン S をさらに含み、
ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、R－S－H－I－J－K の配向で配置され、

ドメイン R は V L アミノ酸配列を有し、ドメイン S は定常ドメインアミノ酸配列を有し；

(b) 前記結合分子が、第 6 のポリペプチド鎖をさらに含み、第 6 のポリペプチド鎖が、
ドメイン T およびドメイン U を含み、

ここで前記ドメインは、N 末端から C 末端へ、T－U の配向で配置され、

ドメイン T は V H アミノ酸配列を有し、ドメイン U は定常ドメインアミノ酸配列を有し；

(c) 前記第 3 および前記第 6 のポリペプチドは、前記 R ドメインと前記 T ドメインとの間の相互作用および前記 S ドメインと前記 U ドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記結合分子を形成する、項目 2 から 2 6 のいずれか一項に記載の結合分子。

10

(項目 3 3)

(a) ドメイン R およびドメイン A のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン H のアミノ酸配列がドメイン R および A のアミノ酸配列と異なり、

ドメイン S およびドメイン B のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン I のアミノ酸配列がドメイン S および B のアミノ酸配列と異なり、

ドメイン T およびドメイン F のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン L のアミノ酸配列がドメイン T および F のアミノ酸配列と異なり、

20

ドメイン U およびドメイン G のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン M のアミノ酸配列がドメイン U および G のアミノ酸配列と異なり；

(b) 前記 A ドメインと前記 F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、

前記 H ドメインと前記 L ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、

前記ドメイン R およびドメイン T が、前記第 1 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成する、項目 3 2 に記載の結合分子。

(項目 3 4)

(a) ドメイン R およびドメイン H のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン A のアミノ酸配列がドメイン R および H のアミノ酸配列と異なり、

ドメイン S およびドメイン I のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン B のアミノ酸配列がドメイン S および I のアミノ酸配列と異なり、

ドメイン T およびドメイン L のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン F のアミノ酸配列がドメイン T および L のアミノ酸配列と異なり、

ドメイン U およびドメイン M のアミノ酸配列が同一であり、

ドメイン G のアミノ酸配列がドメイン U および M のアミノ酸配列と異なり、

(b) 前記 A ドメインと前記 F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、

前記 H ドメインと前記 L ドメインとの間の相互作用が、第 2 の抗原に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成し、

前記ドメイン R およびドメイン T が、前記第 2 の抗原に特異的な第 3 の抗原結合部位を形成する、項目 3 2 に記載の結合分子。

30

40

(項目 3 5)

(a) ドメイン R、ドメイン A、およびドメイン H のアミノ酸配列が異なり、

ドメイン S、ドメイン B、およびドメイン I のアミノ酸配列が異なり、

ドメイン T、ドメイン F、およびドメイン L のアミノ酸配列が異なり、

ドメイン U、ドメイン G、およびドメイン M のアミノ酸配列が異なり、

(b) 前記 A ドメインと前記 F ドメインとの間の相互作用が、第 1 の抗原に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、

50

前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、前記ドメインRおよびドメインTが、第3の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成する、項目32に記載の結合分子。

(項目36)

第5および第6のポリペプチド鎖をさらに含み、

(a) 前記第1のポリペプチド鎖が、ドメインNおよびドメインOをさらに含み、ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、N-O-A-B-D-Eの配向で配置されており；

(b) 前記第3のポリペプチド鎖はドメインRおよびドメインSをさらに含み、ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、R-S-H-I-J-Kの配向で配置されており；

(c) 前記結合分子が、第5および第6のポリペプチド鎖をさらに含み：

前記第5ポリペプチド鎖が、ドメインPおよびドメインQを含み、ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、P-Qの配向で配置され、

前記第6ポリペプチド鎖が、ドメインTおよびドメインUを含み、ここで前記ドメインは、N末端からC末端へ、T-Uの配向で配置され；

(d) 前記第1および前記第5のポリペプチドは、前記Nドメインと前記Pドメインとの間の相互作用および前記Oドメインと前記Qドメインとの間の相互作用を介して会合し、

前記第3および前記第6のポリペプチドは、前記Rドメインと前記Tドメインとの間の相互作用および前記Sドメインと前記Uドメインとの間の相互作用を介して会合して、前記結合分子を形成する、項目2から26のいずれか一項に記載の結合分子。

(項目37)

(a) ドメインNおよびドメインAのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインHおよびドメインRのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインOおよびドメインBのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインIおよびドメインSのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインPおよびドメインFのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインLおよびドメインTのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインQおよびドメインGのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインMおよびドメインUのアミノ酸配列が同一であり；

(b) 前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、前記ドメインNおよびドメインPが、前記第1の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用が、第2の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成し、前記Rドメインと前記Tドメインとの間の相互作用が、前記第2の抗原に特異的な第4の抗原結合部位を形成する、項目36に記載の結合分子。

(項目38)

(a) ドメインHおよびドメインAのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインNおよびドメインRのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインIおよびドメインBのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインOおよびドメインSのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインLおよびドメインFのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインPおよびドメインTのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインMおよびドメインGのアミノ酸配列が同一であり、

ドメインQおよびドメインUのアミノ酸配列が同一であり；

(b) 前記Aドメインと前記Fドメインとの間の相互作用が、第1の抗原に特異的な第1の抗原結合部位を形成し、前記ドメインNおよびドメインPが、第2の抗原に特異的な第2の抗原結合部位を形成し、前記Hドメインと前記Lドメインとの間の相互作用が、前記第1の抗原に特異的な第3の抗原結合部位を形成し、前記Rドメインと前記Tドメインとの間の相互作用が、前記第2の抗原に特異的な第4の抗原結合部位を形成する、項目36に記載の結合分子。

(項目 3 9)

前記 A ドメインと前記 B ドメインとの間のジャンクションを形成する配列が、I K R T P R E P または I K R T V R E P である、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

(項目 4 0)

前記 F ドメインと前記 G ドメインとの間のジャンクションを形成する配列が、S S A S P R E P である、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

(項目 4 1)

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、前記 C H 3 アミノ酸配列とヒンジアミノ酸配列とを連結する C 末端トリペプチド挿入物を有し、ここで前記トリペプチド挿入物は、P G K、K S C および G E C からなる群から選択される、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

10

(項目 4 2)

前記配列が、ヒト配列である、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

(項目 4 3)

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、I g G 配列である、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

(項目 4 4)

前記 I g G 配列が I g G 1 配列である、項目 4 3 に記載の結合分子。

(項目 4 5)

少なくとも 1 つの C H 3 アミノ酸配列が、1 つまたは複数のイソアロタイプ変異を有する、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

20

(項目 4 6)

前記イソアロタイプ変異が D 3 5 6 E および L 3 5 8 M である、項目 4 5 に記載の結合分子。

(項目 4 7)

前記 C L アミノ酸配列が C カッパ配列である、上記項目のいずれかに記載の結合分子。

(項目 4 8)

上記項目のいずれかに記載の結合分子と、
薬学的に許容される担体と
を含む、医薬組成物。

30

(項目 4 9)

項目 4 8 に記載の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、処置方法。

40

50

【図 5】

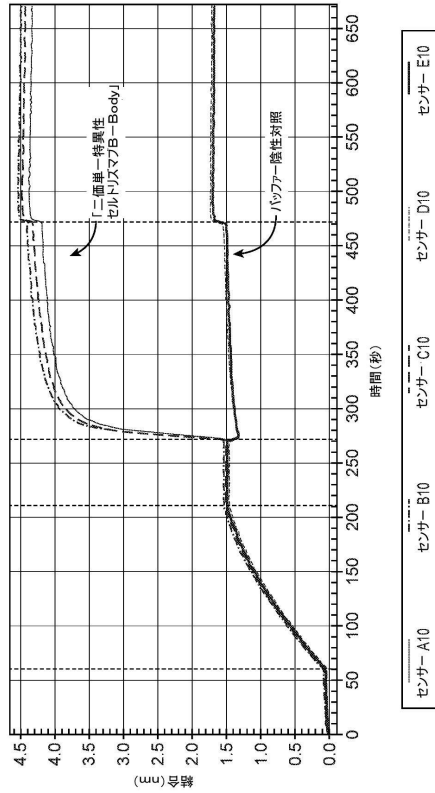


FIG. 5

【図 6】

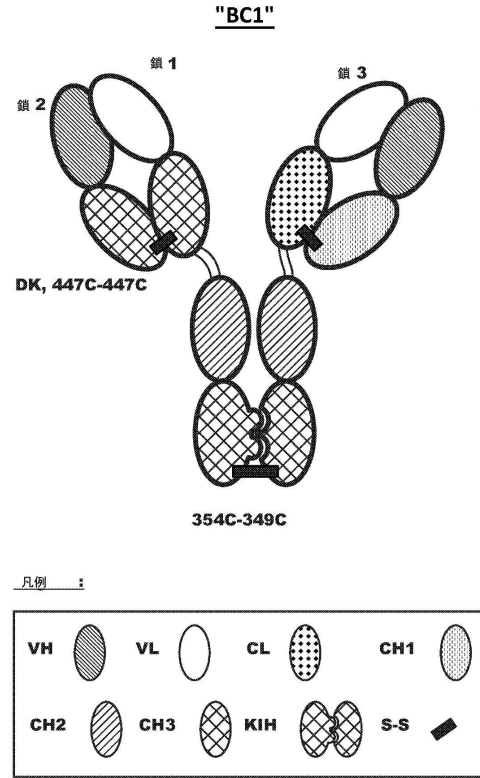


FIG. 6

【図 7】

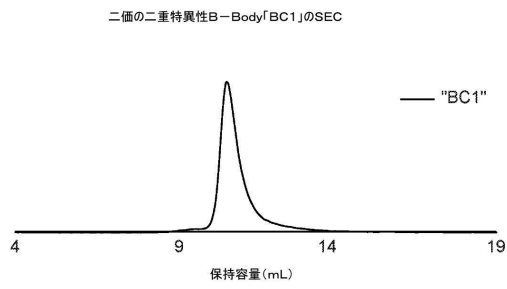
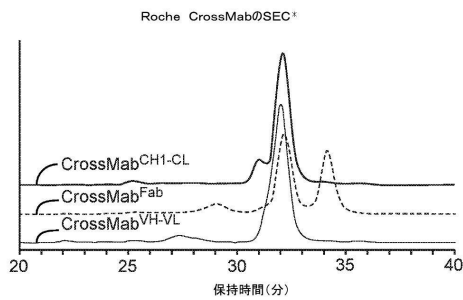


FIG. 7A



* Schaefer *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Jul 5;108(27):11187-92) からのデータ

FIG. 7B

【図 8】

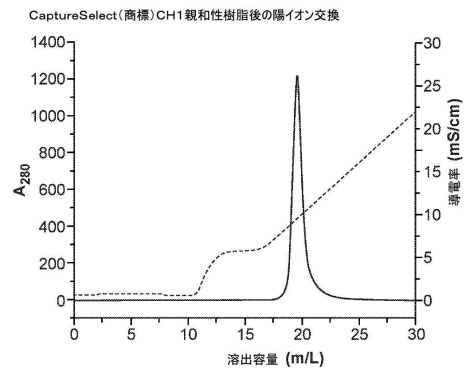


FIG. 8A

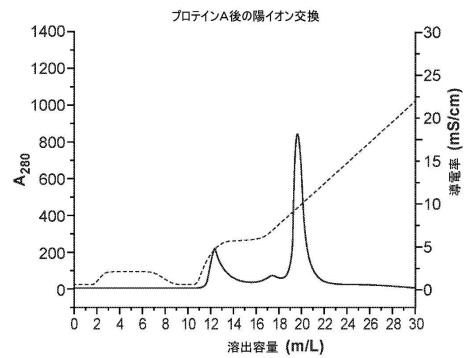


FIG. 8B

10

20

30

40

50

【図 9】

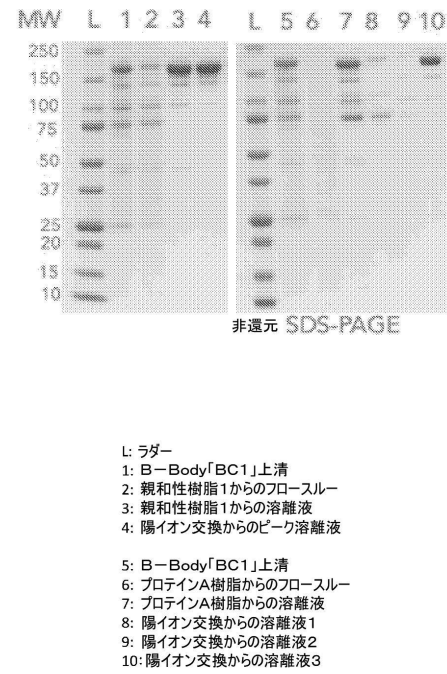


FIG. 9

【図 10】

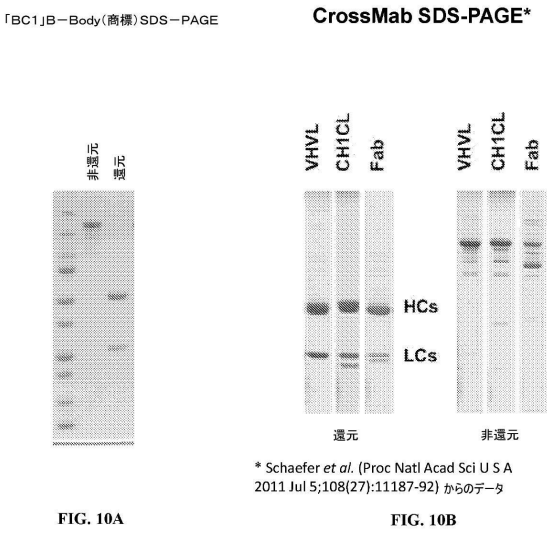


FIG. 10A

FIG. 10B

【図 11】

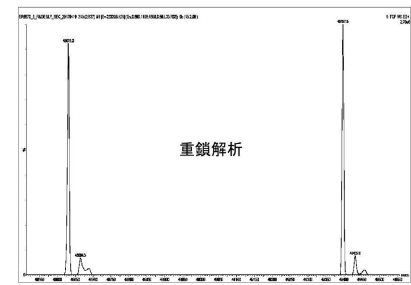


FIG. 11A

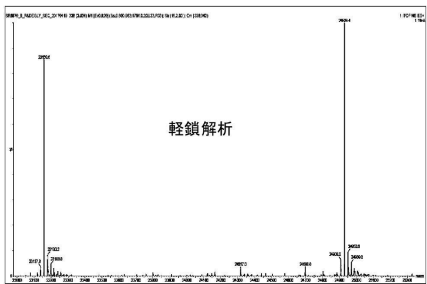


FIG. 11B

【図 12】

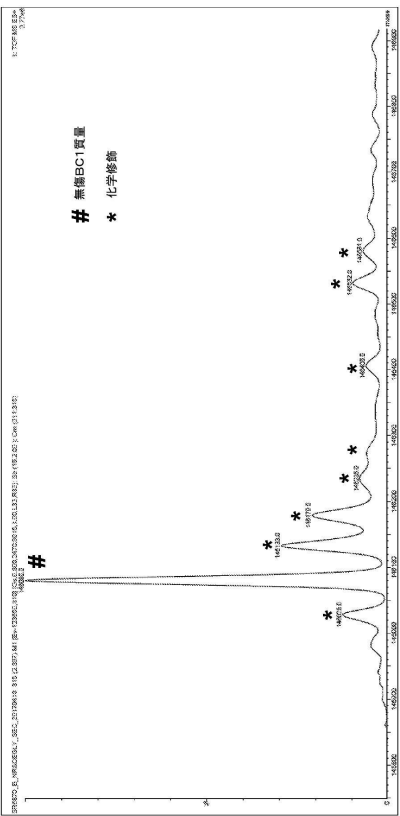


FIG. 12

10

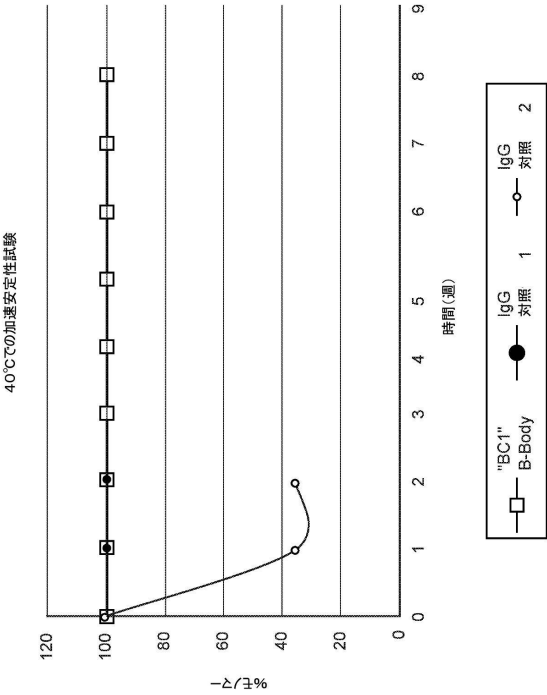
20

30

40

50

【図 1 3】



【図 1 4】

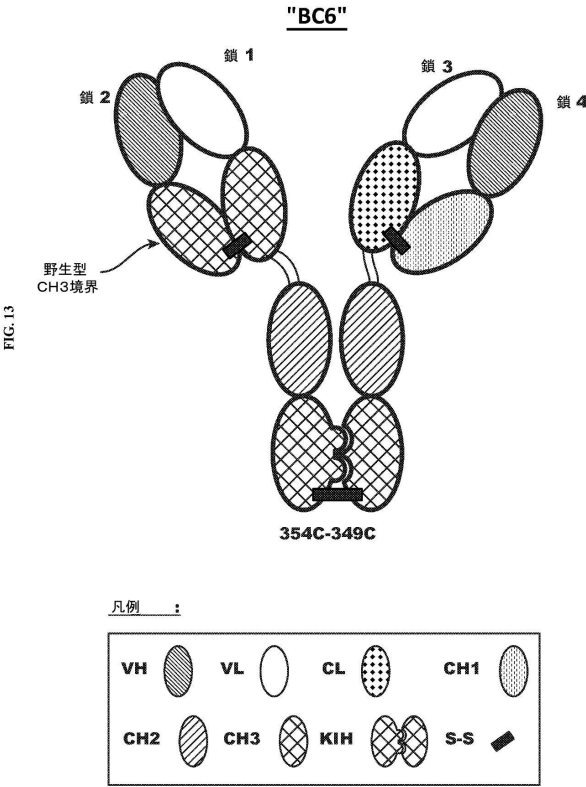


FIG. 14

【図 1 5】

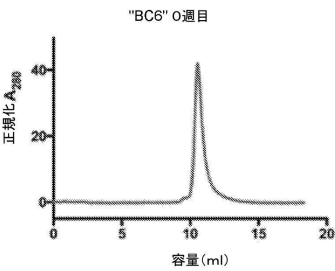


FIG. 15A

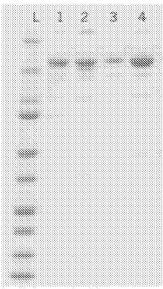


FIG. 15B

【図 1 6】

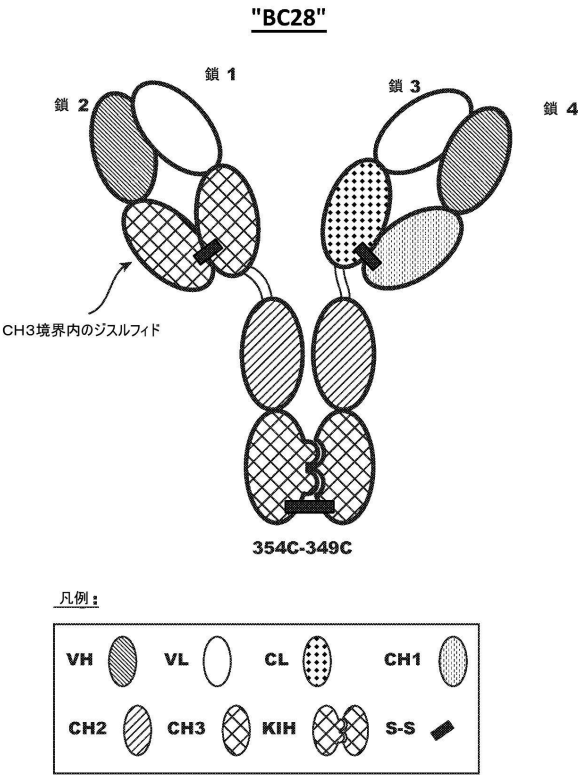


FIG. 16

10

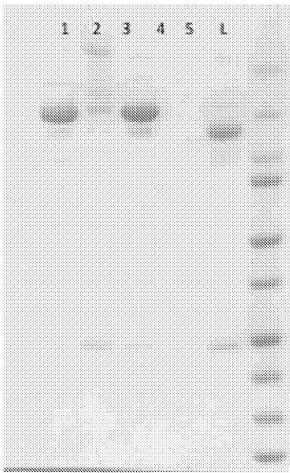
20

30

40

50

【図 1 7】



L: ラダー
1: "BC28" 349C-354C
2: "BC29" 351C-351C
3: "BC30" 354C-349C
4: "BC31" 394C-394C
5: "BC32" 407C-407C

FIG. 17

【図 1 8】

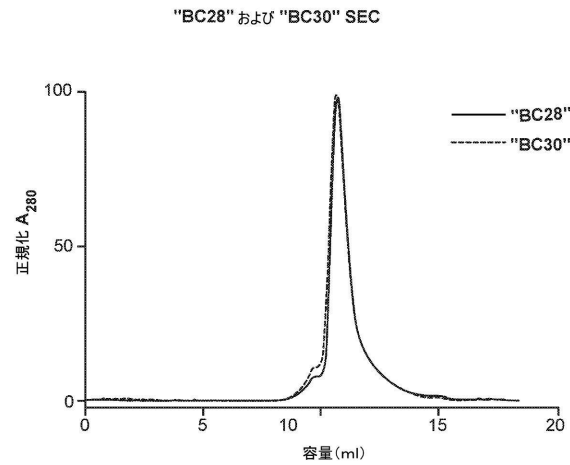


FIG. 18

【図 1 9】

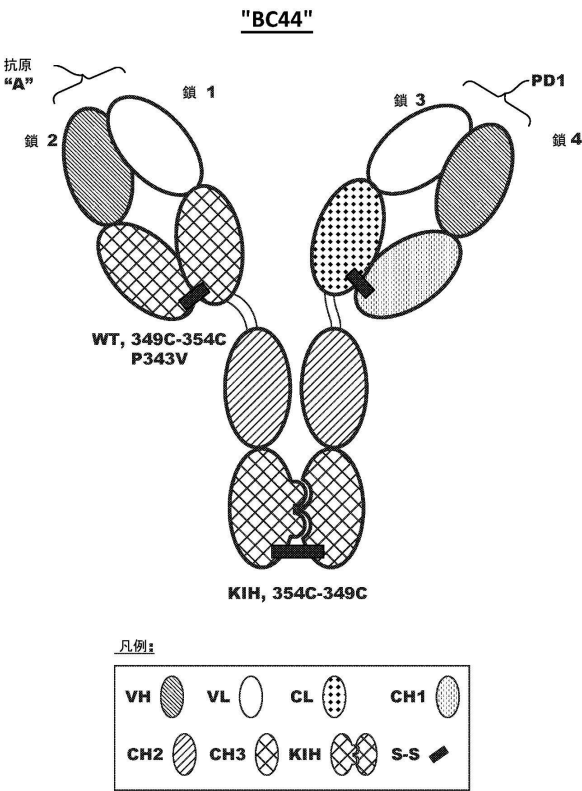


FIG. 19

【図 2 0】

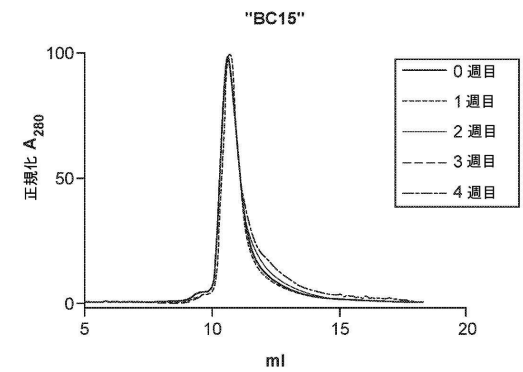


FIG. 20A

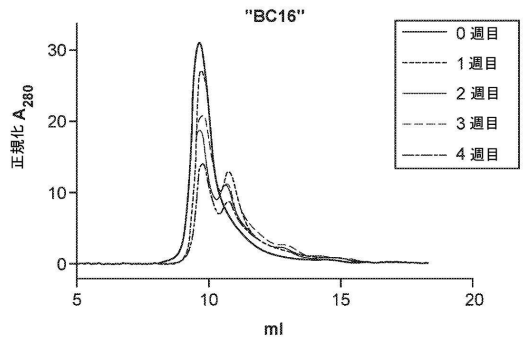


FIG. 20B

10

20

30

40

50

【図 2 1】

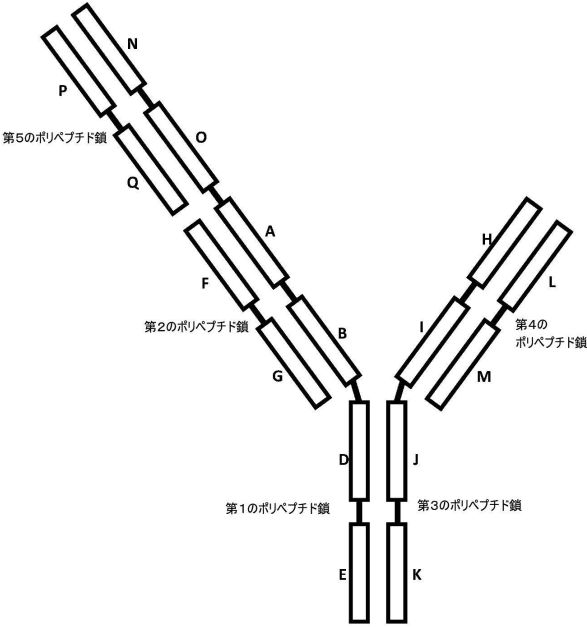


FIG. 21

【図 2 2】

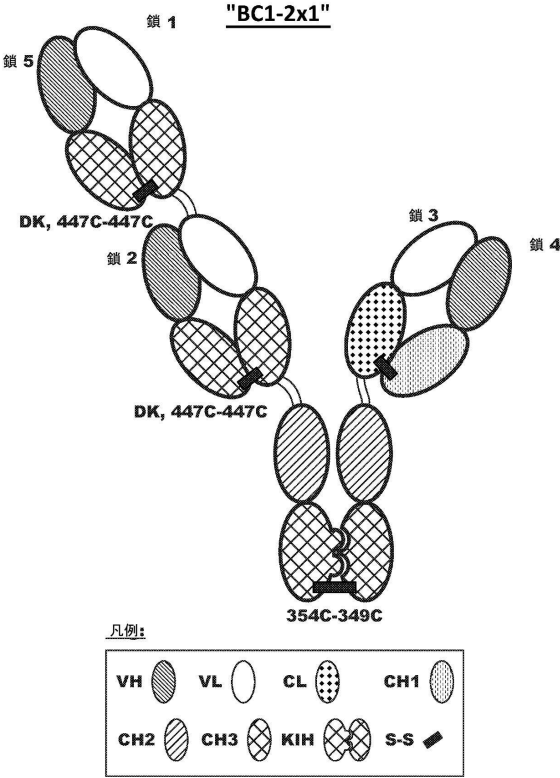
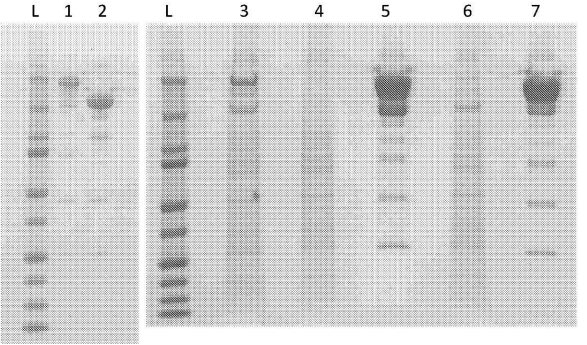


FIG. 22

【図 2 3】



L: ラダー
1: 「BC1-2×1」CH1溶離液
2: 「BC1」CH1溶離液

3: 「BC1-2×1」Expi293からの上清
4: 「BC1-2×1」プロテインA後のフロースルー
5: 「BC1-2×1」プロテインA溶離液
6: 「BC1-2×1」CH1樹脂後のフロースルー
7: 「BC1-2×1」CH1溶離液

FIG. 23

【図 2 4】

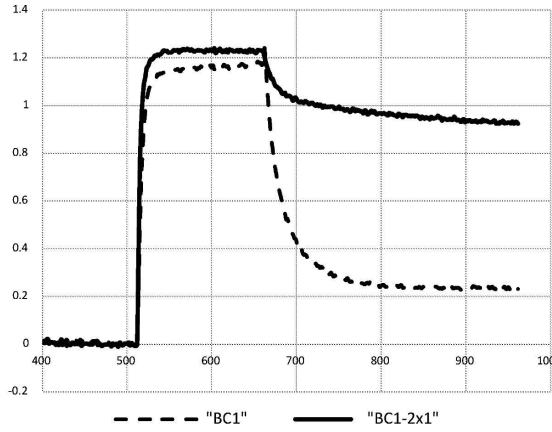


FIG. 24

10

20

30

40

50

【図 2 5】

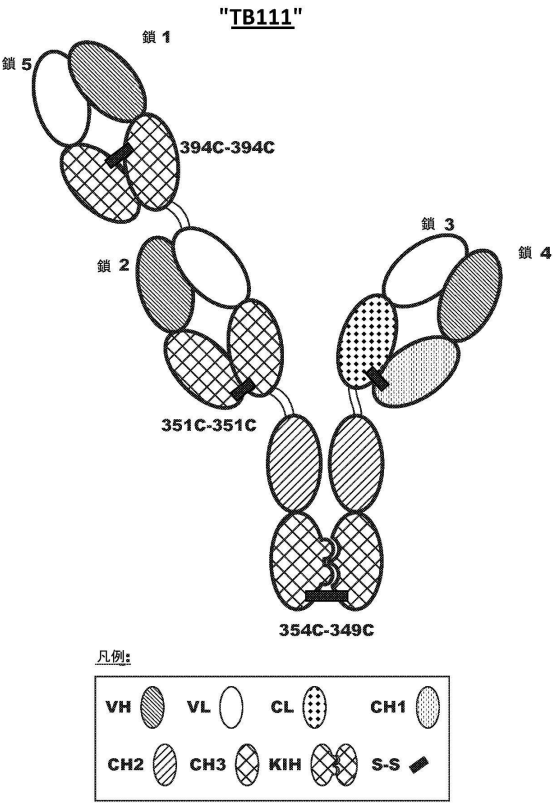


FIG. 25

【図 2 6】

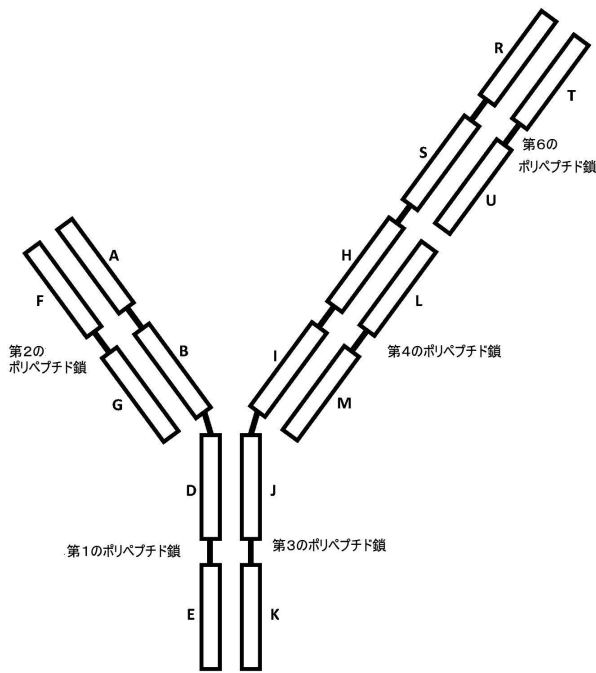


FIG. 26

【図 2 7】

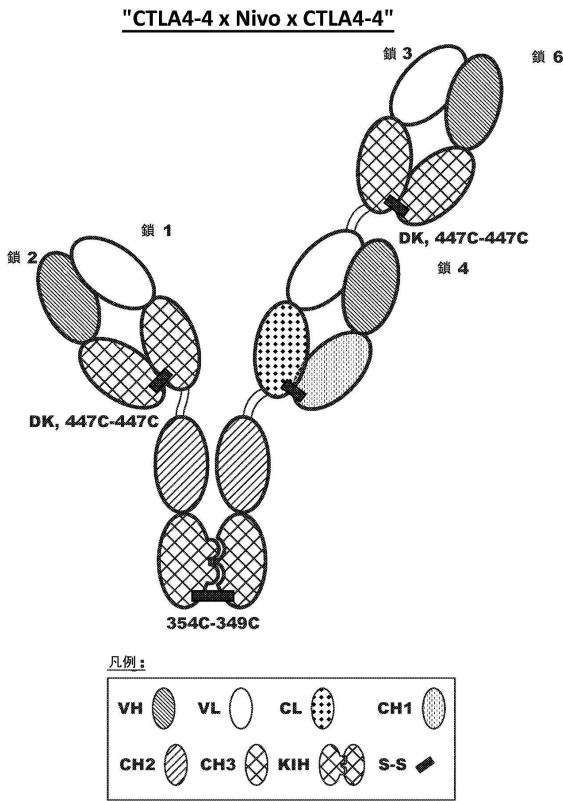


FIG. 27

【図 2 8】

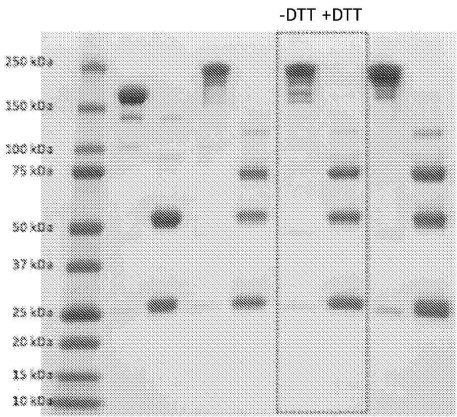
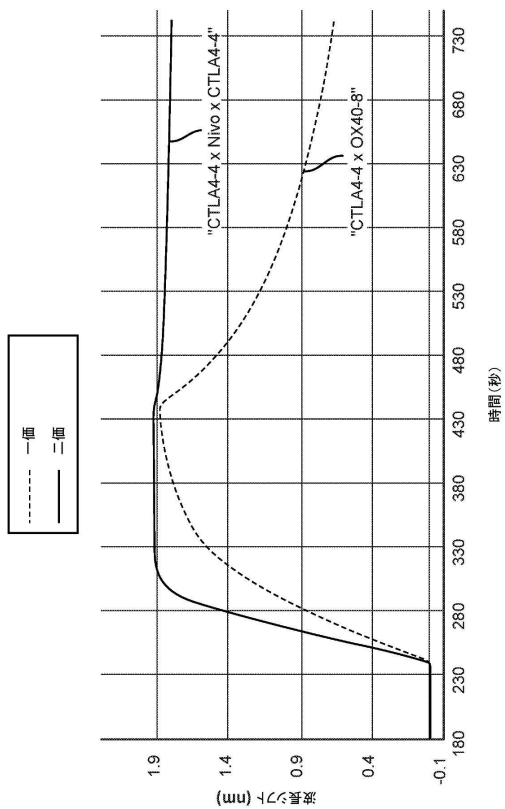
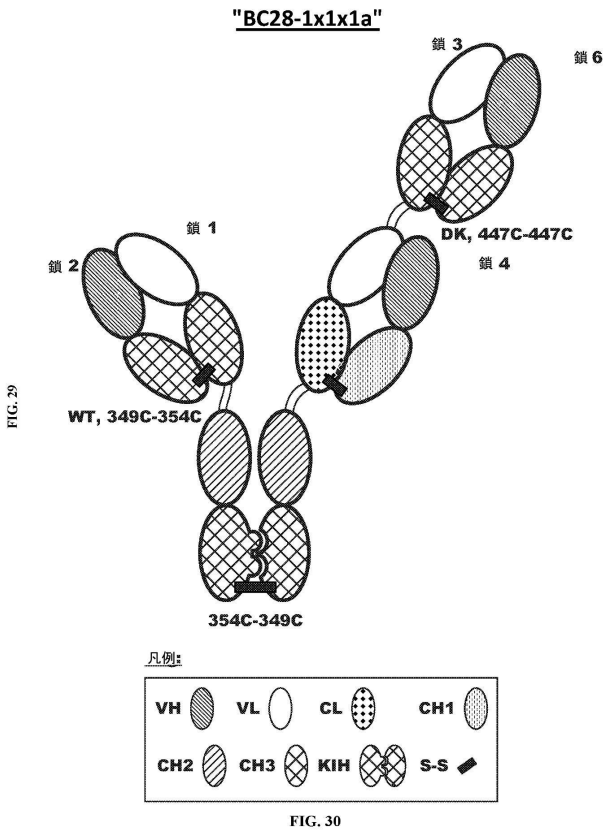


FIG. 28

【図 29】



【図 30】



【図 31】

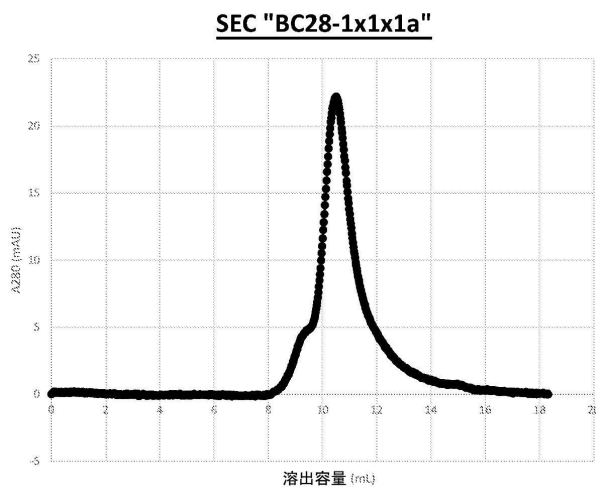


FIG. 31

【図 32】

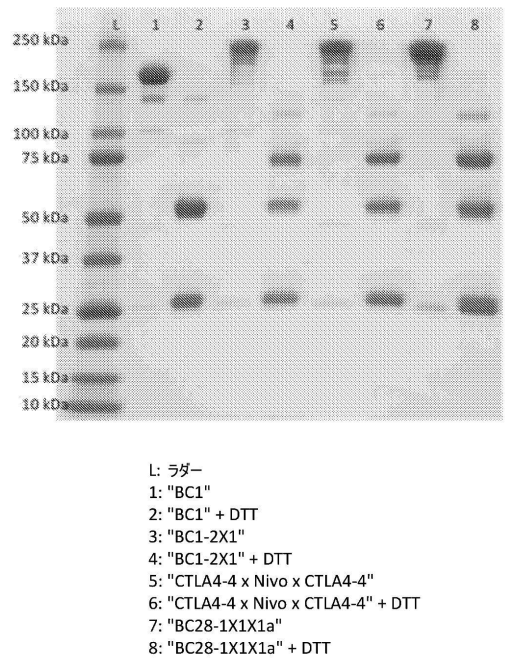


FIG. 32

10

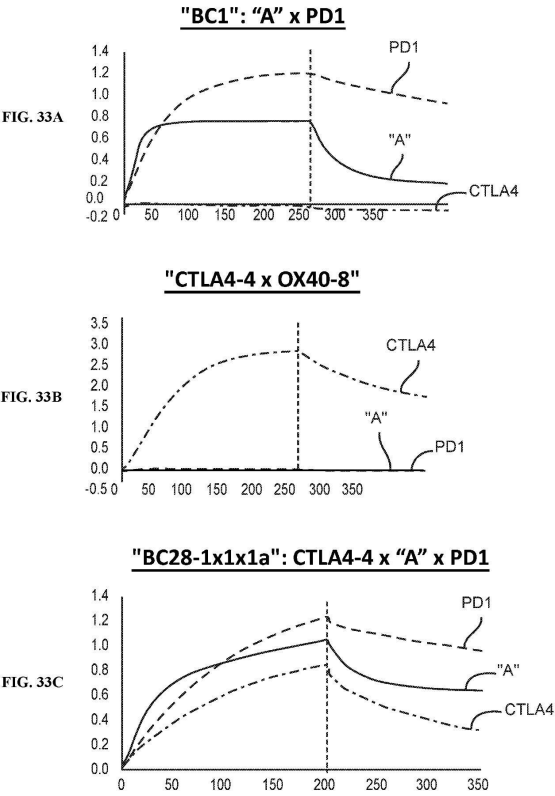
20

30

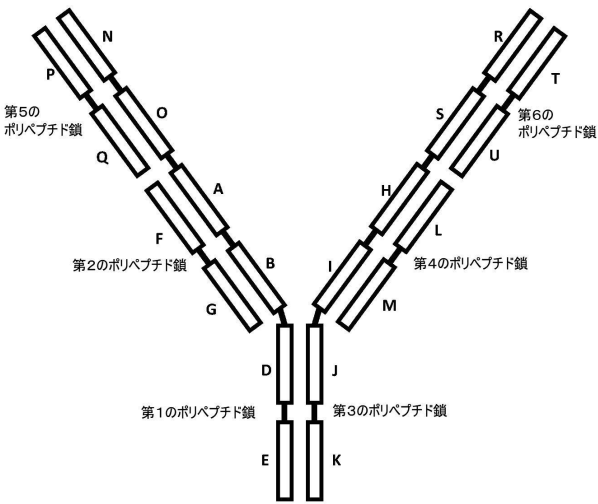
40

50

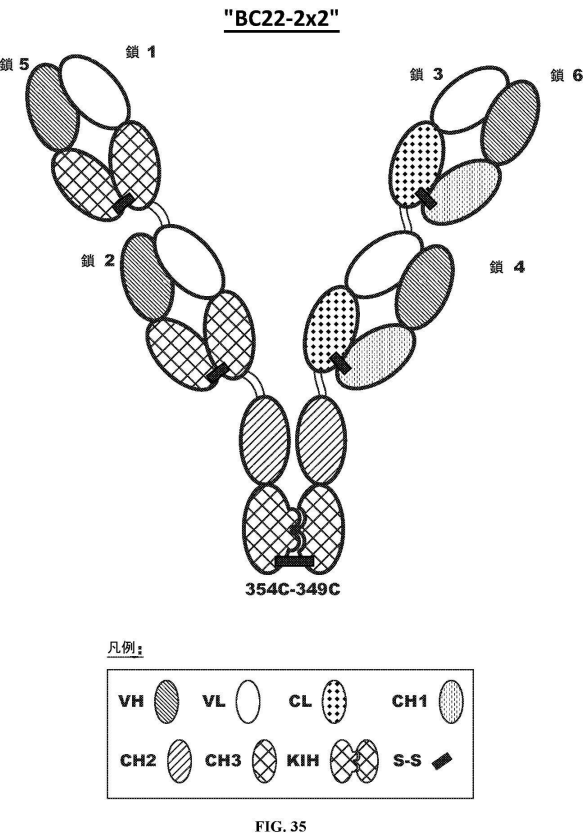
【図 3 3】



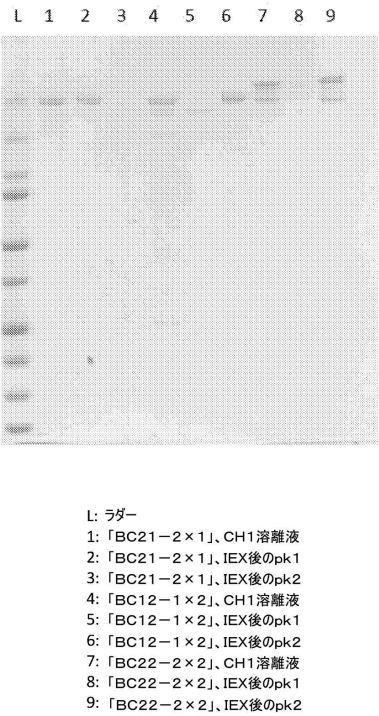
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



L: ラダー
1: 「BC21-2x1」、CH1溶解液
2: 「BC21-2x1」、IEX後のpk1
3: 「BC21-2x1」、IEX後のpk2
4: 「BC12-1x2」、CH1溶解液
5: 「BC12-1x2」、IEX後のpk1
6: 「BC12-1x2」、IEX後のpk2
7: 「BC22-2x2」、CH1溶解液
8: 「BC22-2x2」、IEX後のpk1
9: 「BC22-2x2」、IEX後のpk2

10

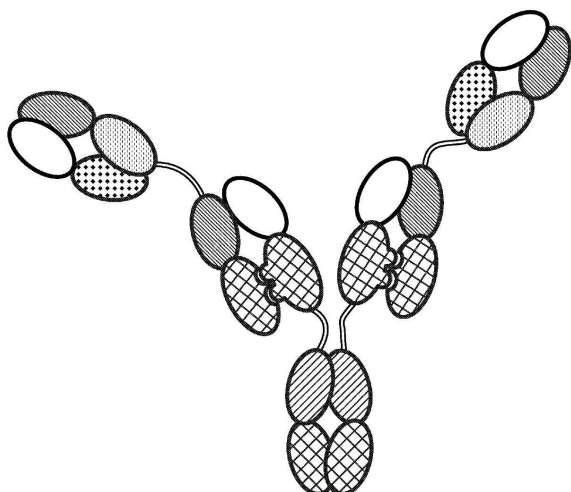
20

30

40

50

【圖 3 7】



凡例:

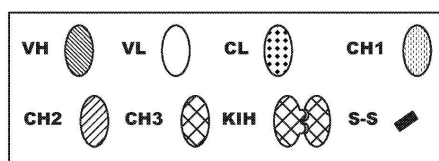


FIG. 37

【圖 3 8】

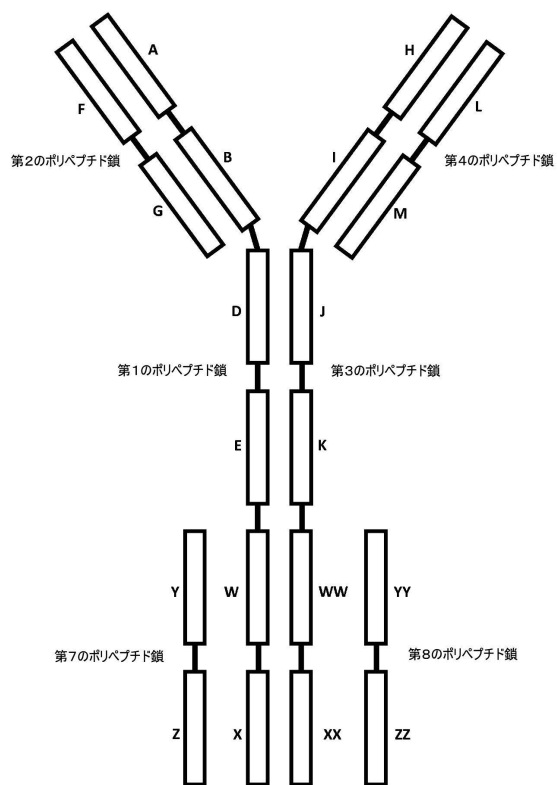
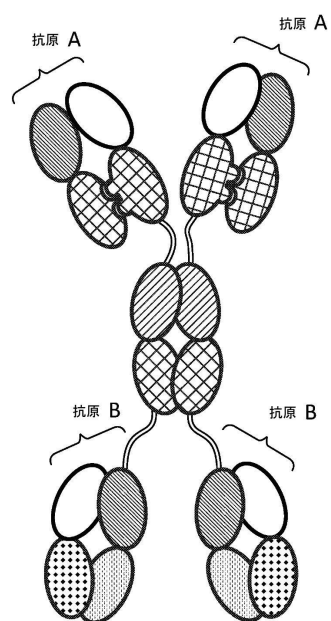


FIG. 38

【図 3 9】



凡例：

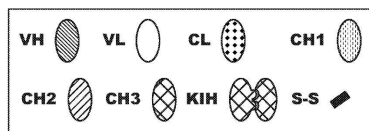
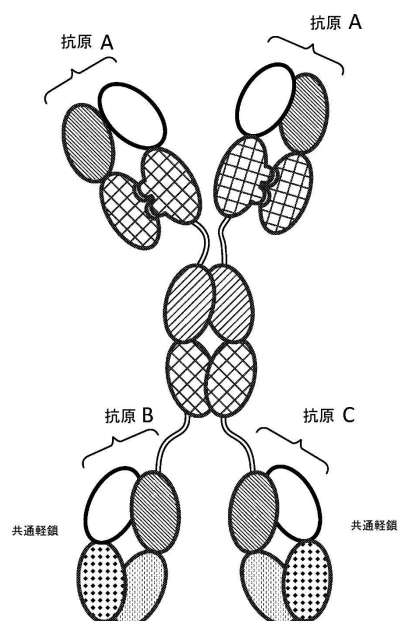


FIG. 39

【図 40】



凡例：

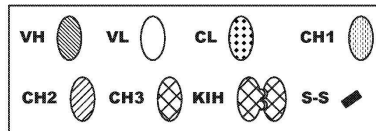
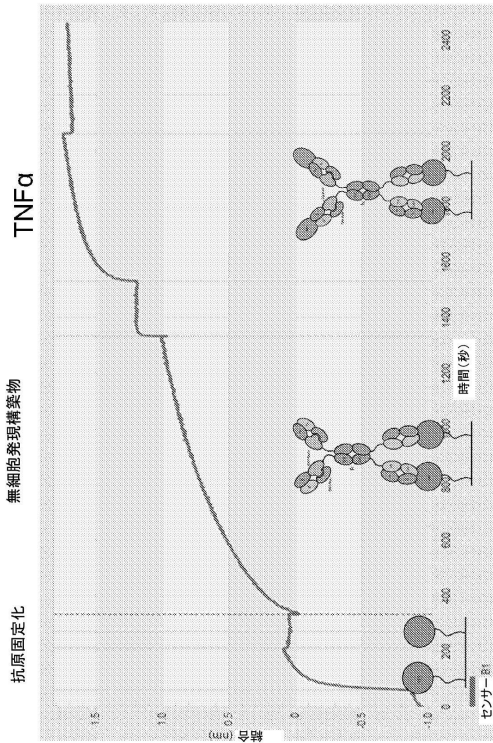


FIG. 40

【図 4 1】



【図 4 2】

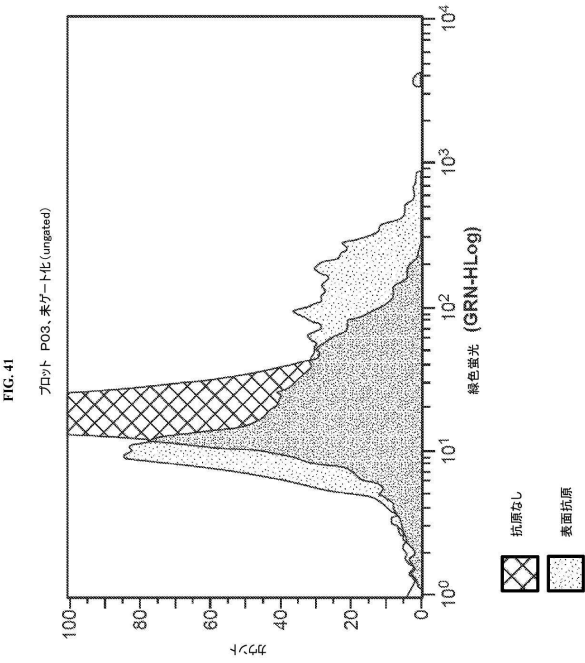


FIG. 42

【図 4 3】

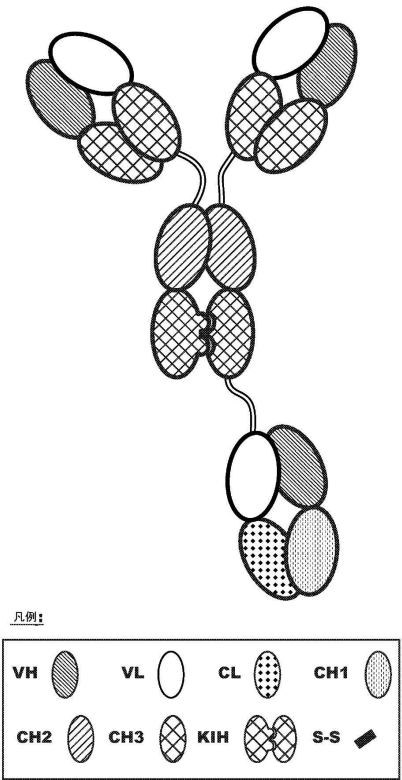


FIG. 43

【図 4 4】

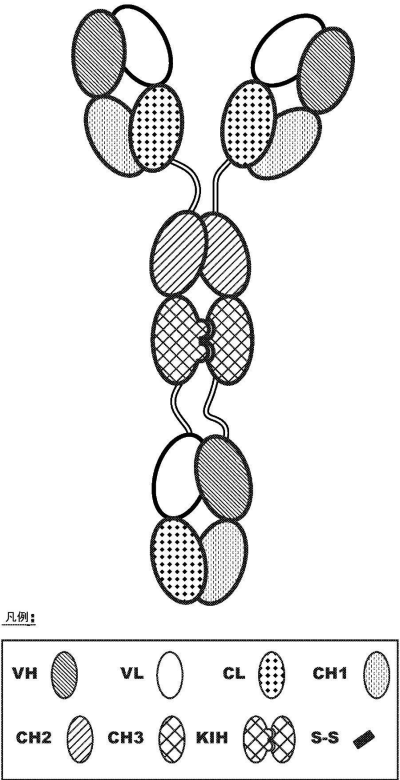


FIG. 44

10

20

30

40

50

【図 4 5】

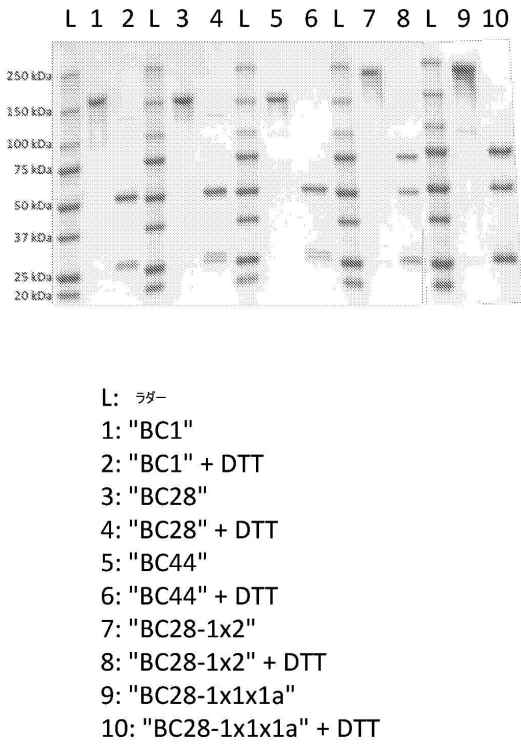


FIG. 45

【図 4 6】

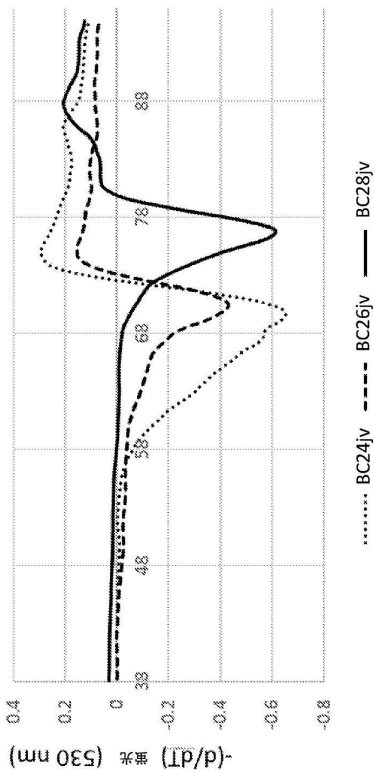


FIG. 46

【配列表】

0007261158000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
			C 1 2 N	15/09	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/549,894

(32)優先日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(72)発明者 ベイリー, ルーカス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9, マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 5, スイート 2 3 5, インベンラ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 グレーザー, ブライアン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9, マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 5, スイート 2 3 5, インベンラ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 リー, チューフェイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9, マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 5, スイート 2 3 5, インベンラ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 グリーン, ローランド

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 9, マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 5, スイート 2 3 5, インベンラ インコーポレイテッド 気付

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 7 6 5 0 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 1 5 2 9 6 (US, A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 1 5 2 7 5 (JP, A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 7 8 6 9 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (JDreamIII)