

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7682853号
(P7682853)

(45)発行日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(24)登録日 令和7年5月16日(2025.5.16)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 C
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	39/395 L
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/65
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68
請求項の数 59 (全120頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2022-507737(P2022-507737)		(73)特許権者 597160510	
(86)(22)出願日 令和2年8月7日(2020.8.7)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド	
(65)公表番号 特表2022-543669(P2022-543669 A)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.	
(43)公表日 令和4年10月13日(2022.10.13)		アメリカ合衆国10591-6707ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番	
(86)国際出願番号 PCT/US2020/045309		(74)代理人 100105957	
(87)国際公開番号 WO2021/026409		弁理士 恩田 誠	
(87)国際公開日 令和3年2月11日(2021.2.11)		(74)代理人 100068755	
審査請求日 令和5年8月7日(2023.8.7)		弁理士 恩田 博宣	
(31)優先権主張番号 62/884,496		(74)代理人 100142907	
(32)優先日 令和1年8月8日(2019.8.8)		弁理士 本田 淳	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		(74)代理人 100152489	
(31)優先権主張番号 63/050,483			
(32)優先日 令和2年7月10日(2020.7.10)			
最終頁に続く		最終頁に続く	
(54)【発明の名称】 新規抗原結合分子フォーマット			

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の標的分子に結合する抗原結合分子であって、

(a) NからC末端配向で

(i) 第1のFcドメイン、および

(ii) 第1の軽鎖可変領域(VL)に会合した第1の重鎖可変領域(VH)と第1の軽鎖定常領域(CL)に会合した第1の重鎖定常領域(CH)とをNからC配向で含む第1のFabドメインを含む、第1のポリペプチドと、

(b) NからC末端配向で

(i) 前記第1のFcドメインとは異なる配列を有する第2のFcドメイン、および

(ii) 第2のVLに会合した第2のVHと第2の軽鎖定常領域(CL)に会合した第2の重鎖定常領域(CH)とをNからC配向で含む第2のFabドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含み、

前記第1のポリペプチド及び前記第2のポリペプチドが、前記第1のFcドメイン及び前記第2のFcドメインそれぞれのC末端領域側にのみ重鎖可変領域(VH)を含み、

前記第1のFcドメインおよび第2のFcドメインが、互いに会合してFcヘテロダイマーであるFc領域を形成する、抗原結合分子。

【請求項2】

前記第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて100kDa未満の分子量を有する、請求項1に記載の抗原結合分子。

【請求項 3】

前記第 1 の標的分子が、翻訳後修飾を含めて 100 kDa 未満の分子量を有する、請求項 1 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4】

前記第 1 の標的分子が、低分子可溶性リガンドである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 5】

前記第 1 の標的分子が、サイトカインまたはケモカインである、請求項 4 に記載の抗原結合分子。

【請求項 6】

前記第 1 の Fc ドメインと前記第 1 の VH との間に第 1 のリンカーを含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 7】

前記第 1 のリンカーが、5 アミノ酸～60 アミノ酸の長さである、請求項 6 に記載の抗原結合分子。

【請求項 8】

前記第 1 のリンカーが、 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、 n が 1 ～ 7 の整数である、請求項 7 に記載の抗原結合分子。

【請求項 9】

前記第 2 の Fc ドメインと前記第 2 の VH との間に第 2 のリンカーを含む、請求項 2 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 10】

前記第 1 のリンカーおよび前記第 2 のリンカーが、同一のアミノ酸配列を有する、請求項 9 に記載の抗原結合分子。

【請求項 11】

前記第 2 のリンカーが、5 アミノ酸～60 アミノ酸の長さである、請求項 9 に記載の抗原結合分子。

【請求項 12】

前記第 2 のリンカーが、 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、 n が 1 ～ 7 の整数である、請求項 11 に記載の抗原結合分子。

【請求項 13】

前記第 1 のポリペプチドが、前記第 1 の Fc ドメインの N 末端にある第 1 のヒンジドメインを含み、前記第 2 のポリペプチドが、前記第 2 の Fc ドメインの N 末端にある第 2 のヒンジドメインを含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 14】

前記第 1 のヒンジドメインおよび前記第 2 のヒンジドメインがジスルフィド結合を介して連結される、請求項 13 に記載の抗原結合分子。

【請求項 15】

1 つのヒンジ領域を有する、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 16】

前記 1 つのヒンジ領域が、アミノ酸配列 ESKYGPPC P P C または GGGGSC P P C を有するヒンジフォーマットを有する、請求項 15 に記載の抗原結合分子。

【請求項 17】

2 つのヒンジ領域を有する、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 18】

前記 2 つのヒンジ領域が、アミノ酸配列 ESKYGPPC P P C を有するヒンジフォーマットを有する、請求項 17 に記載の抗原結合分子。

【請求項 19】

前記第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドが、非同一である、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

前記第1のV Lおよび第2のV Lが、共通の軽鎖であるか、または前記第1のF a bドメインの前記第1のC Lおよび前記第1のC H1、もしくは前記第2のF a bドメインの前記第2のC Lおよび前記第2のC H1がC r o s s m a b配置にある、請求項1～19のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 21】

前記第1のF a bドメインおよび前記第2のF a bドメインが、単鎖F a bの形態になり、請求項1～20のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 22】

前記第1のF a bドメインおよび前記第2のF a bドメインを含む天然免疫グロブリンよりも大きな親和性および／または親和力で前記第1の標的分子に結合する、請求項1～21のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

10

【請求項 23】

二価である、請求項1～22のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 24】

結合パートナーへの前記第1の標的分子の結合を阻害する、請求項1～23のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 25】

前記結合パートナーが、前記第1の標的分子の受容体である、請求項24に記載の抗原結合分子。

20

【請求項 26】

前記F c領域が、ヒトF c配列を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 27】

前記F c領域が、ヒトI g G₁のF c配列またはヒトI g G₄のF c配列である、請求項26に記載の抗原結合分子。

【請求項 28】

前記F cヘテロダイマーにおける前記F cドメインが、野生型F cドメインと比較してノブインホール変異を含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 29】

(a) 前記第1のポリペプチドにおける前記F cドメインが、ノブ変異を含み、前記第2のポリペプチドにおける前記F cドメインが、ホール変異を含む、または、

30

(b) 前記第2のポリペプチドにおける前記F cドメインが、ノブ変異を含み、前記第1のポリペプチドにおける前記F cドメインが、ホール変異を含む、請求項28に記載の抗原結合分子。

【請求項 30】

前記F c領域が、野生型F c領域と比較して星型変異 (s t a r m u t a t i o n) を含む、請求項29に記載の抗原結合分子。

【請求項 31】

野生型F c領域と比較して、

40

(a) 前記第1のポリペプチドにおける前記F cドメインが、H435R変異およびY436F変異を含む、または、

(b) 前記第2のポリペプチドにおける前記F cドメインが、H435R変異およびY436F変異を含む、請求項30に記載の抗原結合分子。

【請求項 32】

前記第1のF a bドメインおよび前記第2のF a bドメインが、前記第1の標的分子に結合する、請求項1～31のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 33】

前記第1の標的分子が、細胞表面タンパク質である、請求項1～32のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

50

【請求項 3 4】

前記第 1 の標的分子が、腫瘍関連抗原である、請求項 3 3 に記載の抗原結合分子。

【請求項 3 5】

前記第 1 の標的分子が、グリコシル化されない、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 3 6】

前記第 1 の標的分子が、モノマーである、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 3 7】

前記第 1 の標的分子が、ダイマーである、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 3 8】

前記ダイマーが、ホモダイマーまたはヘテロダイマーである、請求項 3 7 に記載の抗原結合分子。

【請求項 3 9】

前記第 1 の標的分子が、(a) トリマーであり、または (b) テトラマーである、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 0】

前記トリマーがホモトリマーである、請求項 3 9 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 1】

前記テトラマーがホモテトラマーである、請求項 3 9 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 2】

二重特異性である、請求項 1 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 3】

前記第 1 の標的分子上の第 1 のエピトープおよび第 2 のエピトープに結合することができる、請求項 4 2 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 4】

前記第 1 の標的分子上の前記第 1 のエピトープに結合する少なくとも 1 つの F a b ドメインおよび前記第 2 のエピトープに結合する少なくとも 1 つの F a b ドメインを含む、請求項 4 3 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 5】

前記第 1 の標的分子上の前記第 1 のエピトープに結合する前記少なくとも 1 つの F a b ドメインおよび前記第 2 のエピトープに結合する前記少なくとも 1 つの F a b ドメインが、前記第 1 の標的分子上の異なるエピトープに同時に結合することができる、請求項 4 4 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 6】

前記第 1 の標的分子におよび第 2 の標的分子に結合することができる、請求項 4 2 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 7】

単一特異性である、請求項 1 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 8】

前記第 1 の標的分子に結合する少なくとも 1 つの F a b ドメインおよび前記第 2 の標的分子に結合する少なくとも 1 つの F a b ドメインを含む、請求項 4 6 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4 9】

前記第 1 の標的分子および前記第 2 の標的分子に同時に結合することができる、請求項 4 8 に記載の抗原結合分子。

【請求項 5 0】

(a) 前記第 1 の F a b ドメインおよび前記第 2 の F a b ドメインを含むヒト I g G 抗体と比較してより低い I C₅₀ で前記第 1 の標的分子の受容体への前記標的分子の結合を

10

20

30

40

50

遮断する、または

(b) 前記第1のFabドメインおよび前記第2のFabドメインを含むヒトIgG抗体よりも大きな親和性で前記標的分子に結合する、請求項1～49のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項51】

請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子および細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤を含む、コンジュゲート。

【請求項52】

請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項51に記載のコンジュゲートと、賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項53】

標的分子の異常な発現または活性に関連した状態の治療方法に使用される、請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項54】

標的分子に関連した分子経路の阻害方法に使用される、請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項55】

請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む、核酸分子または複数の核酸分子。

【請求項56】

前記1つ以上のヌクレオチド配列が、各々発現制御配列に作動可能に連結される、請求項55に記載の核酸分子または複数の核酸分子。

【請求項57】

請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子を発現するように操作された細胞。

【請求項58】

請求項1～50のいずれか一項に記載の抗原結合分子を産生する方法であって、

(a) 請求項57に記載の細胞を、前記抗原結合分子が発現される条件下で培養することと、

(b) 細胞培養から前記抗原結合分子を回収することと、を含む、方法。

【請求項59】

請求項58に記載の方法であって、前記抗原結合分子を濃縮すること、および／または前記抗原結合分子を精製することをさらに含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、2019年8月8日に出願された、米国仮特許出願第62／884，496号、および2020年7月10日に出願された同第63／050，483号の優先権を主張し、その各々の内容は、その参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

2. 配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2020年8月6日に作成された、当該ASCIIコピーは、RGN-001WO__SL.txtという名前であり、サイズは25，358バイトである。

【背景技術】

【0003】

3. 背景技術

ほとんどの自然に発生する抗体分子は、一般に、2つのいわゆる軽鎖ポリペプチド（軽鎖）および2つのいわゆる重鎖ポリペプチド（重鎖）を含む。重鎖および軽鎖ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの各々は、抗原と相互作用することができる結合領域を含む可変ドメイン（可変領域）（一般にポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含有する。重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、定常領域（一般にカルボキシル末端部分）を含む。

【0004】

細胞または細胞株の単一クローンによって産生される、組換えモノクローナル抗体は、過去20年間に様々な異なる疾患の治療のための非常に成功したクラスの生物学的薬物として出現した。モノクローナル抗体（mAb）は、重要なクラスの生物療法製品であり、それらは、多くの生命を脅かす慢性疾患の治療において卓越した成功を収めている。

【0005】

親和性および／または親和力の増加は、エピトープが抗体の抗原結合部分、例えば、Fabドメインによってアクセス可能である場合に発生する。しかしながら、従来の抗体フォーマットの形状は、特に標的のサイズが小さい場合、または望ましいエピトープ（複数の標的分子上のものを含む）が比較的に物理的近接にある場合、もしくは物理的に近接させることが望ましい場合、単一の標的分子上の複数のエピトープを認識する抗体の能力を限定する。よって、代替の抗体-抗原結合形状を通して、親和性、親和力、または抗体機能を改善し得る結合分子を生成のための効率的なプラットフォームが有用であろう。

【発明の概要】

【0006】

4. 概要

本開示は、非天然構成に少なくとも2つのFabドメインを含有する抗原結合分子（「ABM」）を提供する。ABMは、少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、各々は、Fcドメインおよび少なくとも2つのFabドメインの1つの成分を含む。本開示の例示的なABMは、図1B、2B、および3A～3Dに示される。

【0007】

Fcドメインおよび任意の会合ポリペプチド鎖を含む各ポリペプチド鎖は、本明細書では「半抗体」と呼ばれる。本開示の典型的なABMは、それらのFcドメインを通して会合した2つの半抗体を含む。会合したFcドメインは、一緒にFc領域を形成する。Fc領域に加えて、本開示の典型的なABMは、各半抗体において非天然構成に少なくとも1つのFabドメインを含む。非天然構成におけるFabドメインのうちの少なくとも1つまたは両方のそのようなFabドメインは、標的分子に結合する。「天然構成」または「天然免疫グロブリン構成」とは、自然に発生するIgG抗体における抗体ドメインの構成を意味する。添付の概略図では、VHドメインは、数字（1）で標識され、CH1ドメインは、数字（2）で標識され、ヒンジドメインは、数字（3）で標識され、CH2ドメインは、数字（4）で標識され、CH3ドメインは、数字（5）で標識され、VLドメインは、数字（6）で標識され、CLドメインは、数字（7）で標識され、ヒンジドメインではないリンカーは、数字（8）で標識される。よって、添付の図面における標識への参照によって、天然免疫グロブリン構成は、本質的に以下からなる：

- ・本質的に、NからC末端配向で、VHドメイン（1）、CH1ドメイン（2）、ジスルフィド架橋を介して第2の（重鎖）ポリペプチドのヒンジ領域に連結されたヒンジ領域（3）、CH2ドメイン（4）、およびCH3ドメイン（5）からなる、第1の（重鎖）ポリペプチド、

- ・本質的に、NからC末端配向で、VHドメイン（1）、CH1ドメイン（2）、ジスルフィド架橋を介して第1の（重鎖）ポリペプチドのヒンジ領域に連結されたヒンジ領域（3）、CH2ドメイン（4）、およびCH3ドメイン（5）からなる、第2の（重鎖）ポリペプチド、

- ・本質的に、NからC末端配向で、第1の（重鎖）ポリペプチドに会合した、VLドメイン（6）およびCLドメイン（7）からなる、第3の（軽鎖）ポリペプチド、ならびに

- ・本質的に、NからC末端配向で、第2の（重鎖）ポリペプチドに会合した、VLドメイン（6）およびCLドメイン（7）からなる、第4の（軽鎖）ポリペプチド。

【0008】

10

20

30

40

50

「天然構成」または「天然免疫グロブリン構成」への参照は、用語を野生型抗体配列または単一特異性抗体のみに限定することを意図するものではない。むしろ、図 1 A および図 2 A に示されるように、フォーマットは、単一特異性抗体（図 1 A）またはバリエーション配列を有する従来の二重特異性抗体（図 2 B）の両方に適用することができる。図 1 A の単一特異性抗体フォーマットと図 2 A の二重特異性抗体フォーマットとの間の基本的な相違は、それらの構成ではなく、（例えば、セクション 6. 2. 7. 2 に記載されるように）Fc ヘテロダイマーにおける使用であり、各 Fc 領域は、異なる VH ドメインに連結し、異なるエピトープへの結合を可能にする。明瞭さのために、本明細書で使用される場合、「二重特異性」という用語は、同じ抗原もしくは標的分子上、または異なる抗原もしくは標的分子上にかかわらず、任意の 2 つの異なるエピトープへの結合を指す。

10

【0009】

本開示の ABM は、小可溶性標的分子、例えば、サイトカインまたはケモカインへの結合に特に有用であり、例えば、受容体などの結合パートナーへの標的分子の結合を遮断することによって、標的分子の活性のアンタゴナイズにおける用途を見出す。理論によって拘束されることなく、本開示の結合フォーマットは、同じ少なくとも 2 つの Fab ドメインを含む天然免疫グロブリンよりも大きな親和性および／または親和力での標的分子への結合を可能にすると考えられる。

【表 1】

表 A: 図 1~3 に示される ABM フォーマットの用語凡例			
フォーマット	サブフォーマット	例示的な図	代替名称
フォーマット A	N/A	1B(ホモダイマー構成) 2B(ヘテロダイマー構成)	Fc-Fab
フォーマット B	N/A	3A	リーチ
フォーマット C	フォーマット C1	3B	クランプ
フォーマット C	フォーマット C2	3C(構成 1(1-1-2-2 構成)) 3D(構成 2(1-2-1-2 構成))	2+2 タンデム Fab

20

【0010】

これらの ABM フォーマットは、以下により詳しく記載される。

【0011】

30

第 1 の態様では、本開示の ABM は、

- ・ N から C 末端配向で
 - －任意のヒンジドメイン、
 - －第 1 の Fc ドメイン、および
 - －第 1 の軽鎖可変領域（VL）に会合した第 1 の重鎖可変領域（VH）を含む第 1 の Fab（Fab1）ドメインを含む、第 1 の半抗体と、

- ・ N から C 末端配向で
 - －任意のヒンジドメイン、
 - －第 2 の Fc ドメイン、および
 - －第 2 の VL に会合した第 2 の VH を含む第 2 の Fab ドメイン（「Fab2」）を含む、第 2 の半抗体と、を含み、

40

第 1 の Fc ドメインおよび第 2 の Fc ドメインは、互いに会合されて Fc 領域を形成し、任意のヒンジドメインは、存在する場合、ジスルフィド架橋を通して互いに会合され得る。

【0012】

一般に本明細書で ABM フォーマット「A」（「フォーマット A」）と呼ばれ、本明細書で「Fc-Fab」フォーマットと呼ばれることがある、このタイプの ABM の 2 つの実施形態は、図 1 B および図 2 B、ならびに図 13 A、図 13 B、および図 13 C に示されるそれらの変形において例示される。したがって、本開示は、

- ・ N から C 末端配向で

50

ー ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン(3)、

ー CH₂ドメイン(4)およびCH₃ドメイン(5)を含むFcドメイン、

ー ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン(3)、

ー リンカー(8)、ならびに

ー Fab1ドメインの軽鎖成分に会合したFab1 VHドメイン(1)およびFab1 CH1ドメイン(2)を含むFab1ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab1 VLドメイン(6)およびFab1 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分を含む、第1のポリペプチドと、

・ NからC末端配向で

ー ジスルフィド結合を介して第1のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン(3)、

ー CH₂ドメイン(4)およびCH₃ドメイン(5)を含む第2のFcドメイン、

ー ジスルフィド結合を介して第1のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン(3)、

ー リンカー(8)、ならびに

ー Fab2ドメインの軽鎖成分に会合したFab2 VHドメイン(1)およびFab2 CH1ドメイン(2)を含むFab2ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab2 VLドメイン(6)およびFab2 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分を含む、第2のポリペプチドと、を含み、

第1のFcドメインおよび第2のFcドメインが、互いに会合してFc領域を形成する、図1Bおよび図2Bに示されるフォーマットA ABMを提供する。

【0013】

図1Bの実施形態では、両方の半抗体は、同一であり、Fcホモダイマーを形成するFcドメインを含み、得られるABMは、単一特異性である。図2Bの実施形態では、ABMは、Fcヘテロダイマーを含み、異なるFab1およびFab2 VHドメインの使用、ならびに多重特異性、例えば、二重特異性、分子の産生を可能にする。図1B、図2B、および13Aは、ABMがFcドメインのN末端にあるヒンジドメインで構成されるヒンジ領域を有する実施形態を示すが、フォーマットA ABMは、ヒンジ領域(図示せず)、Fc領域のC末端にあるヒンジ領域(図13C)、またはFc領域のN末端およびC末端にあるヒンジ領域(図13B)を有することができない。Fc領域のN末端および/またはC末端にある使用することができる例示的なヒンジドメインは、図13A~13Cに示されるように、アミノ酸配列GGGGSCPPC(配列番号1)およびESKYGP PCPPC(配列番号2)を含むが、フォーマットA ABMは、代替のヒンジ領域配列を有することができる。同様に、図13A~13Cは、(G4S)_nリンカーを示す(G4Sは配列番号3として開示される)が、他のリンカー配列を使用することができる。

【0014】

図1Bおよび図2Bは、2つの結合ドメイン(Fab1およびFab2)のみを含有するフォーマットA ABMの実施形態を示すが、本開示のABMは、追加の結合ドメイン、例えば、scFvまたはFabドメインを含有し得る。しかしながら、特定の態様では、Fab1およびFab2は、フォーマットA ABMの単独の結合ドメインである。

【0015】

第2の態様では、本開示のABMは、

・ NからC末端配向で

ー 第1のVLに会合した第1のVHを含む第1のFab(Fab1)ドメイン、

ー 第1のスペーサドメイン、および

ー 第1のFcドメインを含む、第1の半抗体と、

・ NからC末端配向で

ー 第2のVLに会合した第2のVHを含む第2のFab(Fab2)ドメイン、

10

20

30

40

50

ー第2のスペーサドメイン、および

ー第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含み、

第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、互いに会合してFc領域を形成する。

【0016】

理論によって拘束されることなく、FcドメインとFabドメインとの間にスペーサドメインを含めることは、Fc領域とFabの抗原結合部位との間のより大きな可撓性、ならびに結果として、ABMのその抗原または標的分子への結合のより高い親和性および／または親和力をもたらすと考えられる。「抗原」および「標的分子」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

【0017】

特定の実施形態では、スペーサドメインは、伸長リンカーである。本明細書では一般にフォーマット「B」（「フォーマットB」）と呼ばれ、本明細書では「リーチ」フォーマットと呼ばれることがある、このABMのフォーマットは、図3Aに例示される。したがって、本開示は、

・NからC末端配向で

ーFab1ドメインの軽鎖成分に会合したFab1 VHドメイン（1）およびFab1 CH1ドメイン（2）を含むFab1ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab1 VLドメイン（6）およびFab1 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分、

ー伸長リンカーであるリンカードメイン（8）、

ージスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、ならびに

ーCH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含む第1のFcドメインを含む、第1のポリペプチドと、

・NからC末端配向で

ーFab2ドメインの軽鎖成分に会合したFab2 VHドメイン（1）およびFab2 CH1ドメイン（2）を含むFab2ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab2 VLドメイン（6）およびFab2 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分、

ー伸長リンカーであるリンカードメイン（8）、

ージスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、ならびに

ーCH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含む第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含む、図3Aに示される実施形態フォーマットB ABMを提供する。

【0018】

図3Aに示されるフォーマットB ABMの実施形態は、2つの結合ドメイン（Fab1およびFab2）のみを含有するが、本開示のフォーマットB ABMは、追加の結合ドメイン、例えば、scFvまたはFabドメインを含有し得る。しかしながら、特定の態様では、Fab1およびFab2は、本開示のフォーマットB ABMの単独の結合ドメインである。

【0019】

他の実施形態では、スペーサドメインは、Fabドメインである。本明細書ではフォーマット「C」（「フォーマットC」）と呼ばれる、このフォーマットのABMの異なる変形は、図3B～3Dに例示される。フォーマットC ABMは、よって、次のように構成される、第3のFab（Fab3）ドメインおよび第4のFab（Fab4）ドメインを含む：

・NからC末端配向で

ー第1のVLに会合した第1のVHを含む第1のFab（Fab1）ドメイン、

ー第3のVLに会合した第3のVHを含む第3のFab（Fab3）ドメイン、および

10

20

30

40

50

- －第1のFcドメインを含む、第1の半抗体、ならびに
- ・NからC末端配向で
 - －第2のVLに会合した第2のVHを含む第2のFab (Fab2) ドメイン、
 - －第4のVLに会合した第4のVHを含む第4のFab (Fab4) ドメイン、および
 - －第2のFcドメインを含む、第2の半抗体。

【0020】

したがって、本開示は、

- ・NからC末端配向で
 - －Fab1ドメインの軽鎖成分に会合したFab1 VHドメイン(1)およびFab1 CH1ドメイン(2)を含むFab1ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab1 VLドメイン(6)およびFab1 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分、

10

－リンカードメイン(8)、

- －Fab3ドメインの軽鎖成分に会合したFab3 VHドメイン(1)およびFab3 CH1ドメイン(2)を含むFab3ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab3 VLドメイン(6)およびFab3 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分、

－ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン(3)、ならびに

－CH2ドメイン(4)およびCH3ドメイン(5)を含む第1のFcドメインを含む、第1のポリペプチドと、

20

- ・NからC末端配向で

- －Fab2ドメインの軽鎖成分に会合したFab2 VHドメイン(1)およびFab2 CH1ドメイン(2)を含むFab2ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab2 VLドメイン(6)およびFab2 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分、

－リンカードメイン(8)、

- －Fab4ドメインの軽鎖成分に会合したFab4 VHドメイン(1)およびFab4 CH1ドメイン(2)を含むFab4ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab4 VLドメイン(6)およびFab4 CLドメイン(7)を含む、重鎖成分、

30

－ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン(3)、ならびに

－CH2ドメイン(4)およびCH3ドメイン(5)を含む第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含み、第1のFcドメインおよび第2のFcドメインが互いに会合してFc領域を形成する、図3B～3Dに示される実施形態フォーマットC ABMを提供する。

【0021】

図3B～3Dに示されるフォーマットC ABMの実施形態は、4つの結合ドメイン(Fab1、Fab2、Fab3、およびFab4)を含有するが、本開示のフォーマットC ABMは、追加の結合ドメイン、例えば、scFvまたはFabドメインを含有し得る。しかしながら、特定の態様では、Fab1、Fab2、Fab3、およびFab4は、本開示のフォーマットC ABMの単独の結合ドメインである。

40

【0022】

フォーマットC ABMのFab3およびFab4ドメインは、非結合性(図3Bに示されるように)または結合性(図3Cおよび図3Dに示されるように)であり得る。Fab3およびFab4が非結合性であるそれらの実施形態は、一般に、本明細書ではフォーマットC1 ABMと呼ばれ、このフォーマットは、本明細書では「クランプ」フォーマットと呼ばれることがある。Fab3およびFab4が結合性であるそれらの実施形態は、一般に、本明細書ではフォーマットC2 ABMと呼ばれ、このフォーマットは、本明

50

細書では「タンデム F a b」フォーマットと呼ばれることがある。「2 + 2 タンデム F a b」という用語は、図 3 C および 3 D に示される実施形態を指し、F a b 1、F a b 2、F a b 3、および F a b 4 は、タンデム F a b における単独の結合ドメインである。フォーマット C 1 およびフォーマット C 2 A B M の各々は、ホモダイマーまたはヘテロダイマーであり得る。

【0023】

フォーマット C 1 A B M の特定の実施形態では、F a b 1 および F a b 2 ドメインは、非同一であり（例えば、同じ標的分子上または異なる標的分子上にかかわらず、異なるエピトープに結合し）、F a b 3 および F a b 4 ドメインは、同一の非結合ドメインである。他の実施形態では、F a b 3 および F a b 4 ドメインは、異なる非結合ドメインである。

10

【0024】

フォーマット C 2 A B M の特定の実施形態では、図 3 C に示されるように、F a b 1 および F a b 3 ドメインは、同一の V H ドメインを含み、F a b 2 および F a b 4 ドメインは、同一の V H ドメインを含む。この構成は、構成 1、または 1-1-2-2 構成と呼ばれる。フォーマット C 2 A B M の代替の実施形態では、図 3 D に示されるように、F a b 1 および F a b 2 ドメインは、同一の V H ドメインを含み、F a b 3 および F a b 4 ドメインは、同一の V H ドメインを含む。この構成は、構成 2、または 1-2-1-2 構成と呼ばれる。

【0025】

20

完全 A B M は、F c 領域を形成する 2 つの F c ドメインを通した 2 つの半抗体の会合によって形成される。2 つの半抗体が非同一である場合、例えば、F a b 1 および F a b 2 が異なる V H ドメインを含む場合、例えば、セクション 6. 2. 7. 2 に記載されるような、F c ヘテロダイマー化アプローチを利用して、正しい半抗体対形成および／またはそれらの精製を促進することができる。ヘテロダイマー化アプローチの例は、星型変異 (star mutation) (セクション 6. 2. 7. 2 に記載) またはノブインホール変異である。

【0026】

図 2 B、3 A、3 B、および 3 C は、F c ヘテロダイマーによって対形成された各半抗体において非同一の V H ドメインを含む A B M を示すが、このフォーマットは、F c ホモダイマーにも使用することができる。例えば、図 2 B および図 3 A は、それぞれ、F c ヘテロダイマーを含むフォーマット A A B M およびフォーマット B A B M を示すが、F a b 1 および F a b 2 における異なる V H ドメインの組み込み、ならびに多重特異性、例えば、二重特異性の結合分子の産生を可能にし、このフォーマットは、F c ホモダイマーおよび同一の V H ドメインを有する単一特異性フォーマット A およびフォーマット B A B M にも使用することができる。同様に、F c ホモダイマーを使用して、同一の F a b 1、F a b 2、F a b 3、および F a b 4 V H ドメイン、または同一の F a b 1 および F a b 2 V H ドメイン、ならびに非結合 F a b 3 および F a b 4 V H ドメインを有する、単一特異性フォーマット C A B M を産生することができる。

30

【0027】

40

さらに、第 1 および第 2 のポリペプチドが、異なる V H ドメインを含む場合、異なる戦略を使用して、多重特異性結合分子における正しい V H-V L 対形成を可能にすることができる。例えば、A B M における 2 つ以上のタイプの V H ドメインと作動可能に対形成することができる共通の軽鎖を使用することができる。そのような実施形態では、軽鎖ポリペプチド（例えば、F a b 1 および F a b 2、ならびに存在する場合、F a b 3 および F a b 4 に会合した軽鎖）は、同一であり得る。あるいは、重鎖成分（(1) および (2)）が、軽鎖成分（(6) および (7)）との融合体として発現され得る、単一ドメイン F a b を使用することができる。

【0028】

図 1 ~ 3 に示される本開示の A B M の変形は、限定することを意図するものではなく、

50

本開示の A B M は、とりわけ、図 1 ～ 3 および以下のセクション 6 . 2 に示される修飾の任意の組み合わせを含むことができる。さらに、第 1 もしくは第 2 のポリペプチド鎖または左もしくは右半抗体を参照することは、便宜のためのみであり、ポリペプチド鎖または半抗体が任意の特定の順序で産生されるか、または組み立てられることを伝えることを意図するものではない。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、本開示の A B M の第 1 の F a b (F a b 1) ドメインおよび第 2 の F a b (F a b 2) ドメインは、各々同じ標的分子、例えば、小可溶性分子に結合することができる。第 1 の F a b (F a b 1) ドメインおよび第 2 の F a b (F a b 2) ドメインは、同じエピトープに結合することができる (例えば、両方の F a b 1 および F a b 2 が同一の V H ドメイン (図示せず) を有する、図 1 B および図 3 D に示される実施形態、または図 3 A もしくは図 3 B の変形) か、またはそれらは、同じ標的分子上または異なる標的分子上にかかわらず、異なるエピトープに結合することができる (例えば、図 2 B、図 3 A、図 3 B、および図 3 C に示される実施形態)。第 1 の F a b (F a b 1) ドメインおよび第 2 の F a b (F a b 2) ドメインが、異なるエピトープ、例えば、同じ標的分子上または異なる標的分子上の 2 つの異なるエピトープに結合する場合、それらは、F a b がそれらのエピトープに同時に結合することができるように選択され得る。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、例えば、フォーマット C A B M について、本開示の A B M は、図 3 B、図 3 C、および図 3 D に示されるように、第 3 の F a b (F a b 3) ドメインおよび第 4 の F a b (F a b 4) ドメインを含むことができる。第 3 および第 4 の F a b ドメインは、図 3 B に示されるように、非結合性であり得るか、または図 3 C および図 3 D に示されるように、結合性であり得る。F a b 3 および F a b 4 が存在する場合、それらは、それぞれ、F a b 1 および F a b 2 ドメインによって結合されるエピトープと同じまたは異なるエピトープに結合することができる。例えば、図 3 C の実施形態に示されるように、F a b 1 および F a b 3 は、エピトープを共有することができ、F a b 2 および F a b 4 は、エピトープを共有することができる。あるいは、例えば、図 3 D の実施形態に示されるように、F a b 1 および F a b 2 は、エピトープを共有することができ、F a b 3 および F a b 4 は、エピトープを共有することができる。本明細書で使用される場合、フォーマット C A B M に関して、「第 1 および第 2 の F a b ドメイン」ならびに「F a b 1 および F a b 2 ドメイン」という用語は、典型的には、最も N 末端の F a b ドメインを指し、「第 3 および第 4 の F a b ドメイン」ならびに「F a b 3 および F a b 4 ドメイン」への参照は、典型的には、内部 F a b ドメインを指す。

【 0 0 3 1 】

それらの成分および構成を含む、本開示の例示的な抗原結合分子、ならびにそれらの標的分子は、以下のセクション 6 . 2 および 6 . 3、ならびに「A」具体的な実施形態 1 ～ 1 3 8 および「B」具体的な実施形態 1 ～ 7 2 に記載される。

【 0 0 3 2 】

本開示はさらに、本開示の A B M を含むコンジュゲート、例えば、薬物コンジュゲート (便宜上、本明細書では「抗体-薬物コンジュゲート」または「A D C」と呼ばれる薬物コンジュゲート) を提供する。コンジュゲートの例示的な特徴は、以下の「A」具体的な実施形態 1 3 9 および「B」具体的な実施形態 7 3 と同様に、セクション 6 . 4 に記載される。

【 0 0 3 3 】

本開示はさらに、本開示の A B M をコードする核酸を提供する。A B M をコードする核酸は、単一の核酸 (例えば、A B M のすべてのポリペプチド鎖をコードするベクター) または複数の核酸 (例えば、A B M の異なるポリペプチド鎖をコードする 2 つ以上のベクター) であり得る。本開示はさらに、本開示の核酸および A B M を発現するように操作された宿主細胞および細胞株を提供する。本開示はさらに、本開示の A B M を産生する方法を提供する。例示的な核酸、宿主細胞、細胞株、および A B M を産生する方法は、以下のセ

10

20

30

40

50

クション 6. 5、「A」具体的な実施形態 1 4 4～1 4 5、および「B」具体的な実施形態 7 5～8 1 に記載される。

【0 0 3 4】

本開示はさらに、本開示の A B M および A D C を含む薬学的組成物を提供する。例示的な薬学的組成物は、以下のセクション 6. 6、「A」具体的な実施形態 1 4 0、および「B」具体的な実施形態 7 4 に記載される。

【0 0 3 5】

例えば、それらが結合する標的分子の異常な発現または活性に関連した状態を治療するために、本開示の A B M、コンジュゲート、および薬学的組成物を使用する方法が、本明細書でさらに提供される。例示的な方法は、以下のセクション 6. 7、「A」具体的な実施形態 1 4 1～1 4 3 および「B」具体的な実施形態 8 2～8 5 に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0 0 3 6】

5. 図面の簡単な説明

【図 1 A】本開示の例示的なホモダイマー（単一特異性二価）フォーマット A A B M（図 1 B）および対応する天然抗体フォーマット（図 1 A）の概略図である。図凡例：（1）= V H、（2）= C H 1、（3）= ヒンジ、（4）= C H 2、（5）= C H 3、（6）= V L、（7）= C L、（8）= リンカー。

【図 1 B】同上。

【図 2 A】本開示のヘテロダイマー二重特異性フォーマット A A B M（図 2 B）および対応する従来の二重特異性抗体フォーマット（図 2 A）の概略図である。低分子抗原（A g）は、二重特異性 A B M が低分子抗原と相互作用し得る潜在的な方法を示すことが示される。図凡例：（1）= V H、（2）= C H 1、（3）= ヒンジ、（4）= C H 2、（5）= C H 3、（6）= V L、（7）= C L、（8）= リンカー。C H 3 ドメインのうちの 1 つにあるアスタリスクは、2 つの C H 3 が同一ではなく、ヘテロダイマー化を可能にする 1 つ以上の変異（例えば、ノブインホール変異、星型変異など）を含有することを示す。

【図 2 B】同上。

【図 3 A】本開示の例示的なフォーマット B A B M（図 3 A）および本開示の例示的なフォーマット C A B M（図 3 B～3 D）の概略図である。示されるフォーマット C A B M の特定の実施形態は、例示的なヘテロダイマーフォーマット C 1 A B M（図 3 B）、例示的なヘテロダイマーフォーマット C 2 A B M（図 3 C）、および例示的なホモダイマーフォーマット C 2 A B M（図 3 D）である。いくつかの実施形態では、これらの二重特異性 A B M は、共通の軽鎖 V L－C L を使用する。すべてのフォーマットのいくつかの実施形態では、V H 1－C H 1／V L－C L および V H 2－C H 1／V L－C L は、非競合性 m A b から抗原までの F a b フラグメントである。図 3 B に示されるフォーマット（本明細書では「クランプ」フォーマットと呼ばれることがある）では、内部 F a b フラグメント V H 3－C H 1／V L－C L は、標的分子に結合しない。図 3 A に示されるフォーマット（本明細書では「リーチ」フォーマットと呼ばれることがある）では、内部 F a b は、可撓性の長いリンカーで置き換えられる。図凡例：（1）= V H、（2）= C H 1、（3）= ヒンジ、（4）= C H 2、（5）= C H 3、（6）= V L、（7）= C L、（8）= リンカー。C H 3 ドメインのうちの 1 つにあるアスタリスクは、2 つの C H 3 が同一ではなく、ヘテロダイマー化を可能にする 1 つ以上の変異（例えば、ノブインホール変異、星型変異など）を含有することを示す。

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 3 D】同上。

【図 4 A】T S L P 遮断バイオアッセイにおける T S L P 親 A b の活性を示すグラフである。図 4 A、h I L 7 R および h T S L P R の両方を発現する B a f 3 細胞を使用した S T A T 3 ールシフェラーゼレポーターアッセイにおける h T S L P の用量応答曲線。図 4 B、T S L P 遮断バイオアッセイにおける選択された T S L P A b の活性。T S L P A

10

20

30

40

50

bは、100 pMの定常hTSLPの存在下で、Baf3/hIL7R/hTSLPR/STAT3-ルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、5.5時間のインキュベーション後に測定した。

【図4B】同上。

【図5】抗hTSLP二重特異性IgG4 Abが、対応する親Ab組み合わせと同様のTSLP遮断活性を示したことを示すグラフである。抗hTSLP親Ab組み合わせおよび二重特異性IgG4 Abを、hTSLP遮断バイオアッセイにおいてそれらの活性について比較した。TSLP Abは、100 pMのhTSLPの存在下で、Baf3/hIL7R/hTSLPR/STAT3-ルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、5.5時間のインキュベーション後に測定した。

10

【図6A】TSLP遮断バイオアッセイにおいて異なるフォーマット二重特異性抗hTSLP Abを比較したグラフである。いくつかの親Ab対形成を試験した：30206 x 30217（図6A）、30206 x 30230（図6B）、30217 x 30230（図6C）。TSLP Abは、100 pMのhTSLPの存在下で、Baf3/hIL7R/hTSLPR/STAT3-ルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、5.5時間のインキュベーション後に測定した。図6A～6Cに開示される「2 x G4S」および「4 x G4S」は、それぞれ、配列番号18および配列番号19である。

【図6B】同上。

【図6C】同上。

20

【図7】hTSLP（REGN4009）の存在下での個々の親mAbのフラクトグラムを示すグラフである。抗TSLP mAb：hTSLP複合体（実線）は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画（A4F-MALS）によって分析した。H4H30217P2（灰色の破線）およびhTSLP（黒色の破線）の個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215 nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。

【図8】hTSLPの存在下での親mAb組み合わせのフラクトグラムを示すグラフである。抗TSLP mAb組み合わせ：hTSLP複合体（実線）は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画（A4F-MALS）によって分析した。H4H30217P2（灰色の破線）およびhTSLP（黒色の破線）、ならびにH4H30217P2：hTSLP複合体（黒色の点線）の個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215 nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。

30

【図9】hTSLPの存在下でのFc-Fab二重特異性Abのフラクトグラムを示すグラフである。抗TSLP Fc-Fab：hTSLP複合体（実線）は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画（A4F-MALS）によって分析した。TS-FC1-eL1（黒色の点線）、TS-FC6-eL2（灰色の点線）、およびhTSLP（黒色の破線）の個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215 nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。

40

【図10】hTSLPの存在下でのクランプ二重特異性Abのフラクトグラムを示すグラフである。抗TSLPクランプ：hTSLP複合体（実線）は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画（A4F-MALS）によって分析した。TS-CL4-eL1（黒色の点線）、TS-CL6-eL1（灰色の点線）、およびhTSLP（黒色の破線）の個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215 nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。

【図11】hTSLPの存在下での2+2タンデムFab二重特異性Abのフラクトグラムを示すグラフである。抗TSLP 2+2タンデムFab：hTSLP複合体（実線）は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画（A4F-MALS）によって分析

50

した。TS-CL2-eL2（黒色の点線）、TS-CL3-eL2（灰色の点線）、およびhTSLP（黒色の破線）の個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。

【図12】TSLP遮断バイオアッセイにおける異なるリンカー長を有する抗hTSLP 30217x30230二重特異性Fc-Fabの活性を比較したグラフである。TSLP Abは、120pMの定常hTSLPの存在下で、Baf3/hIL7R/hTSLPR/STAT3-ルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、5.5時間のインキュベーション後に測定した。すべての値は、TSLP遮断Abの不在下でのSTAT3-ルシフェラーゼ活性に対して正規化され、STAT3-Luc活性のパーセンテージとして表された。図12に開示されるG4S、(G4S)₂、(G4S)₃、(G4S)₄、(G4S)₅、および(G4S)₆リンカーは、それぞれ、配列番号3、18、4、19、39、および38である。

【図13A】図13A~13Cは、異なるヒンジフォーマットの概略図である。図13A：ヒンジ配列ESKYGPPCPPC（配列番号2）および(G4S)_nリンカー（G4Sは配列番号3として開示される）で示される、ヒンジフォーマット1、図13B：ヒンジ配列ESKYGPPCPPC（配列番号2）および(G4S)_nリンカー（G4Sは配列番号3として開示される）で示される、ヒンジフォーマット2、図13C：ヒンジ配列GGGGSCPPC（配列番号1）および(G4S)_nリンカー（G4Sは配列番号3として開示される）で示される、ヒンジフォーマット3。図13Dは、異なるヒンジフォーマット（G4Sリンカー（配列番号3）を有するヒンジフォーマット1、G4Sリンカー（配列番号3）を有するヒンジフォーマット2、G4Sリンカー（配列番号3）を有するヒンジフォーマット3、(G4S)₄リンカー（配列番号19）を有するヒンジフォーマット1、(G4S)₄リンカー（配列番号19）を有するヒンジフォーマット2、および(G4S)₄リンカー（配列番号19）を有するヒンジフォーマット3）を有する30217x30230 Fc-Fabの活性を示すグラフである。TSLP Abは、120pMのhTSLPの存在下で、Baf3/hIL7R/hTSLPR/STAT3-ルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、5.5時間のインキュベーション後に測定した。すべての値は、TSLP遮断Abの不在下でのSTAT3-ルシフェラーゼ活性に対して正規化され、STAT3-Luc活性のパーセンテージとして表された。

【図13B】同上。

【図13C】同上。

【図13D】同上。

【図14】WTマウスにおける抗TSLP二重特異性Fc-Fab分子REGN8759およびREGN8760、hIgG4アイソタイプ対照REGN1945、従来のhIgG4二重特異性アイソタイプ対照H4H21237D、およびhFcγホモダイマーREGN1627のモル当量の薬物動態プロファイルを示す。

【図15】WTマウスにおける抗TSLP Fc-Fab抗体REGN8759およびREGN8760、hIgG4アイソタイプ対照REGN1945、従来のhIgG4二重特異性アイソタイプ対照H4H21237D、およびhFcγホモダイマーREGN1627のモル当量の薬物動態プロファイルを示す。

【図16A】リガンドXシグナル伝達バイオアッセイにおける抗リガンドX親mAb mAbX1、mAbX2、および二重特異性Fc-Fab mAbX1 x mAbX2の阻害活性を比較したグラフである。抗リガンドX Abを、10pM（図16A）、100pM（図16B）、または1nM（図16C）の定常ヒトリリガンドXの存在下で受容体Xシグナル伝達のために操作されたルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を5.5時間のインキュベーション後に測定した。

【図16B】同上。

【図16C】同上。

【図17A】リガンドXシグナル伝達バイオアッセイにおける抗リガンドX親mAb mAb X2、mAb X3、および二重特異性Fc-Fab mAb X2 x mAb X3の阻害活性を比較したグラフである。抗リガンドX Abを、10 pM (図17A)、100 pM (図17B)、または1 nM (図17C)の定常ヒトリリガンドXの存在下で受容体Xシグナル伝達のために操作されたルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を5.5時間のインキュベーション後に測定した。

【図17B】同上。

【図17C】同上。

【図18A】リガンドXシグナル伝達バイオアッセイにおける抗リガンドX親mAb mAb X1、mAb X3、および二重特異性Fc-Fab mAb X1 x mAb X3の阻害活性を比較したグラフである。抗リガンドX Abを、10 pM (図18A)、100 pM (図18B)、または1 nM (図18C)の定常ヒトリリガンドXの存在下で受容体Xシグナル伝達のために操作されたルシフェラーゼレポーター細胞株とインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を5.5時間のインキュベーション後に測定した。

【図18B】同上。

【図18C】同上。

【図19A】リガンドXおよび抗リガンドX抗体の複合体のフラクトグラムを示すグラフである。リガンドXと組み合わせた抗リガンドX抗体は、多角度光散乱と組み合わされた非対称流場流分画(A4F-MALS)によって分析した。抗体およびリガンドXの個々の試料からのフラクトグラムもオーバーレイされる。保持時間の関数としての215 nmでの相対UV吸光度が各試料について示され、分解されたピークの測定されたモル質量が示される。図19Aおよび19Bは、親抗体mAb X1、mAb X2、およびリガンドXのフラクトグラムを示し、図19Cは、mAb X1 x mAb X2 Fc-FabおよびリガンドXのフラクトグラムを示し、図19Dは、mAb X1 x mAb X2 クランプおよびリガンドXのフラクトグラムを示し、図19Eは、mAb X1 x mAb X2 2+2 タンデムFabヘテロダイマーおよびリガンドXのフラクトグラムを示す。

【図19B】同上。

【図19C】同上。

【図19D】同上。

【図19E】同上。

【図20A】FACSベースのアッセイにおいて測定される、抗原Y発現細胞への抗原Y Fc-Fabの結合を示すグラフである。図20A、抗抗原Y IgG1 mAb mAb Y1は、異なる長さのG4Sリンカーを有するIgG1 Fc-Fabとしてクローン化された(G4Sは配列番号3として開示される)。Fc-Fabおよび親IgG1 mAbは、細胞表面抗原Yへの同様の結合を示した。図20B、20C、20D、抗抗原Y IgG4 mAb mAb Y2、mAb Y3、およびmAb Y4は、異なるG4Sリンカーを有するIgG4 Fc-Fabとしてクローン化された(G4Sは配列番号3として開示される)。すべてのFc-Fabは、抗原Y FACS結合アッセイにおいて強い活性を示した。図20A~20Dに開示される「1xG4S」、「2xG4S」、「3xG4S」、「4xG4S」、および「5xG4S」は、それぞれ、配列番号3、18、4、19、および39である。

【図20B】同上。

【図20C】同上。

【図20D】同上。

【図21A】FACSベースのアッセイにおける抗CD3および抗抗原Z Fc-Fabの細胞表面エピトープへの結合を示すグラフである。抗CD3 (図21A) および抗抗原Z (図21B) Abは、異なる長さのG4Sリンカー(G4Sは配列番号3として開示される)を有するIgG1 Fc-Fabとしてクローン化された。これらのFc-Fabは、細胞表面CD3 (図21A) および抗原Z (図21B) への特異的結合を示した。図21A~21Bに開示される「1xG4S」、「2xG4S」、「3xG4S」、「4x

G 4 S」、および「5 x G 4 S」は、それぞれ、配列番号 3、18、4、19、および 39 である。

【図 21B】 同上。

【図 22A】 CD3 x 抗原 Z 二重特異性 Fc-Fab がバイオアッセイにおいて活性であったことを示すグラフである。図 22A、CD3 x 抗原 Z 二重特異性 Fc-Fab は、抗原 Z + 細胞の存在下で、Jurkat/NFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞において TCR シグナル伝達を活性化した。図 22B、CD3 x 抗原 Z 二重特異性 Fc-Fab は、3 時間のカルセイン放出アッセイにおいて、予め活性化されたヒトドナー T 細胞による抗原 Z + 細胞の殺滅を引き起こした。図 22A ~ 22B に開示される「1 x G 4 S」、「2 x G 4 S」、および「3 x G 4 S」は、それぞれ、配列番号 3、18、および 4 である。

10

【図 22B】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0037】

6. 発明を実施するための形態

6. 1. 定義

本明細書で使用される場合、以下の用語は、以下の意味を有することを意図している。

【0038】

抗体：本発明で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の抗原に特異的に結合するか、またはそれと相互作用する少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む、任意の抗原結合分子または分子複合体を意味する。「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された 4 つのポリペプチド鎖、2 つの重 (H) 鎖、および 2 つの軽 (L) 鎖を含む、従来のフォーマットの免疫グロブリン分子、ならびにそれらのマルチマー (例えば、IgM) を含む。各重鎖は、重鎖可変領域 (本明細書では HCVR または VH と略される) および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3 つのドメイン、CH1、CH2 および CH3 を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (本明細書では LCVR または VL と略される) および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1 つのドメイン (CL1) を含む。VH および VL 領域は、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化され得、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれるより保存された領域が点在する。各 VH および VL は、以下、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 の順にアミノ末端からカルボキシ末端に配置された 3 つの CDR および 4 つの FR から構成される。アミノ酸コンセンサス配列は、2 つ以上の CDR の並列分析に基づいて定義され得る。

20

30

【0039】

本明細書で使用される「抗体」という用語はまた、完全抗体分子の抗原結合フラグメントを含む。抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合フラグメント」および同様の用語は、本明細書で使用される場合、天然の、酵素処理で入手可能な、合成の、または遺伝子操作された、抗原を特異的に結合して複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗体結合フラグメントは、例えば、抗体可変ドメインおよび任意に定常ドメインをコードする DNA の操作および発現に関連するタンパク質消化技法または組換え遺伝子操作技法などの任意の適切な標準的技法を使用して、完全抗体分子から誘導され得る。そのような DNA は既知であり、かつ／または例えば市販の供給源、DNA ライブラリー (例えばファージ抗体ライブラリーを含む) から容易に入手可能であるか、または合成することができる。DNA は、例えば、1 つ以上の可変ドメインおよび／もしくは定常ドメインを好適な配置へと配置するか、またはコドンを導入し、システイン残基を作製し、アミノ酸を修飾、付加、もしくは欠失などするために、化学的に、または分子生物学技法を使用することによって配列決定および操作され得る。

40

【0040】

抗原結合フラグメントの非限定的な例としては、(i) Fab フラグメント、(ii) F(ab')₂ フラグメント、(iii) Fd フラグメント、(iv) Fv フラグメント、

50

(v) 単鎖 Fv (s c Fv) 分子、(v i) d A b フラグメント、および (v i i) 抗体の超可変領域（例えば、CDR3 ペプチドなどの単離された相補性決定領域 (CDR)）を模倣するアミノ酸残基、または拘束 FR3-CDR3-FR4 ペプチドからなる最小認識単位が挙げられる。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小型モジュール型免疫医薬品 (SMIP)、およびサメ可変 Ig NAR ドメインなどの他の操作された分子も、本明細書で使用する「抗原結合フラグメント」という表現に包含される。

【0041】

抗体の抗原結合フラグメントは、典型的には、少なくとも 1 つの可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成物であり得、概して、1 つ以上のフレームワーク配列に隣接しているかまたは 1 つ以上のフレームワーク配列とインフレームである少なくとも 1 つの CDR を含む。VL ドメインに会合した VH ドメインを有する抗体結合フラグメントにおいて、VH および VL ドメインは、任意の好適な配置で互いに対して配置され得る。例えば、可変領域は、ダイマーであり得、VH-VH、VH-VL、または VL-VL ダイマーを含有し得る。あるいは、抗体の抗原結合フラグメントは、モノマー VH または VL ドメインを含有し得る。

【0042】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも 1 つの定常ドメインに共有連結された少なくとも 1 つの可変ドメインを含有し得る。本開示の抗体の抗原結合フラグメント内に見られ得る可変および定常ドメインの非限定的、例示的な構成は、(i) VH-CH1、(i i) VH-CH2、(i i i) VH-CH3、(i v) VH-CH1-CH2、(v) VH-CH1-CH2-CH3、(v i) VH-CH2-CH3、(v i i) VH-CL、(v i i i) VL-CH1、(i x) VL-CH2、(x) VL-CH3、(x i) VL-CH1-CH2、(x i i) VL-CH1-CH2-CH3、(x i i i) VL-CH2-CH3、および (x i v) VL-CL を含む。上に列挙した例示的な構成のいずれかを含む、可変ドメインおよび定常ドメインの任意の構成において、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、または完全もしくは部分的ヒンジ領域もしくはリンカー領域によって連結されていてもよい。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子において隣接する可変ドメインおよび／または定常ドメイン間の可撓性または半可撓性連結をもたらす少なくとも 2 個（例えば、5、10、15、20、40、60 個以上）のアミノ酸からなり得る。さらに、本開示の抗体の抗原結合フラグメントは、互いとのおよび／または 1 つ以上のモノマー VH もしくは VL ドメインとの（例えば、ジスルフィド結合による）非共有会合において、上に列挙した可変および定常ドメイン構成のいずれかのホモダイマーまたはヘテロダイマー（または他のマルチマー）を含み得る。

【0043】

完全抗体分子と同様に、抗体結合フラグメントは、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多重特異性抗原結合フラグメントは、典型的には、少なくとも 2 つの異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは、別個の抗原にまたは同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示される例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む、任意の多重特異性抗体フォーマットは、当該技術分野で利用可能な通例の技法を使用して、本発明の抗体の抗原結合フラグメントの文脈における使用に適合され得る。

【0044】

抗原結合分子または ABM：本明細書で使用する「抗原結合分子」または「ABM」という用語は、2 つの半抗体を含む分子（例えば、複数のポリペプチド鎖のアセンブリ）を指す。典型的には、各半抗体は、少なくとも 1 つの抗原結合部位を含む。本開示の ABM は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であり得る。単一特異性結合分子の抗原結合部位は、すべて同じエピトープに結合するが、多重特異性結合分子は、同

10

20

30

40

50

じまたは異なる標的分子であり得る、異なるエピトープに結合する少なくとも2つの抗原結合部位を有する。

【0045】

会合：ABMの文脈における「会合」という用語は、2つ以上のポリペプチド鎖間の機能的関係を指す。特に、「会合」という用語は、抗原結合部位がそれらのそれぞれの標的に結合することができる機能的ABMを産生するために、例えば、分子相互作用を通して非共有結合的に、または1つ以上のジスルフィド架橋もしくは化学的架橋を通して共有結合的に、2つ以上のポリペプチドが互いに会合していることを意味する。本開示のABMに存在し得る会合の例は、Fc領域におけるホモダイマーまたはヘテロダイマーFcドメイン間の会合、FabドメインにおけるVHおよびVL領域間の会合、FabドメインにおけるCH1とCLとの間の会合、ならびにドメイン置換FabにおけるCH3とCH3との間の会合を含む（がこれらに限定されない）。

【0046】

二価：本明細書で使用される「二価」という用語は、2つの抗原結合部位を有するABMを指す。いくつかの実施形態では、2つの抗原結合部位は、同じ標的の同じエピトープに結合する。他の実施形態では、2つの抗原結合部位は、同じ標的分子または異なる標的分子にかかわらず、異なるエピトープに特異的に結合する。

【0047】

相補性決定領域またはCDR：本明細書で使用される「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、抗原特異性および結合親和性を付与する抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。一般に、各重鎖可変領域には3つのCDR（CDR-H1、CDR-H2、HCDR-H3）があり、各軽鎖可変領域には3つのCDR（CDR1-L1、CDR-L2、CDR-L3）がある。CDRの境界を特定するために使用することができる例示的な規則には、例えば、Kabat定義、Chothia定義、ABS定義、およびIMGT定義が含まれる。例えば、Kabat, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Kabat番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948 (Chothia番号付けスキーム)、Martin et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (ABS番号付けスキーム)、およびLefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 (IMGT番号付けスキーム)を参照されたい。抗体内のCDR配列を特定するために公開データベースも利用可能である。

【0048】

サイトカイン：「サイトカイン」という用語は、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、および腫瘍壊死因子を含む、細胞シグナル伝達活性を有する低分子量細胞外ポリペプチド／糖タンパク質の群のメンバーを指す。サイトカインは、免疫応答（例えば、細胞および他のサイトカインの活性、分化、増殖、および産生）の調節に関与し、典型的には、免疫細胞によって、主にT細胞、好中球、およびマクロファージによって合成されるが、非免疫細胞によっても合成され得る。サイトカインは、モノマー、ダイマー（ホモダイマーおよびヘテロダイマー両方）、トリマー（ホモトリマーを含む）、およびテトラマー（ホモテトラマーを含む）として存在する。サイトカインは、約5~70 kDaの分子量の範囲であるが、大部分は、約5~約20 kDaの範囲である。多くのサイトカインは、4- α -ヘリックスバンドル構造を共有する。他のサイトカインは、システイン残基の対から形成された3つのジスルフィド架橋を含有する、システインノットによって特徴付けられる。さらなるサイトカインは、ホモダイマーピラミッド構造によって特徴付けられ、これは細胞表面タンパク質に時々存在する特徴である。

【0049】

EC50：「EC50」という用語は、特定の曝露時間後にベースラインと最大値との間の中間で応答を誘導する、抗体またはABMの半最大有効濃度を指す。EC50は本質

10

20

30

40

50

的に、その最大効果の50%が観察される抗体またはABMの濃度を表す。特定の実施形態では、EC50値は、例えば、FACS結合アッセイによって決定されるように、抗体またはABMによって特異的に結合され得る標的分子を発現する細胞への半最大結合を与える抗体またはABMの濃度に等しい。よって、低減したまたは弱い結合は、増加したEC50、または半最大有効濃度値で観察される。本開示のABMのEC50値は、いくつかの実施形態では、約 10^{-5} M以下（例えば、 10^{-5} M未満、 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、または 10^{-9} M未満）のEC50値によって特徴付けることができる。

【0050】

エピトープ：「エピトープ」という用語は、パラトープとして既知の抗体または抗原結合分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一抗原または標的分子は、2つ以上のエピトープを有してもよい。よって、異なる抗体または抗原結合分子は、抗原または標的分子上の異なる領域に結合し得、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体配座または直鎖状のいずれかであり得る。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖における隣接するアミノ酸残基によって産生されるものである。特定の状況では、エピトープは、抗原または標的分子上の糖類、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

【0051】

Fab：本開示のABMの文脈における「Fab」という用語は、ポリペプチド鎖の対を指し、第1は、第1の定常ドメインのN末端にある抗体の可変重（VH）ドメイン（本明細書ではC1と呼ばれる）を含み、第2は、第1の定常ドメインと対形成することができる第2の定常ドメインのN末端にある抗体の可変軽（VL）ドメイン（本明細書ではC2と呼ばれる）を含む。天然免疫グロブリンでは、VHは、重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）のN末端であり、VLは、軽鎖（CL）の定常ドメインのN末端である。本開示のFabは、特に本開示のABMが非同一のFabを含む場合、天然配向に従って配置され得るか、または正しいVHおよびVL対形成を促進するドメイン置換もしくは交換を含み得る。例えば、FabにおけるCH1ドメインおよびCLドメインの対をCH3ドメインの対で置き換えて、ヘテロダイマーABMにおける正しい修飾Fab鎖対形成を促進することができる。CH1およびCLを逆にして、CH1をVLに付着させ、CLをVHに付着させることも可能であり、構成は、一般にCrossmaabとして知られる。あるいは、または加えて、置換または交換された定常ドメインの使用、正しい鎖対形成は、本開示のヘテロダイマーABMの両方の可変領域と対形成することができる普遍的な軽鎖の使用によって達成することができる。本開示のABMを記載する際に、C1ドメインは、本明細書の他の箇所ではCH1ドメインと呼ばれ、C2ドメインは、本明細書では、記載の各々についてCLドメインと呼ばれるが、ドメイン交換フォーマットも含まれることが意図される。操作されたFabの他の形態をセクション6.2.1に例示する。

【0052】

Fc：「Fc」という用語は、Fc受容体、例えば、FcγR、すなわち、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）、またはFcRn、すなわち、新生児Fc受容体に典型的に結合する少なくともCH2およびCH3ドメインを含む重鎖定常領域の一部分を指す。「Fc」という用語はまた、天然免疫グロブリンのFcとは異なる操作されたFcを包含する。例えば、CH2およびCH3領域は、欠失、置換、および／もしくは挿入、または任意のFc受容体に結合することができなくなるような他の修飾を含むように操作することができ、次いで、CH2およびCH3領域は、その典型的な生物学的機能に関して非機能的であるとみなされる。操作されたFcの他の形態をセクション6.2.7に例示する。

【0053】

FcドメインおよびFc領域：「Fcドメイン」という用語は、別の重鎖の対応する部分と対形成する重鎖の部分の一部分を指す。「Fc領域」という用語は、2つの重鎖Fcドメイン

10

20

30

40

50

の会合によって形成される抗体ベースの結合分子の領域を指す。Fc領域内の2つのFcドメインは、互いに同じであるか、または異なり得る。天然抗体では、Fcドメインは、典型的には、同一であるが、本開示のABMを産生する目的で、一方または両方のFcドメインは、ヘテロダイマー化を可能にするように有利に修飾され得る。

【0054】

半抗体：「半抗体」という用語は、少なくともFcドメインを含み、例えば、ジスルフィド架橋または分子相互作用（例えば、Fcヘテロダイマー間のノブインホール相互作用）を通して、Fcドメインを含む別の分子と会合することができる分子を指す。半抗体は、1つのポリペプチド鎖または2つ以上のポリペプチド鎖（例えば、重鎖および軽鎖）から構成され得る。

【0055】

重鎖：本明細書で使用される、「重鎖」または「免疫グロブリン（Ig）重鎖」という用語は、任意の生物からのIg重鎖定常領域配列を含み、特に明記されない限り、重鎖可変ドメインを含む。重鎖可変ドメインは、特に明記されない限り、3つの重鎖相補性決定領域（CDR）および4つのフレームワーク領域（FR）を含む。重鎖可変ドメインのフラグメントには、CDR、またはCDRおよびFRの両方が含まれる。典型的な重鎖定常領域（CH）は、可変ドメインに続いて、N末端からC末端まで、CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを有する（例えば、図1Aおよび2Aを参照されたい）。抗原結合分子および二重特異性重抗原結合分子に関して本明細書に開示されるような、非典型的な重鎖は、重鎖定常領域（CH）のいずれか2つの間の可変ドメイン（VH）、例えば、N末端からC末端まで、CH2ドメイン、CH3ドメイン、VHドメイン、およびCH2ドメインを有する（例えば、図1Bおよび図2Bを参照されたい）。一実施形態では、Fc部分は、少なくともCH2およびCH3ドメインを含む。

【0056】

ヒンジ：本明細書で使用される「ヒンジ」という用語は、CH1のC末端を免疫グロブリンのCH2ドメインのN末端に接続する連続したアミノ酸残基の領域を含むことを意図している。CH2エクソンによってコードされる、CH2ドメインのN末端のいくつかのアミノ酸も、「下部ヒンジ」の一部とみなされる。いずれの1つの理論によっても拘束されることなく、IgG1、IgG2、およびIgG4のヒンジ領域のアミノ酸は、異なるヒンジエクソンによってコードされる12～15個の連続したアミノ酸、および（CH2エクソンによってコードされる）CH2ドメインのいくつかのN末端アミノ酸を含むものとして特徴付けられている（Brekke et al., 1995, Immunology Today 16 (2) : 85-90）。一方、IgG3は、4つのセグメント：IgG1のヒンジ領域に似た1つの上部セグメント、およびIgG3に固有の同一のアミノ酸リピートである3つのセグメントからなるヒンジ領域を含む。

【0057】

宿主細胞：本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、本開示の核酸が導入された細胞を指す。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞、およびそのような細胞の子孫または潜在的な子孫を指すことが理解される。特定の修飾が、変異または環境の影響のいずれかによって次世代で発生し得るため、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。典型的な宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞などの、真核生物宿主細胞である。例示的な真核生物宿主細胞には、酵母および哺乳動物細胞、例えば、マウス、ラット、サル、またはヒト細胞株などの脊椎動物細胞、例えば、HKB11細胞、PER.C6細胞、HEK細胞、またはCHO細胞が含まれる。

【0058】

免疫グロブリン：「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、2対のポリペプチド鎖、1対の軽（L）鎖、および1対の重（H）鎖からなる構造的に関連する糖タンパク質のクラスを指し、これは4つすべてがジスルフィド結合によって相互接続され得る。免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリンの構造は、十分に特徴付けられている。例えば、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)) を参照されたい。各重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書ではVHまたはVHと略される）および重鎖定常領域（CHまたはCH）を含む。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。CH1ドメインおよびCH2ドメインは、ヒンジによって連結される。Fc部分は、少なくともCH2およびCH3ドメインを含む。

【0059】

典型的には、免疫グロブリンのアミノ酸残基の番号付けは、IMGT, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) に従うか、または例えば、Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991) に記載されるような、KabatのEU番号付けシステム（「EU番号付け」または「EUインデックス」としても知られる）による。

10

【0060】

アイソタイプ：「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラスまたはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）を指す。

20

【0061】

作動可能に連結：「作動可能に連結」という用語は、成分がそれらの意図された方法で機能することを可能にするように記載された成分の物理的または機能的並置を指す。ポリペプチドに関して、「作動可能に連結」という用語は、機能的ポリペプチドを産生するように2つ以上の領域が連結されているポリペプチド鎖の2つ以上の領域間の機能的関係を指すことができる。DNA発現ベクター構築物の文脈などにおける核酸に関して、「作動可能に連結」という用語は、例えば、制御配列、例えば、プロモーターまたはオペレーターが、制御配列がコード配列によってコードされるポリペプチドの産生を指示するように、コード配列に対する位置に適切に配置されることを指す。

30

【0062】

ポリペプチドおよびタンパク質：「タンパク質」という用語は、四次構造、三元構造、および少なくとも1つのポリペプチドから構成される他の複合体高分子を含むことを意味する。「タンパク質」という用語は、ポリペプチドを含む。

【0063】

「ポリペプチド」という用語は、隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間のペプチド結合によって一緒に結合されたアミノ酸の単一の直鎖状ポリマー鎖を指す。本開示のポリペプチドは、免疫グロブリンドメインに由来するアミノ酸配列を含む。指定されたタンパク質またはポリペプチドに「由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。

40

【0064】

「タンパク質」という用語はまた、1つまたは複数のポリペプチドから構成されるものなどの、大きなポリペプチドを説明するために使用され得る。

【0065】

単鎖Fab：本明細書で使用される「単鎖Fab」または「scFab」という用語は、抗体のVH、CH1、VL、およびCLドメインを含むポリペプチド鎖を指し、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。

【0066】

単鎖FvまたはscFv：本明細書で使用される「単鎖Fv」または「scFv」とい

50

用語は、抗体のVHおよびVLドメインを含むポリペプチド鎖を指し、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。

【0067】

特異的に（または選択的に）結合：本明細書で使用される「特異的に（または選択的に）結合」という用語は、そのABMまたは抗原結合部位（「ABS」）が、生理学的条件下で比較的安定な標的分子と複合体を形成することを意味する。特異的結合は、約 5×10^{-2} M以下（例えば、 5×10^{-2} M未満、 10^{-2} M未満、 5×10^{-3} M未満、 10^{-3} M未満、 5×10^{-4} M未満、 10^{-4} M未満、 5×10^{-5} M未満、 10^{-5} M未満、 5×10^{-6} M未満、 10^{-6} M未満、 5×10^{-7} M未満、 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-9} M未満、 10^{-9} M未満、または 10^{-10} M未満）のKDによって特徴付けることができる。抗体または抗体フラグメント、例えば、ABMまたはABSの標的分子への結合親和性を決定するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴（例えば、Biacoreアッセイ）、蛍光活性化細胞選別（FACS）結合アッセイなどを含む。1つの種からの標的分子に特異的に結合するABMまたはそのABS抗体は、しかしながら、1つ以上の他の種からの標的分子に対して交差反応性を有することができる。

【0068】

標的分子：本明細書で使用される「標的分子」という用語は、ABMの抗原結合部位によって特異的に結合することができる任意の生体分子（例えば、タンパク質、炭水化物、脂質、またはそれらの組み合わせ）を指す。例示的な標的分子は、これらに限定されないが、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRLI、ADORA2A、アグリカン、AGR2、AICDA、AIF1、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、AZGP1（亜鉛-a-糖タンパク質）、ART-4、B7、B7.1、B7.2、BAD、BAFF、BAGI、BAI1、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLRL（MDRLS）、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B（GDF10）、BMP4、BMP6、BMPS、BMPIR1A、BMPIR1B、BMPIR2、BPAG1（プレクチン）、BRCA1、Ba-733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-I、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CDS、CD8、CDI-IA、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、C19orf10（IL27w）、C3、C4A、CS、CSR1、CANT1、CASPI、CASP4、CAV1、CCBP2（D6/JAB61）、CCLI（I-309）、CCLII（エオタキシン）、CCL13（MCP-4）、CCLIS（MIP-1d）、CCL16（HCC-4）、CCL17（TARC）、CCLIS（PARC）、CCL19（MIP-3b）、CCL2（MCP-1）、MCAF、CCL20（MIP-3a）、CCL21（MIP-2）、SLC、エクソダス-2、CCL22（MDC/STC-1）、CCL23（MPIF-1）、CCL24（MPIF-2/エオタキシン-2）、CCL2S（TECK）、CCL26（エオタキシン-3）、CCL27（CTACK/ILC）、CCL2S、CCL3（MIP1a）、CCL4（MIP-1b）、CCLS（RANTES）、CCL7（MCP-3）、CCLS（mcp-2）、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1（CKR1/HM14S）、CCR2（mcp-1RB/RA）、CCR3（CKR3/CMKBR3）、CCR4、CCRS（CMKBRSI ChemR13）、CCR6（CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6）、CCR7（CKR7/E

B1)、CCRS (CMKBRS/TER1/CKR-LI)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRLI (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、CD164、CDLC、CD200、CD-22、CD24、CD2S、CD3S、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD44、CD4SRB、CD47、CD4S、CDS2、CD69、CD72、CD79A、CD79B、CDSO、CDS1、CDS3、CDS6、CD137、CD13S、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CDH1 (E-カドヘリン)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH1S、CDH19、CDH20、CDHS、CDH7、CDHS、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDKS、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A (p21 Wap1/Cip1)、CDKN1B (p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2A (p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSFS、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSFS、CLDN3、CLDN7 (クローディン-7)、CLN3、CLU (クラステリン)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CNR1、COLISA1、COLIA1、COL4A3、COL6A1、CR2、CRP、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (GCSF)、CTLA-4、CTNNB1 (b-カテニン)、CTSB (カテプシンB)、CX3CLI (SCYD1)、CX3CR1 (V2S)、CXCLI (GRO1)、CXCLIO (IP-10)、CXCL11 (I-TAC/IP-9)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2 (GRO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCLS (ENA-7S/LIX)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYBS、CYC1、CYSLTR1、HIF-1-a、結腸特異的抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAB2IP、DES、DKFZp4S1J011S、DNCLI、DPP4、DAM、EGFR、EGFRvLLI、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、EN01、EN02、EN03、EPHB4、EPO、EREG、ERKS、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FADD、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF1S、FGF19、FGF2 (bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGFS、FGF7 (KGF)、FGFS、FGF9、FGFR3、FIGF (VEGFD)、FIL1 (EPSILON)、FIL1 (ZETA)、FLJ12SS4、FLJ2SS30、FLRT1 (フィブロネクチン)、FOS、FOSLI (FRA-1)、FY (DARC)、Flt-I、Flt-3、葉酸塩受容体、G250抗原、GAGE、GROB、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDFS、GFil、GGTL、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44、GPRS1 (FKSGSO)、GRCC10 (C10)、GRP、GSN (ゲルソリン)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDACS、HDAC7A、HDAC9、HGF、HIP1ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HUMCYT2A、HLA-DR、HMI 24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素誘導因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2または1a、IGF-IR、

【数1】

IFN-γ、

10

20

30

40

50

IFN- α 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IL-1、IL-10、IL-10RA、IL-10RB、IL-11、IL-11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL-13RA1、IL-13RA2、IL-14、IL-1S、IL-1SRA、IL-16、IL-17、IL-17B、IL-17C、IL-17R、IL-18、IL-18BP、IL-18R1、IL-18RAP、IL-19、IL-1A、IL-1B、IL-1F10、IL-1FS、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1HY1、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAP、IL-1RAPL1、IL-1RAPL2、IL-1RL1、IL-1RL2、IL-1RN、IL-2、IL-20、IL-20RA、IL-21R、IL-22、IL-22R、IL-22RA2、IL-23、IL-24、IL-2S、IL-26、IL-27、IL-28A、IL-28B、IL-29、IL-2RA、IL-2RB、IL-2RG、IL-3、IL-30、IL-3RA、IL-4、IL-4R、IL-S、IL-5RA、IL-6、IL-6R、IL-6ST（糖タンパク質130）、IL-7、IL-7R、IL-S、IL-SRA、IL-SRB、IL-9、IL-9R、IL-K、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6（ α 6インテグリン）、ITGAV、ITGB3、ITGB4（ β 4インテグリン）インスリン様成長因子-I（IGF-1）、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN- α 、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNAS、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNW1、JAG1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KLF5（GC Box BP）、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK1S、KLK3、KLK4、KLKS、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19（ケラチン19）、KRT2A、KRTHB6（毛髪特異的タイプIIケラチン）、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、LAMAS、LEP（レプチン）、Lingo-p7S、Lingo-Troy、LPS、LTA（TNF- β ）、LTB、LTB4R（GPR16）、LTB4R2、LTBR、MACMARCKS、MAGまたはOmgp、MAP2K7（c-Jun）、MDK、MIB1、ミッドカイン、MIF、MIP-2、MKI67（Ki-67）、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3（メタロチオネクチン-III）、MTSS1、MUC1（ムチン）、MYC、MYD88、マクロファージ遊走阻害因子（MIF）、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ES0-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、NCK2、ニューロカン、NFKB1、NFKB2、NGFB（NGF）、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66（Noga）、NgRp7S、NgR-Troy、NME1（NM23A）、NOXS、NPPB、NROB1、NROB2、NR1D1、NR1D2、NRIH2、NRIH3、NRIH4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NRS1A1、NRS1A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NTSE、NTN4、ODZ1、OPRD1、PCSK9、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCNA、PD-1、PD-L1、アルファ4ベータ7、OX40、GITR、TIM-3、Lag-3、B7-H3、B7-H4、GDFS、CGRP、Lingo-I、第IXa因子、第X因子、ICOS、GARP、BTLA、CD160、RORI、2B4、KIR、CD27、OX40、A2aR、PDGFA、PDGFB、PECAM1、PF4（CXCL4）、PGF、PGR、ホスファカン、PIAS2、PIK3CG、PLAU（uPA）、PLG、PLXDC1、PPBP（CXCL7）、PPID、PR1、PR

10

20

30

40

50

KCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、膵臓がんムチン、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺性酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、10PIGF、ILGF、ILGF-IR、IL-6、RS5、RANTES、RAC2 (p21Rac2)、RARβ、RGS1、RGS13、RGS3、RNFL10 (ZNF144)、ROBO2、S100A2、SCGB1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A1 (マンマグロビン2)、SCGB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINB5 (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B (Sprl)、ST6GAL1、STAB1、STATE、STEAP、STEAP2、TIOI、SAGE、5100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL受容体、TNF-α、Tn-抗原、ThomsonFriedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1l1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIMP3、組織因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLRS、TLR6、TLR7、TLRS、TLR9、TNF、TNF-α、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSFS、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSFS、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSFS (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSFS (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-1BBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TPS3、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAPS、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-IA抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、CS、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、CD19/CD3、BCMA/CD3、EGFR、HER3、IL17RA/IL7R、IL-6/IL-23、IL1/IL-8、IL-6、IL-6R/IL-21、IL-21R、ANG2/VEGF、VEGF/PDGFR-ベータ、血管内皮成長因子 (VEGF) アクセプター2/CD3、PSMA/CD3、EPCAM/CD3、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、VEGFB、VEGFC、バーシカン、VHL CS、VLA-4、c-FMS/CSFIR、RET、HER3、HER4、IGFR、PDGFR、c-KIT、BCR、インテグリン、MMP VEGF、EGF、PIGF、PDGF、HGF、アンジオポエチン、ERBB-3/C-MET、ERBB-2/C-MET、EGF受容体1/CD3、EGFR/HER3、PSCA/CD3、C-MET/CD3、ENDOSIALIN/CD3、EPCAM/CD3、IGF-1R/CD3、FAPALPHA/CD3、EGFR/IGF-IR、IL25 17A/F、EGF受容体1/CD3、およびCD19/CD16、KHI、Tn-抗原、TF-抗原、CD44、糖脂質、スフィンゴ糖脂質、例えば、30 Gg3、Gb3、GD3、GD2、Gb5、Gm1、Gm2、シアリルテトラオシルセラミド、XCL1 (リンホタクチン)、XCL2 (SCM-1b)、XCR1 (GPRS/CCXCR1)、YY1、ならびにZFFPM2を含む。いくつかの実施形態では、標的分子は、小可溶性 (すなわち、膜結合されていない) 分子である。

【0069】

四価：本明細書で使用される「四価」という用語は、4つの抗原結合部位を有するAB

10

20

30

40

50

Mを指す。いくつかの実施形態では、抗原結合部位のうちの2つは、同じエピトープに結合し、他の2つの結合部位は、同じ標的分子または異なる標的分子にかかわらず、異なるエピトープに結合する。

【0070】

普遍的な重鎖：本明細書においてA B Mの文脈で使用される「普遍的な重鎖」という用語は、再配置された重鎖可変領域を有する重鎖、例えば、再配置されたI g重鎖可変領域を有するヒト重鎖を指す。例示的な再配置I g重鎖可変領域は、米国特許公開第2014/0245468号ならびに米国特許第9,204,624号および同第9,930,871号に提供され、これらの各々は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。普遍的な重鎖は、「共通の重鎖」としても知られる。

10

【0071】

普遍的な軽鎖：本明細書においてA B Mの文脈で使用される「普遍的な重鎖」という用語は、再配置された軽鎖可変領域を有する軽鎖、例えば、再配置されたI g軽鎖可変領域を有するヒト軽鎖を指す。普遍的な軽鎖は、「共通の重鎖」としても知られる。A B Mの文脈において、同じA B Mにおける異なる可変領域を有する2つの異なるF a bドメインの重鎖領域と対形成することができる軽鎖ポリペプチドを指す。普遍的な軽鎖は、「共通の軽鎖」としても知られる。例示的な再配置I g軽鎖可変領域は、例えば、米国特許第9,969,814号、同第10,130,181号、および同第10,143,186号、ならびに米国特許公開第2012/0021409号、同第2012/0192300号、同第2013/0045492号、同第2013/0185821号、同第2013/0302836号、および同第2015/0313193号に提供され、これらの各々は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0072】

V H：「V H」という用語は、F a bの重鎖を含む、抗体の免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。

【0073】

V L：「V L」という用語は、F a bの軽鎖を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

【0074】

6.2. 抗原結合分子 (A B M)

30

単一特異性および二重特異性抗原結合分子などの、抗原結合分子が本明細書に開示される。開示される抗原結合分子は、典型的な抗体構造とは異なる結合ドメイン配置を有する。開示される抗原結合分子は、単一の標的分子または抗原に二重特異的に結合することができ、これは、抗原または標的分子についての増加した親和性および／または親和力をもたらすことができる。例えば、両方のF a bが異なるエピトープで同じ抗原に結合する二重特異性抗原結合分子について、抗原についての親和性は、エピトープの一方のみに結合した抗体と比較して増加すると予想されるであろう。理論によって拘束されることなく、本明細書に開示されるA B Mは、F a b 1およびF a b 2ドメインの増加した近接性および／またはより大きな可撓性のいずれかに起因する、抗原または標的分子についての増加した親和力を有し、これは、F a bドメインの結合部位が離れて配置される、従来のフォーマットの抗体と比較して抗原結合部位の局所濃度を増加させると考えられる。

40

【0075】

第1の態様では、本開示のA B Mは、

- ・ NからC末端配向で

- －任意のヒンジドメイン、

- －第1のF cドメイン、および

- －第1の軽鎖可変領域 (V L) に会合した第1の重鎖可変領域 (V H) を含む第1のF a b (F a b 1) ドメインを含む、第1の半抗体と、

- ・ NからC末端配向で

- －任意のヒンジドメイン、

50

ー第2のFcドメイン、および
ー第2のVLに会合した第2のVHを含む第2のFabドメイン（「Fab2」）を含む、第2の半抗体と、を含み、
第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、互いに会合されてFc領域を形成し、任意のヒンジドメインは、存在する場合、ジスルフィド架橋を通して互いに会合され得る。

【0076】

一般に本明細書でABMフォーマット「A」（「フォーマットA」）と呼ばれ、本明細書で「Fc-Fab」フォーマットと呼ばれることがある、このタイプのABMの2つの実施形態は、図1Bおよび図2B、ならびに図13A、図13B、および図13Cに示されるそれらの変形において例示される。したがって、本開示は、

・NからC末端配向で
ージスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン（3）、
ーCH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含むFcドメイン、
ージスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン（3）、
ーリンカー（8）、ならびに
ーFab1ドメインの軽鎖成分に会合したFab1 VHドメイン（1）およびFab1 CH1ドメイン（2）を含むFab1ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab1 VLドメイン（6）およびFab1 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分を含む、第1のポリペプチドと、

・NからC末端配向で
ージスルフィド結合を介して第1のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン（3）、
ーCH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含む第2のFcドメイン、
ージスルフィド結合を介して第1のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結された任意のヒンジドメイン（3）、
ーリンカー（8）、ならびに

ーFab2ドメインの軽鎖成分に会合したFab2 VHドメイン（1）およびFab2 CH1ドメイン（2）を含むFab2ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab2 VLドメイン（6）およびFab2 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分を含む、第2のポリペプチドと、を含み、

第1のFcドメインおよび第2のFcドメインが、互いに会合してFc領域を形成する、図1Bおよび図2Bに示されるフォーマットA ABMを提供する。

【0077】

図1Bの実施形態では、両方の半抗体は、同一であり、Fcホモダイマーを形成するFcドメインを含み、得られるABMは、単一特異性である。図2Bの実施形態では、ABMは、Fcヘテロダイマーを含み、異なるFab1およびFab2 VHドメインの使用、ならびに多重特異性、例えば、二重特異性、分子の産生を可能にする。図1B、図2B、および13Aは、ABMがFcドメインのN末端にあるヒンジドメインで構成されるヒンジ領域を有する実施形態を示すが、フォーマットA ABMは、ヒンジ領域（図示せず）、Fc領域のC末端にあるヒンジ領域（図13C）、またはFc領域のN末端およびC末端にあるヒンジ領域（図13B）を有することができない。Fc領域のN末端および／またはC末端にある使用することができる例示的なヒンジドメインは、図13A～13Cに示されるように、アミノ酸配列GGGSCPPC（配列番号1）およびESKYGP
PCPPC（配列番号2）を含むが、フォーマットA ABMは、代替のヒンジ領域配列を有することができる。同様に、図13A～13Cは、（G4S）_nリンカーを示す（G4Sは配列番号3として開示される）が、他のリンカー配列を使用することができる。

【0078】

図1Bおよび図2Bは、2つの結合ドメイン（Fab1およびFab2）のみを含有するフォーマットA ABMの実施形態を示すが、本開示のABMは、追加の結合ドメイン、例えば、scFvまたはFabドメインを含有し得る。しかしながら、特定の態様では、Fab1およびFab2は、フォーマットA ABMの単独の結合ドメインである。

【0079】

第2の態様では、本開示のABMは、

・NからC末端配向で

- －第1のVLに会合した第1のVHを含む第1のFab（Fab1）ドメイン、
- －第1のスペーサドメイン、および
- －第1のFcドメインを含む、第1の半抗体と、

・NからC末端配向で

- －第2のVLに会合した第2のVHを含む第2のFab（Fab2）ドメイン、
- －第2のスペーサドメイン、および
- －第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含み、

第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、互いに会合してFc領域を形成する。

【0080】

理論によって拘束されることなく、FcドメインとFabドメインとの間にスペーサドメインを含めることは、Fc領域とFabの抗原結合部位との間のより大きな可撓性、ならびに結果として、ABMのその標的分子への結合のより高い親和性および／または親和力をもたらすと考えられる。

【0081】

特定の実施形態では、スペーサドメインは、伸長リンカーである。本明細書では一般にフォーマット「B」（「フォーマットB」）と呼ばれ、本明細書では「リーチ」フォーマットと呼ばれることがある、このABMのフォーマットは、図3Aに例示される。したがって、本開示は、

・NからC末端配向で

－Fab1ドメインの軽鎖成分に会合したFab1 VHドメイン（1）およびFab1 CH1ドメイン（2）を含むFab1ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab1 VLドメイン（6）およびFab1 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分、

－伸長リンカーであるリンカードメイン（8）、

－ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、および

－CH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含む第1のFcドメインを含む、第1のポリペプチドと、

・NからC末端配向で

－Fab2ドメインの軽鎖成分に会合したFab2 VHドメイン（1）およびFab2 CH1ドメイン（2）を含むFab2ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、NからC末端配向で、Fab2 VLドメイン（6）およびFab2 CLドメイン（7）を含む、重鎖成分、

－伸長リンカーであるリンカードメイン（8）、

－ジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、および

－CH2ドメイン（4）およびCH3ドメイン（5）を含む第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含む、図3Aに示される実施形態フォーマットB ABMを提供する。

【0082】

図3Aに示されるフォーマットB ABMの実施形態は、2つの結合ドメイン（Fab1およびFab2）のみを含有するが、本開示のフォーマットB ABMは、追加の結合ドメイン、例えば、scFvまたはFabドメインを含有し得る。しかしながら、特定の

10

20

30

40

50

態様では、F a b 1 および F a b 2 は、本開示のフォーマット B A B M の単独の結合ドメインである。

【0083】

他の実施形態では、スパーサードメインは、F a b ドメインである。本明細書ではフォーマット「C」（「フォーマット C」）と呼ばれる、このフォーマットの A B M の異なる変形は、図 3 B ～ 3 D に例示される。フォーマット C A B M は、よって、次のように構成される、第 3 の F a b （F a b 3）ドメインおよび第 4 の F a b （F a b 4）ドメインを含む：

- ・ N から C 末端配向で
 - －第 1 の V L に会合した第 1 の V H を含む第 1 の F a b （F a b 1）ドメイン、
 - －第 3 の V L に会合した第 3 の V H を含む第 3 の F a b （F a b 3）ドメイン、および
 - －第 1 の F c ドメインを含む、第 1 の半抗体と、
- ・ N から C 末端配向で
 - －第 2 の V L に会合した第 2 の V H を含む第 2 の F a b （F a b 2）ドメイン、
 - －第 4 の V L に会合した第 4 の V H を含む第 4 の F a b （F a b 4）ドメイン、および
 - －第 2 の F c ドメインを含む、第 2 の半抗体。

【0084】

したがって、本開示は、

- ・ N から C 末端配向で
 - －F a b 1 ドメインの軽鎖成分に会合した F a b 1 V H ドメイン（1）および F a b 1 C H 1 ドメイン（2）を含む F a b 1 ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、N から C 末端配向で、F a b 1 V L ドメイン（6）および F a b 1 C L ドメイン（7）を含む、重鎖成分、
 - －リンカードメイン（8）、
 - －F a b 3 ドメインの軽鎖成分に会合した F a b 3 V H ドメイン（1）および F a b 3 C H 1 ドメイン（2）を含む F a b 3 ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、N から C 末端配向で、F a b 3 V L ドメイン（6）および F a b 3 C L ドメイン（7）を含む、重鎖成分、
 - －ジスルフィド結合を介して第 2 のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、および
 - －C H 2 ドメイン（4）および C H 3 ドメイン（5）を含む第 1 の F c ドメインを含む、第 1 のポリペプチドと、
- ・ N から C 末端配向で
 - －F a b 2 ドメインの軽鎖成分に会合した F a b 2 V H ドメイン（1）および F a b 2 C H 1 ドメイン（2）を含む F a b 2 ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、N から C 末端配向で、F a b 2 V L ドメイン（6）および F a b 2 C L ドメイン（7）を含む、重鎖成分、
 - －リンカードメイン（8）、
 - －F a b 4 ドメインの軽鎖成分に会合した F a b 4 V H ドメイン（1）および F a b 4 C H 1 ドメイン（2）を含む F a b 4 ドメインの重鎖成分であって、ポリペプチドの形態の軽鎖成分が、N から C 末端配向で、F a b 4 V L ドメイン（6）および F a b 4 C L ドメイン（7）を含む、重鎖成分、
 - －ジスルフィド結合を介して第 2 のポリペプチドにおけるヒンジドメインに連結されたヒンジドメイン（3）、および
 - －C H 2 ドメイン（4）および C H 3 ドメイン（5）を含む第 2 の F c ドメインを含む、第 2 のポリペプチドと、を含み、第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインが互いに会合して F c 領域を形成する、図 3 B ～ 3 D に示される実施形態フォーマット C A B M を提供する。

【0085】

図 3 B ～ 3 D に示されるフォーマット C A B M の実施形態は、4 つの結合ドメイン（

F a b 1、F a b 2、F a b 3、およびF a b 4)を含有するが、本開示のフォーマットC A B Mは、追加の結合ドメイン、例えば、s c F vまたはF a bドメインを含有し得る。しかしながら、特定の態様では、F a b 1、F a b 2、F a b 3、およびF a b 4は、本開示のフォーマットC A B Mの単独の結合ドメインである。

【0086】

フォーマットC A B MのF a b 3およびF a b 4ドメインは、非結合性（図3 Bに示されるように）または結合性（図3 Cおよび図3 Dに示されるように）であり得る。F a b 3およびF a b 4が非結合性であるそれらの実施形態は、一般に、本明細書ではフォーマットC 1 A B Mと呼ばれ、このフォーマットは、本明細書では「クランプ」フォーマットと呼ばれることがある。F a b 3およびF a b 4が結合性であるそれらの実施形態は、一般に、本明細書ではフォーマットC 2 A B Mと呼ばれ、このフォーマットは、本明細書では「タンデムF a b」フォーマットと呼ばれることがある。「2+2タンデムF a b」という用語は、図3 Cおよび3 Dに示される実施形態を指し、F a b 1、F a b 2、F a b 3、およびF a b 4は、タンデムF a bにおける単独の結合ドメインである。フォーマットC 1およびフォーマットC 2 A B Mの各々は、ホモダイマーまたはヘテロダイマーであり得る。

【0087】

フォーマットC 1 A B Mの特定の实施形態では、F a b 1およびF a b 2ドメインは、非同一であり（例えば、同じ標的分子上または異なる標的分子上にかかわらず、異なるエピトープに結合し）、F a b 3およびF a b 4ドメインは、同一の非結合ドメインである。他の実施形態では、F a b 3およびF a b 4ドメインは、異なる非結合ドメインである。

【0088】

フォーマットC 2 A B Mの特定の实施形態では、図3 Cに示されるように、F a b 1およびF a b 3ドメインは、同一のV Hドメインを含み、F a b 2およびF a b 4ドメインは、同一のV Hドメインを含む。この構成は、構成1、または1-1-2-2構成と呼ばれる。フォーマットC 2 A B Mの代替の実施形態では、図3 Dに示されるように、F a b 1およびF a b 2ドメインは、同一のV Hドメインを含み、F a b 3およびF a b 4ドメインは、同一のV Hドメインを含む。この構成は、構成2、または1-2-1-2構成と呼ばれる。

【0089】

完全A B Mは、F c領域を形成する2つのF cドメインを通した2つの半抗体の会合によって形成される。2つの半抗体が非同一である場合、例えば、F a b 1およびF a b 2が異なるV Hドメインを含む場合、例えば、セクション6.2.7.2に記載されるような、F cヘテロダイマー化アプローチを利用して、正しい半抗体対形成またはそれらの精製を促進することができる。ヘテロダイマー化アプローチの例は、星型変異（セクション6.2.7.2に記載）またはノブインホール変異である。

【0090】

図2 B、3 A、3 B、および3 Cは、F cヘテロダイマーによって対形成された各半抗体において非同一のV Hドメインを含むA B Mを示すが、このフォーマットは、F cホモダイマーにも使用することができる。例えば、図2 Bおよび図3 Aは、それぞれ、F cヘテロダイマーを含むフォーマットA A B MおよびフォーマットB A B Mを示すが、F a b 1およびF a b 2における異なるV Hドメインの組み込み、ならびに多重特異性、例えば、二重特異性の結合分子の産生を可能にし、このフォーマットは、F cホモダイマーおよび同一のV Hドメインを有する単一特異性フォーマットAおよびフォーマットB A B Mにも使用することができる。同様に、F cホモダイマーを使用して、同一のF a b 1、F a b 2、F a b 3、およびF a b 4 V Hドメイン、または同一のF a b 1およびF a b 2 V Hドメイン、ならびに非結合F a b 3およびF a b 4 V Hドメインを有する、単一特異性フォーマットC A B Mを産生することができる。

【0091】

さらに、第1および第2のポリペプチドが、異なるVHドメインを含む場合、異なる戦略を使用して、多重特異性結合分子における正しいVH-VL対形成を可能にすることができる。例えば、ABMにおける2つ以上のタイプのVHドメインと作動可能に対形成することができる共通の軽鎖を使用することができる。そのような実施形態では、軽鎖ポリペプチド（例えば、Fab1およびFab2、ならびに存在する場合、Fab3およびFab4に会合した軽鎖）は、同一であり得る。あるいは、重鎖成分（（1）および（2））が、軽鎖成分（（6）および（7））との融合体として発現され得る、単ドメインFabを使用することができる。

【0092】

図1〜3に示される本開示のABMの変形は、限定することを意図するものではなく、本開示のABMは、とりわけ、図1〜3および以下のセクション6.2に示される修飾の任意の組み合わせを含むことができる。さらに、第1もしくは第2のポリペプチド鎖または左もしくは右半抗体を参照することは、便宜のためのみであり、ポリペプチド鎖または半抗体が任意の特定の順序で産生されるか、または組み立てられることを伝えることを意図するものではない。

【0093】

いくつかの実施形態では、本開示のABMの第1のFab（Fab1）ドメインおよび第2のFab（Fab2）ドメインは、各々同じ標的分子、例えば、小可溶性分子に結合することができる。第1のFab（Fab1）ドメインおよび第2のFab（Fab2）ドメインは、同じエピトープに結合することができる（例えば、両方のFab1およびFab2が同一のVHドメイン（図示せず）を有する、図1Bおよび図3Dに示される実施形態、または図3Aもしくは図3Bの変形）か、またはそれらは、同じ標的分子上または異なる標的分子上にかかわらず、異なるエピトープに結合することができる（例えば、図2B、図3A、図3B、および図3Cに示される実施形態）。第1のFab（Fab1）ドメインおよび第2のFab（Fab2）ドメインが、異なるエピトープ、例えば、同じ標的分子上または異なる標的分子上の2つの異なるエピトープに結合する場合、それらは、Fabがそれらのエピトープに同時に結合することができるように選択され得る。

【0094】

いくつかの実施形態では、例えば、フォーマットC ABMについて、本開示のABMは、図3C、図3A、および図3Dに示されるように、第3のFab（Fab3）ドメインおよび第4のFab（Fab4）ドメインを含むことができる。第3および第4のFabドメインは、図3Cに示されるように、非結合性であり得るか、またはそれらは、それぞれ、第1および第2のFab（Fab1およびFab2）ドメインによって結合されるエピトープと同じもしくは異なるエピトープに結合することができる。本明細書で 사용되는場合、フォーマットC ABMに関して、「第1および第2のFabドメイン」ならびに「Fab1およびFab2ドメイン」という用語は、典型的には、最もN末端のFabドメインを指す。

【0095】

特定の標的分子、特に、リピートモチーフを有するポリペプチドまたはマルチマー構造を有するタンパク質（例えば、ホモダイマーまたはホモトリマー）に存在し得るような、繰り返されたエピトープを有するものは、2つ以上の抗体分子によって結合され、大きな複合体の形成をもたらす。大きく、不均一な抗体複合体の産生は、「ペーパードローリング」と呼ばれる。抗体の大きな複合体は、食作用によって急速に排除され、抗体の低減した有効性をもたらす。大きな複合体はまた、治療抗体の免疫原性を増加させることができる。例えば、WO2020047067A1を参照されたい。本開示のABMは、Fabドメインが得られた親抗体と比較して、例えば、インビボまたはエクシボで凝集する傾向が少ない可能性がある。非限定的な例として、両方のFabが異なるエピトープで同じ抗原に結合する二重特異性ABMについて、親mAbの組み合わせで得られた結果とは異なり、本開示のABMが主に、追加の高次複合体をほとんどまたはまったく有しないリガンドとの別個の1:1複合体を形成したことが観察された（以下の実施例4を参照

10

20

30

40

50

されたい)。対照的に、親mAbの組み合わせは、複数の高次構造（マルチマー）を形成し、これらの親抗体が複数のリガンド間の架橋を形成したことを示し、例えば、折り畳まれていない「ペーパードール」構造を形成する。これらの結果は、Fabドメインの近接が高次構造に対して1:1Fc-Fabリガンド複合体の形成に有利であると考えられるため、本明細書に開示されるABMが凝集する傾向がないことを示す。実際には、これは、親抗体について予想されるよりも高い相対濃度の単一ABM:標的分子複合体をもたらし得る。

【0096】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、少なくとも2つの異なるエピトープ（および場合によっては3つまたは4つの異なるエピトープ）に特異的に結合する。少なくとも2つの異なるエピトープは、同じ標的分子または異なる標的分子上にあり得る。

【0097】

6.2.1. Fabドメイン

本開示のABMは、各半抗体に少なくとも1つのFabドメインを含む。Fabドメインは、従来、パパインなどの酵素を使用した免疫グロブリン分子のタンパク質分解による切断によって産生された。本開示のABMでは、Fabドメインは、より大きな分子の一部として組換え的に発現される。

【0098】

Fabドメインは、任意の好適な種からの定常および可変ドメイン配列を含むことができ、よって、マウス、キメラ、ヒト、またはヒト化であり得る。

【0099】

Fabドメインは、典型的には、VLドメインに付着したCLドメインと対形成するVHドメインに付着したCH1ドメインを含む。野生型免疫グロブリンでは、VHドメインは、VLドメインと対形成されてFv領域を構成し、CH1ドメインは、CLドメインと対形成されて結合モジュールをさらに安定化する。2つの定常ドメイン間のジスルフィド結合は、Fabドメインをさらに安定化させることができる。

【0100】

本開示のABMについて、特に軽鎖が共通のまたは普遍的な軽鎖ではない場合、Fabヘテロダイマー化戦略を使用して、同じABSに属するFabドメインの正しい会合を可能にし、別のABSに属するFabドメインの異常な対形成を最小限に抑えることが有利である。例えば、以下の表Bに示されるFabヘテロダイマー化戦略を使用することができる。

【表2】

表B Fabヘテロダイマー化戦略					
戦略	VH	CH1	VL	CL	参考文献
CrossMabCH1-CL	WT	CLドメイン	WT	CH1ドメイン	Schaefer et al.,2011,Cancer Cell 2011;20:472-86;PMID:22014573.
直交 Fab VHVRD1CH1CRD2- VLVRD1CλCRD2	39K,62E	H172A,F174G	1R,38D,(36F)	L135Y,S176W	Lewis et al.,2014,Nat Biotechnol 32:191-8
直交 Fab VHVRD2CH1wt- VLVRD2Cλwt	39Y	WT	38R	WT	Lewis et al.,2014,Nat Biotechnol 32:191-8
TCR CaCβ	39K	TCR Ca	38D	TCR Cβ	Wu et al.,2015,MAbs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K,S114A	Golay et al.,2016,J Immunol 196:3199-211.
MUT4	WT	L143Q,S188V	WT	V133T,S176V	Golay et al.,2016,J Immunol 196:3199-211.
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor et al.,2015,MAbs 7:377-89, Mazor et al.,2015,MAbs 7:461-669.
ドメイン交換	WT	CH3+ノブまたはホール変異	WT	CH3+ホールまたはノブ変異	Wozniak-Knopp et al.,2018,PLoS ONE13(4):e0195442

【0101】

したがって、特定の実施形態では、F a bの2つのポリペプチド間の正しい会合は、例えば、WO2009/080251に記載されるように、F a bのV LおよびV Hドメインを互いに交換するか、またはC H1およびC Lドメインを互いに交換することによって促進される。

【0102】

正しいF a b対形成はまた、C H1ドメインにおける1つ以上のアミノ酸修飾およびF a bのC Lドメインにおける1つ以上のアミノ酸修飾、ならびに／またはV Hドメインにおける1つ以上のアミノ酸修飾およびV Lドメインにおける1つ以上のアミノ酸修飾を導入することによって促進され得る。修飾されるアミノ酸は、典型的には、F a b成分が、他のF a bの成分ではなく、互いに優先的に対形成するように、V H：V LおよびC H1：C L界面の一部である。

10

【0103】

一実施形態では、1つ以上のアミノ酸修飾は、残基のK a b a t 番号付けによって示される可変（V H、V L）および定常（C H1、C L）ドメインの保存されたフレームワーク残基に限定される。A l m a g r o, 2008, F r o n t i e r s I n B i o s c i e n c e 13:1619-1633は、K a b a t、C h o t h i a、およびI M G T 番号付けスキームに基づいたフレームワーク残基の定義を提供する。

【0104】

一実施形態では、V HおよびC H1ならびに／またはV LおよびC Lドメインに導入された修飾は、互いに相補的である。重鎖および軽鎖の界面での相補性は、立体的および疎水性接触、静電／電荷相互作用、または様々な相互作用の組み合わせに基づいて達成することができる。タンパク質表面間の相補性は、ロックアンドキーフィット、ノブイントゥホール、突起および空洞、ドナーおよびアクセプターなどの観点で文献に広く記載されており、すべて2つの相互作用する表面間の構造的および化学的一致の性質を意味する。

20

【0105】

一実施形態では、1つ以上の導入された修飾は、F a b成分の界面にかけて新しい水素結合を導入する。一実施形態では、1つ以上の導入された修飾は、F a b成分の界面にかけて新しい塩橋を導入する。例示的な置換は、WO2014/150973およびWO2014/082179に記載されており、それらの内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【0106】

いくつかの実施形態では、F a bドメインは、C H1ドメインにおける192E置換、ならびにC Lドメインにおける114Aおよび137K置換を含み、これは、C H1ドメインとC Lドメインとの間に塩橋を導入する（例えば、G o l a y e t a l., 2016, J I m m u n o l 196:3199-211を参照されたい）。

【0107】

いくつかの実施形態では、F a bドメインは、C H1ドメインにおける143Qおよび188V置換、ならびにC Lドメインにおける113Tおよび176V置換を含み、これは、C H1とC Lドメインとの間の接触の疎水性および極性領域を交換するのに役立つ（例えば、G o l a y e t a l., 2016, J I m m u n o l 196:3199-211を参照されたい）。

40

【0108】

いくつかの実施形態では、F a bドメインは、F a bドメインの正しいアセンブリを促進する直交F a b界面を導入するために、V H、C H1、V L、C Lドメインのいくつかまたはすべてにおける修飾を含むことができる（L e w i s e t a l., 2014 N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 32:191-198）。一実施形態では、39K、62E修飾は、V Hドメインに導入され、H172A、F174G修飾は、C H1ドメインに導入され、1R、38D、（36F）修飾は、V Lドメインに導入され、L135Y、S176W修飾は、C Lドメインに導入される。別の実施形態では、39Y修飾は、V Hドメインに導入され、38R修飾は、V Lドメインに導入される。

50

【0109】

F a bドメインはまた、天然C H 1：C Lジスルフィド結合を操作されたジスルフィド結合で置き換えるように修飾することができ、それによってF a b成分対形成の効率を向上させる。例えば、操作されたジスルフィド結合は、C H 1ドメインに1 2 6 C、C Lドメインに1 2 1 Cを導入することによって、導入することができる（例えば、M a z o r e t a l. , 2 0 1 5 , M A b s 7 : 3 7 7 - 8 9を参照されたい）。

【0110】

F a bドメインはまた、C H 1ドメインおよびC Lドメインを、正しいアセンブリを促進する代替ドメインで置き換えることによって、修飾することができる。例えば、W u e t a l. , 2 0 1 5 , M A b s 7 : 3 6 4 - 7 6は、C H 1ドメインをT細胞受容体の定常ドメインで置換し、C LドメインをT細胞受容体のbドメインで置換し、これらのドメイン置換を、V Lドメインに3 8 D修飾を導入し、V Hドメインに3 9 K修飾を導入することによるV LドメインとV Hドメインとの間の追加の電荷-電荷相互作用で対形成することを記載する。

【0111】

正しいV H-V L対形成を促進するためのF a bヘテロダイマー化戦略の使用の代わりに、またはそれに加えて、共通の軽鎖（普遍的な軽鎖とも呼ばれる）のV Lは、本開示のA B Mの各F a b V L領域に使用することができる。様々な実施形態では、本明細書に記載されるように共通の軽鎖を使用することは、元の同族V Lを使用することと比較して、A B Mの不適切な種の数と低減する。様々な実施形態では、A B MのV Lドメインは、共通の軽鎖を含む単一特異性抗体から特定される。様々な実施形態では、A B MのV H領域は、限定されたヒト軽鎖レパートリーを発現するように予め操作されたマウスB細胞内にインビボで再配置されるヒト重鎖可変遺伝子セグメント、またはヒト重鎖と同族の単一ヒト軽鎖を含み、目的の抗原での曝露に応答して、1つの、または2つの可能なヒトV Lのうちの1つと同族である複数のヒトV Hを含有する抗体レパートリーを生成し、抗体レパートリーは、目的の抗原に特異的である。共通の軽鎖は、再配置されたヒトV κ 1-3 9 J κ 5 配列または再配置されたヒトV κ 3-2 0 J κ 1 配列に由来するものであり、体細胞変異（例えば、親和性成熟）バージョンを含む。例えば、米国特許第1 0 , 4 1 2 , 9 4 0 号を参照されたい。

【0112】

いくつかの実施形態では、F a bは、典型的には、V H、C H 1、V L、C L、およびリンカーを含む、単鎖F a b（「s c F a b」）のフォーマットである。いくつかの実施形態では、s c F a bのドメインは、以下のN末端からC末端の順序で配置される：a）V H-C H 1-リンカー-V L-C L、b）V L-C L-リンカー-V H-C H 1、c）V H-C L-リンカー-V L-C H 1、またはd）V L-C H 1-リンカー-V H-C L。リンカーは、セクション6. 2. 3に記載されるリンカーであり得、好ましくは、少なくとも3 0アミノ酸であり、特定の態様では、3 2~5 0アミノ酸である。単鎖F a bドメインは、C LドメインとC H 1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合を介して安定化される。

【0113】

6. 2. 2. s c F v

単鎖F vまたは「s c F v」抗体フラグメントは、単一のポリペプチド鎖に抗体のV HおよびV Lドメインを含み、単鎖ポリペプチドとして発現することができ、それらが由来する無傷の抗体の特異性を保持する。一般に、s c F vポリペプチドは、s c F vが標的結合のための所望の構造を形成することを可能にする、V HドメインとV Lドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。s c F vのV H鎖およびV L鎖を接続するのに適したリンカーの例は、セクション6. 2. 3において特定されるリンカーである。

【0114】

特に明記されない限り、本明細書で使用される場合、s c F vは、V LおよびV H可変領域をいずれかの順序で有し得、例えば、ポリペプチドのN末端およびC末端に関して、

s c F v は、V L - リンカー - V H を含み得るか、または V H - リンカー - V L を含み得る。

【0115】

s c F v は、マウス、ヒト、またはヒト化 V H および V L 配列などの、任意の好適な種からの V H および V L 配列を含むことができる。

【0116】

s c F v コード核酸を作製するために、V H および V L コード DNA フラグメントは、リンカーをコードする、例えば、セクション 6.2.3 に記載されるリンカー（典型的にはアミノ酸グリシンおよびセリン、例えば、アミノ酸配列 (G l y 4 ~ S e r) 3 (配列番号 4) を含有する配列のリピート) のいずれかをコードする別のフラグメントに作動可能に連結され、V H および V L 配列は、連続した単鎖タンパク質として発現され得、V L および V H 領域は、可撓性リンカーによって接合される（例えば、Bird et al., 1988, Science 242:423-426、Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883、McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554 を参照されたい）。

【0117】

6.2.3. リンカー

特定の態様では、本開示は、2 つ以上のドメイン（例えば、F a b および F c 領域）がリンカー（または「スペーサー」）ペプチドによって互いに接続される A B M を提供する。そのようなリンカーは、例えば、セクション 6.4 に記載される A B M に薬物を付着させるために使用される抗体-薬物コンジュゲート（「A D C」）リンカーとは対照的に、本明細書では「A B M リンカー」と呼ばれる。

【0118】

ペプチドリンカー（例えば、ポリグリシン）は、当該技術分野で周知であり、典型的には、融合タンパク質の成分の一方または両方の適切な折り畳みを可能にする。リンカーは、融合タンパク質の成分の可撓性接合領域を提供し、分子の 2 つの末端が独立して動くことを可能にし、2 つの部分の適切な機能の各々を保持するのに重要な役割を果たし得る。したがって、接合領域は、場合によっては、2 つの部分と一緒に組み合わせるリンカーとして、2 つの部分の各々がその独自の生物学的構造を形成し、他の部分と干渉しないことを可能にするスペーサーとして作用する。

【0119】

A B M リンカーは、2 アミノ酸 ~ 60 アミノ酸以上の範囲であり得、特定の態様では、ペプチドリンカーは、3 アミノ酸 ~ 50 アミノ酸、4 ~ 30 アミノ酸、5 ~ 25 アミノ酸、10 ~ 25 アミノ酸、10 アミノ酸 ~ 60 アミノ酸、12 アミノ酸 ~ 20 アミノ酸、20 アミノ酸 ~ 50 アミノ酸、または 25 アミノ酸 ~ 35 アミノ酸の長さの範囲である。

【0120】

本開示は、それぞれ、第 1 のリンカーおよび第 2 のリンカーを各々含む、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチド（例えば、セクション 6.2 に記載される実施形態の第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチド）を含む A B M を提供する。第 1 のリンカーおよび第 2 のリンカーは、0 ~ 60 または 0 ~ 50 アミノ酸、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 アミノ酸、例えば、0-10、5-15、10-20、15-25、0-30、5-30、10-30、20-30、0-40、5-40、10-40、15-40、20-40、25-40、30-40、35-40、0-50、5-50、10-50、15-50、20-50、25-50、30-50、35-50、40-50、または 45-50 アミノ酸の長さを有することができる。F c - F a b、クランプ、およびタンデム F a b フォーマット A B M について、典型的なリンカー長は

、5～30、例えば、5～30アミノ酸残基である。リーチフォーマットABMについて、典型的なリンカーの長さは、25～45、例えば、30～40アミノ酸残基である。

【0121】

荷電（例えば、荷電親水性リンカー）および／または可撓性リンカーが特に好ましい。本開示のABMに使用することができる可撓性リンカーの例は、Chen et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65 (10) : 1357-1369およびKlein et al., 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27 (10) : 325-330に開示されるものを含む。特に有用な可撓性リンカーは、グリシンおよびセリンのリピート、例えば、GnSまたはSGnのモノマーまたはマルチマーであり、nは、1～18の整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18である。GnSまたはSGnのうちの最も一般的なものは、(G4S)_n (G4Sは配列番号3として開示される) (すなわち、(Gly4Ser)_nまたは(Gly-Gly-Gly-Ser)_n) リンカーであり、nは、モチーフのリピートの数を示す。

【0122】

G4S (G4Sは配列番号3として開示される) の4、5、6個以上のリピート（例えば、6、7、8、9、または10個以上のリピート）および／または別の可撓性リンカーモチーフを含有する伸長リンカーは、リーチフォーマットに特に有用であり、伸長リンカーは、小可溶性分子に対するより大きな親和性および／または親和力をもたらすより可撓性の結合を提供すると考えられるスペーサーとして作用する。

【0123】

いくつかの実施形態では、ABMリンカーは、Gly-Gly、Gly-Gly-Gly (3Gly)、4Gly (配列番号5)、5Gly (配列番号6)、6Gly (配列番号7)、7Gly (配列番号8)、8Gly (配列番号9)、および9Gly (配列番号10) などの、ポリグリシンリンカーである。

【0124】

他の実施形態では、ABMリンカーは、グリシン-セリンリンカーである。そのようなリンカーの例はまた、Ser-Gly、Gly-Ser、Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号11)、Ser-Gly-Gly-Gly (配列番号12)、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号3)、Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号13)、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号14)、Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号15)、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号16)、Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (配列番号17)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (G4Sは配列番号3として開示される)、および(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n (SG4は配列番号13として開示される) を含み、n (モチーフのリピートの数) = 1～10である。(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (G4Sは配列番号3として開示される) および(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n (SG4は配列番号13として開示される) はまた、それぞれ、(G4S)_n および(SG4)_n として知られる。一実施形態では、ペプチドリンカーは、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁ (配列番号3)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (配列番号18)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (配列番号4)、または(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄ (配列番号19) である。いくつかの実施形態では、第1のリンカーおよび第2のリンカーは、同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列は、2～6つのリピーティングGGGS (配列番号3) アミノ酸配列、例えば、2、3、4、5、または6つのリピーティングGGGS (配列番号3) アミノ酸配列を含む。前述のモチーフのいずれかの4、5、6個以上のリピート（例えば、6、7、8、9、または10個以上のリピート）を含有する伸長リンカーは、リーチフォーマットについて企図される。

【0125】

6. 2. 4. ヒンジ領域

他の実施形態では、本開示の A B M は、ヒンジ領域、例えば、2つのヒンジドメインから構成されるヒンジ領域を含む。ヒンジを使用して、F a b ドメインを F c ドメインに接続するか、または A B M 構成を安定させることができる。

【0126】

ヒンジ領域は、天然または修飾ヒンジ領域であり得る。ヒンジ領域は、典型的には、F c 領域の N 末端に見られるが、いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、追加的または代替的に、本開示の A B M の F c 領域の C 末端に、例えば、図 13 B および図 13 C に示される F c - F a b 構成において見られ得る。

10

【0127】

天然ヒンジ領域は、自然に発生する抗体における F a b ドメインと F c ドメインとの間に通常見られるヒンジ領域である。修飾ヒンジ領域は、天然ヒンジ領域とは長さおよび／または組成が異なる任意のヒンジである。そのようなヒンジは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、サメ、ブタ、ハムスター、ラクダ、ラマ、またはヤギヒンジ領域などの、他の種からのヒンジ領域を含むことができる。他の修飾ヒンジ領域は、重鎖 F c 領域のものとは異なるクラスまたはサブクラスの抗体に由来する完全なヒンジ領域を含み得る。あるいは、修飾ヒンジ領域は、天然ヒンジまたはリピーティング単位の一部を含み得、リピート中の各単位は、天然ヒンジ領域に由来する。さらなる代替では、天然ヒンジ領域は、1つ以上のシステインもしくは他の残基を、セリンもしくはアラニンなどの中性残基に変換することによって、または好適に配置された残基をシステイン残基に変換することによって改変され得る。そのような手段によって、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、増加または減少され得る。他の修飾ヒンジ領域は、完全に合成であり得、長さ、システイン組成、および可撓性などの所望の特性を有するように設計され得る。

20

【0128】

いくつかの修飾ヒンジ領域は、例えば、米国特許第 5, 677, 425 号、WO 99 / 15549、WO 2005 / 003170、WO 2005 / 003169、WO 2005 / 003170、WO 98 / 25971、および WO 2005 / 003171 にすでに記載されており、これらは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0129】

様々な実施形態では、ヒンジドメイン内の 233 ~ 236 位は、G、G、G、および未占有；G、G、未占有、および未占有；G、未占有、未占有、未占有、および未占有；またはすべて未占有であり得、位置は、E U 番号付けによって番号付けされる。

30

【0130】

いくつかの実施形態では、本開示の A B M は、同じアイソタイプ（例えば、ヒト I g G 1 またはヒト I g G 4）の野生型ヒンジドメインと比較して、F c γ 受容体についての結合親和性を低減する修飾ヒンジドメインを含む。

【0131】

一実施形態では、本開示の A B M の一方または両方の鎖の F c 領域は、その N 末端に無傷のヒンジドメインを有する。

40

【0132】

一実施形態では、本開示の A B M の F c 領域およびヒンジ領域の両方は、I g G 4 に由来し、ヒンジ領域は、修飾された配列 C P P C（配列番号 20）を含む。ヒト I g G 4 のコアヒンジ領域は、配列 C P P C（配列番号 20）を含有する I g G 1 と比較して、配列 C P S C（配列番号 21）を含有する。I g G 4 配列に存在するセリン残基は、この領域における増加した可撓性をもたらし、したがって分子の一部分は、I g G 分子における他の重鎖に架橋して鎖間ジスルフィドを形成するのではなく、同じタンパク質鎖（鎖内ジスルフィド）内でジスルフィド結合を形成する（Angel et al., 1993, Mol Immunol 30(1):105-108）。セリン残基をプロリンに変更して、I g G 1 と同じコア配列を与えることは、I g G 4 ヒンジ領域における鎖間ジスルフィド

50

の完全な形成を可能にし、よって精製産物における不均一性を低減する。この改変されたアイソタイプは、IgG4Pと呼ばれる。

【0133】

6. 2. 5. キメラヒンジ配列

ヒンジ領域は、キメラヒンジ領域であり得る。

【0134】

例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせた、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含むことができる。

【0135】

特定の実施形態では、キメラヒンジ領域は、アミノ酸配列EPKSCDKTHTCPPCPAPPA（配列番号22）（参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、WO2014/121087の配列番号8として以前に開示された）またはESKYGPPCPAPPA（配列番号23）（WO2014/121087の配列番号9として以前に開示された）を含む。そのようなキメラヒンジ配列は、IgG4CH2領域に好適に連結することができる（例えば、IgG4Fcドメイン、例えば、ヒトまたはマウスFcドメインに組み込むことによって、これは例えば、セクション6. 2. 7. 1に記載されるように、エフェクター機能を低減するようにCH2および/またはCH3ドメインにおいてさらに修飾することができる）。

【0136】

6. 2. 6. 低減したエフェクター機能を有するヒンジ配列

さらなる実施形態では、ヒンジ領域は、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、WO2016/161010A2に記載されるように、修飾してエフェクター機能を低減することができる。様々な実施形態では、修飾ヒンジ領域の233～236位は、G、G、G、および未占有；G、G、未占有、および未占有；G、未占有、未占有、未占有、および未占有；またはすべて未占有であり、位置は、EU番号付けによって番号付けされる（WO2016/161010A2の図1に示される）。これらのセグメントは、GGG-、GG-、G-、または-として表すことができ、「-」は、未占有の位置を表す。

【0137】

236位は、標準的なヒトIgG2では未占有であるが、他の標準的なヒトIgGアイソタイプでは占有されている。233～235位は、4つすべてのヒトアイソタイプでは（WO2016/161010A2の図1に示されるように）G以外の残基によって占有されている。

【0138】

233～236位内のヒンジ修飾は、228位がPによって占有されることと組み合わせることができる。228位は、ヒトIgG1およびIgG2ではPによって自然に占有されるが、ヒトIgG4ではS、ヒトIgG3ではRによって占有される。IgG4抗体におけるS228P変異は、IgG4抗体を安定化し、外因性抗体と内因性抗体との間の重鎖軽鎖対の交換を低減するのに有利である。好ましくは、226～229位は、それぞれ、C、P、PおよびCによって占有される。

【0139】

例示的なヒンジ領域は、残基226～236を有し、GGG-（233～236）、GG-（233～236）、G-（233～236）、およびGなし（233～236）と呼ばれる修飾ヒンジ配列によって占有される、中間（またはコア）および下部ヒンジと呼ばれることがある。任意に、ヒンジドメインアミノ酸配列は、CPPCPAPGGG-GPSVF（配列番号24）（WO2016/161010A2の配列番号1として以前に開示された）、CPPCPAPGGG-GPSVF（配列番号25）（WO2016/161010A2の配列番号2として以前に開示された）、CPPCPAPG-（配列番号26）（WO2016/161010A2の配列番号3として以前

10

20

30

40

50

に開示された)、またはCPPCPAP-----GPSVF(配列番号27)(WO2016/161010A2の配列番号4として以前に開示された)を含む。

【0140】

上記の修飾ヒンジ領域は、典型的には、CH2およびCH3ドメインを含み、指定された領域に隣接する追加のヒンジセグメント(例えば、上部ヒンジ)を有し得る、重鎖定常領域に組み込むことができる。存在するそのような追加の定常領域セグメントは、典型的には、同じアイソタイプ、好ましくはヒトアイソタイプであるが、異なるアイソタイプのハイブリッドであり得る。そのような追加のヒト定常領域セグメントのアイソタイプは、好ましくはヒトIgG4であるが、ヒトIgG1、IgG2、もしくはIgG3、またはドメインが異なるアイソタイプであるそれらのハイブリッドでもあり得る。ヒトIgG1、IgG2、およびIgG4の例示的な配列は、WO2016/161010A2の図2〜4に示される。

10

【0141】

具体的な実施形態では、修飾ヒンジ配列は、IgG4CH2領域に連結することができる(例えば、IgG4Fcドメイン、例えば、ヒトまたはマウスFcドメインに組み込むことによって、これは例えば、セクション6.2.7.1に記載されるように、エフェクター機能を低減するようにCH2および/またはCH3ドメインにおいてさらに修飾することができる)。

【0142】

6.2.7.Fcドメイン

20

本開示のABMは、任意の適切な種に由来するFc領域を含むことができる。一実施形態では、Fc領域は、ヒトFcドメインに由来する。

【0143】

Fcドメインは、IgA(サブクラスIgA1およびIgA2を含む)、IgD、IgE、IgG(サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む)、およびIgMを含む、任意の適切なクラスの抗体に由来することができる。一実施形態では、Fcドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4に由来する。一実施形態では、Fcドメインは、IgG1に由来する。一実施形態では、Fcドメインは、IgG4に由来する。

【0144】

30

Fc領域内の2つのFcドメインは、互いに同じであるか、または異なり得る。天然抗体では、Fcドメインは、典型的には、同一であるが、抗原結合分子、例えば、本開示のABMを産生する目的で、Fcドメインは、以下のセクション6.2.7.2に記載されるように、有利に異なり、ヘテロダイマー化を可能にし得る。

【0145】

天然抗体では、IgA、IgD、およびIgGの重鎖Fcドメインは、2つの重鎖定常ドメイン(CH2およびCH3)で構成され、IgEおよびIgMの重鎖Fcドメインは、3つの重鎖定常ドメイン(CH2、CH3、およびCH4)で構成される。これらはダイマー化してFc領域を作製する。

【0146】

40

本開示のABMにおいて、Fc領域、および/またはその内のFcドメインは、1つ以上の異なるクラスの抗体、例えば、1つ、2つ、または3つの異なるクラスからの重鎖定常ドメインを含むことができる。

【0147】

一実施形態では、Fc領域は、IgG1に由来するCH2およびCH3ドメインを含む。

【0148】

一実施形態では、Fc領域は、IgG2に由来するCH2およびCH3ドメインを含む。

【0149】

一実施形態では、Fc領域は、IgG3に由来するCH2およびCH3ドメインを含む。

【0150】

50

一実施形態では、F c 領域は、I g G 4 に由来する C H 2 および C H 3 ドメインを含む。
【0151】

一実施形態では、F c 領域は、I g M からの C H 4 ドメインを含む。I g M C H 4 ドメインは、典型的には、C H 3 ドメインの C 末端に位置する。

【0152】

一実施形態では、F c 領域は、I g G に由来する C H 2 および C H 3 ドメイン、ならびに I g M に由来する C H 4 ドメインを含む。

【0153】

本開示の A B M のための F c 領域の産生における使用のための重鎖定常ドメインは、上記の自然に発生する定常ドメインのバリエーションを含み得ることが理解されるであろう。そのようなバリエーションは、野生型定常ドメインと比較して、1 つ以上のアミノ酸バリエーションを含み得る。一例では、本開示の F c 領域は、野生型定常ドメインから配列が異なる少なくとも 1 つの定常ドメインを含む。バリエーション定常ドメインは、野生型定常ドメインよりも長くても短くてもよいことが理解されるであろう。好ましくは、バリエーション定常ドメインは、野生型定常ドメインと少なくとも 60 % 同一または類似である。別の例では、バリエーション定常ドメインは、少なくとも 70 % 同一または類似である。別の例では、バリエーション定常ドメインは、少なくとも 80 % 同一または類似である。別の例では、バリエーション定常ドメインは、少なくとも 90 % 同一または類似である。別の例では、バリエーション定常ドメインは、少なくとも 95 % 同一または類似である。

【0154】

I g M および I g A は、共通の H 2 L 2 抗体ユニットの共有結合マルチマーとしてヒトにおいて自然に発生する。I g M は、J 鎖が組み込まれた場合はペンタマーとして、J 鎖を欠く場合はヘキサマーとして発生する。I g A は、モノマーおよびダイマー形態として発生する。I g M および I g A の重鎖は、テールピースとして知られる、C 末端定常ドメインへの 18 アミノ酸伸長を有する。テールピースは、ポリマーにおいて重鎖間にジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含み、重合において重要な役割を果たすと考えられる。テールピースは、グリコシル化部位も含有する。特定の実施形態では、本開示の A B M は、テールピースを含まない。

【0155】

本開示の A B M に組み込まれる F c ドメインは、タンパク質の機能的特性を改変する 1 つ以上の修飾、例えば、F c R n もしくは白血球受容体などの F c 受容体への結合、補体への結合、修飾されたジスルフィド結合構造、または改変されたグリコシル化パターンを含み得る。エフェクター機能を改変する例示的な F c 修飾は、セクション 6.2.7.1 に記載される。

【0156】

F c ドメインはまた、例えば、同一の F c ドメインに対する非同一の F c ドメインの優先的な対形成である、ヘテロダイマー化を可能にすることによって、非対称 A B M の製造可能性を改善する修飾を含むように改変することができる。ヘテロダイマー化は、配列が異なる F c ドメインを含有する F c 領域によって異なる A B S が互いに接続される A B M の産生を可能にする。ヘテロダイマー化戦略の例をセクション 6.2.7.2 に例示する。

【0157】

上記の修飾のいずれかを任意の好適な方法で組み合わせて所望の機能的特性を達成するか、かつ／または他の修飾と組み合わせて A B M の特性を改変することができることが理解されるであろう。

【0158】

6.2.7.1. 改変されたエフェクター機能を有する F c ドメイン

いくつかの実施形態では、F c ドメインは、F c 受容体および／またはエフェクター機能への結合を低減する 1 つ以上のアミノ酸置換を含む。

【0159】

特定の実施形態では、F c 受容体は、F c γ 受容体である。一実施形態では、F c 受容

10

20

30

40

50

体は、ヒトFc受容体である。一実施形態では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。具体的な実施形態では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的にはヒトFcγRIIIa、FcγRI、またはFcγRIIIa、最も具体的にはヒトFcγRIIIaである。一実施形態では、エフェクター機能は、補体依存性細胞毒性(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、およびサイトカイン分泌の群から選択される1つ以上である。特定の実施形態では、エフェクター機能は、ADCCである。

【0160】

一実施形態では、Fc領域は、E233、L234、L235、N297、P331、およびP329(Kabat EUインデックスによる番号付け)の群から選択される位置にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、Fc領域は、L234、L235、およびP329(Kabat EUインデックスによる番号付け)の群から選択される位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、アミノ酸置換L234AおよびL235A(Kabat EUインデックスによる番号付け)を含む。そのような一実施形態では、Fc領域は、Igdfc領域、特にヒトIgdfc領域である。一実施形態では、Fc領域は、P329位にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、アミノ酸置換は、P329AまたはP329G、特にP329G(Kabat EUインデックスによる番号付け)である。一実施形態では、Fc領域は、P329位にアミノ酸置換、ならびにE233、L234、L235、N297、およびP331(Kabat EUインデックスによる番号付け)から選択される位置にさらなるアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、さらなるアミノ酸置換は、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D、またはP331Sである。特定の実施形態では、Fc領域は、P329、L234、およびL235(Kabat EUインデックスによる番号付け)位にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態では、Fc領域は、アミノ酸変異L234A、L235A、およびP329G(「P329G LALA」、「PGLALA」、または「LALAPG」)を含む。

【0161】

典型的には、同じ1つ以上のアミノ酸置換は、Fc領域の2つのFcドメインの各々に存在する。よって、特定の実施形態では、Fc領域の各Fcドメインは、アミノ酸置換L234A、L235A、およびP329Gを含み(Kabat EUインデックス番号付け)、すなわち、Fc領域における第1および第2のFcドメインの各々において、234位のロイシン残基は、アラニン残基(L234A)で置き換えられ、235位のロイシン残基は、アラニン残基(L235A)で置き換えられ、329位のプロリン残基は、グリシン残基(P329G)によって置き換えられる(Kabat EUインデックスによる番号付け)。

【0162】

一実施形態では、Fcドメインは、IgG1 Fcドメイン、特にヒトIgG1 Fcドメインである。いくつかの実施形態では、IgG1 Fcドメインは、エフェクター機能を低減するD265A、N297A変異(EU番号付け)を含むバリエーションIgG1である。

【0163】

別の実施形態では、Fcドメインは、Fc受容体への低減した結合を有するIgG4 Fcドメインである。Fc受容体への低減した結合を有する例示的なIgG4 Fcドメインは、以下の表Cから選択されるアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、以下に示される配列の太字部分のみを含む：

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 C		
Fc ドメイン	配列	配列番号
WO2014/121087 の配列番号 1	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	28

【表 3 - 2】

表 C		
Fc ドメイン	配列	配列番号
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
WO2014/121087 の配列番号 2	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	29
WO2014/121087 の配列番号 30	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	30

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

表 C		
Fe ドメイン	配列	配列番号
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
WO2014/121087 の配列 番号 31	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	31
WO2014/121087 の配列 番号 37	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	32
WO2014/121087 の配列 番号 38	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr	33

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

表 C		
Fc ドメイン	配列	配列番号
	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	

10

【0164】

特定の実施形態では、低減したエフェクター機能を有する I g G 4 は、WO 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7 の配列番号 3 1 のアミノ酸配列の太字部分（本出願の配列番号 3 1 のアミノ酸 9 9 ~ 3 2 6 に対応する）を含み、本明細書では I g G 4 または h I g G 4 と呼ばれることがある。

20

【0165】

ヘテロダイマー A B M について、上記に記載されるバリエーション I g G 4 F c 配列の組み合わせ、例えば、WO 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7 の配列番号 3 0 （または本出願の配列番号 3 0 のアミノ酸 9 9 ~ 3 2 9 に対応する、その太字部分）および WO 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7 の配列番号 3 7 （または本出願の配列番号 3 2 のアミノ酸 9 9 ~ 3 2 9 に対応する、その太字部分）の組み合わせを含む F c 領域、または WO 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7 の配列番号 3 1 （または本出願の配列番号 3 1 のアミノ酸 9 9 ~ 3 2 6 に対応する、その太字部分）および WO 2 0 1 4 / 1 2 1 0 8 7 の配列番号 3 8 （または本出願の配列番号 3 3 のアミノ酸 9 9 ~ 3 2 6 に対応する、その太字部分）の組み合わせを含む F c 領域を組み込むことが可能である。

30

【0166】

6. 2. 7. 2. F c ヘテロダイマー化バリエーション

多くの多重特異性分子フォーマットは、天然免疫グロブリンとは異なり、非同一の抗原結合ドメイン（またはその一部分、例えば、F a b の V H または V H - C H 1）に作動可能に連結された、2 つの F c ドメイン間のダイマー化を伴う。F c ドメインを形成する 2 つの F c 領域の不適切なヘテロダイマー化は、所望の多重特異性分子の収率を増加させるための障害であり得、精製の課題を表す。例えば、E P 1 8 7 0 4 5 9 A 1、米国特許第 5, 5 8 2, 9 9 6 号、米国特許第 5, 7 3 1, 1 6 8 号、米国特許第 5, 9 1 0, 5 7 3 号、米国特許第 5, 9 3 2, 4 4 8 号、米国特許第 6, 8 3 3, 4 4 1 号、米国特許第 7, 1 8 3, 0 7 6 号、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 2 0 4 4 9 3 A 1 号、および P C T 公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 A 1 号に記載されるように、本開示の A B M に存在し得る F c ドメインのダイマー化の増強において、当該技術分野で利用可能な様々なアプローチを使用することができる。

40

【0167】

本開示は、F c ヘテロダイマーを含む A B M、すなわち、異種、非同一の F c ドメインを含む F c 領域を提供する。ヘテロダイマー化戦略は、異なる A B S（またはその一部分

50

、例えば、F a bのV HまたはV H－C H 1) に作動可能に連結されたF c領域のダイマー化を増強し、同一のA B Sに作動可能に連結されたF cドメインのダイマー化を低減するために使用される。典型的には、F cヘテロダイマーにおける各F cドメインは、抗体のC H 3ドメインを含む。C H 3ドメインは、前のセクションに記載されるように、任意のアイソタイプ、クラス、またはサブクラス、好ましくはI g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4) クラスの抗体の定常領域に由来する。

【0168】

C H 3ドメインでの2つの異なる重鎖のヘテロダイマー化は、所望のA B Mを生じさせるが、同一の重鎖のホモダイマー化は、所望のA B Mの収率を低減させるであろう。よって、好ましい実施形態では、本開示のA B Mを形成するために会合する2つの半抗体は、未修飾鎖と比較してヘテロダイマー会合に有利な修飾を有するC H 3ドメインを含有するであろう。

【0169】

具体的な実施形態では、F cヘテロダイマーの形成を促進する当該修飾は、F cドメインの1つにおける「ノブ」修飾および他のF cドメインにおける「ホール」修飾を含む、いわゆる「ノブイントゥホール」または「ノブインホール」修飾である。ノブイントゥホール技術は、例えば、米国特許第5, 731, 168号、同第7, 695, 936号、R i d g w a y e t a l . , 1996, P r o t E n g 9: 617-621、およびC a r t e r , 2001, I m m u n o l M e t h 248: 7-15に記載される。一般に、方法は、第1のポリペプチドの界面に突起(「ノブ」)、第2のポリペプチドの界面に対応する空洞(「ホール」)を導入することを含み、ヘテロダイマー形成を促進し、ホモダイマー形成を妨げるために、突起を空洞内に配置することができる。突起は、第1のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換えることによって構築される。突起と同一または類似のサイズの代償性空洞は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作製される。

【0170】

したがって、いくつかの実施形態では、F cドメインの第1のサブユニットのC H 3ドメインにおけるアミノ酸残基は、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、第1のサブユニットのC H 3ドメイン内に突起を生成し、これは第2のサブユニットのC H 3ドメイン内の空洞内に配置可能であり、F cドメインの第2のサブユニットのC H 3ドメインにおけるアミノ酸残基は、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、第1のサブユニットのC H 3ドメイン内の突起が配置可能である第2のサブユニットのC H 3ドメイン内に空洞を生成する。好ましくは、より大きな側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、およびトリプトファン(W)からなる群から選択される。好ましくは、より小さな側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、およびバリン(V)からなる群から選択される。突起および空洞は、例えば、部位特異的変異誘発によって、またはペプチド合成によって、ポリペプチドをコードする核酸を変更することによって作製することができる。例示的な置換は、Y 470 Tである。

【0171】

特定のそのような実施形態では、第1のF cドメインにおいて、366位のスレオニン残基は、トリプトファン残基(T 366 W)で置き換えられ、F cドメインにおいて、407位のチロシン残基は、バリン残基(Y 407 V)で置き換えられ、任意に、366位のスレオニン残基は、セリン残基(T 366 S)で置き換えられ、368位のロイシン残基は、アラニン残基(L 368 A)で置き換えられる(K a b a t E Uインデックスによる番号付け)。さらなる実施形態では、第1のF cドメインにおいて、加えて、354位のセリン残基は、システイン残基(S 354 C)で置き換えられるか、または356位のグルタミン酸残基は、システイン残基(E 356 C)で置き換えられ(特に、354位

のセリン残基はシステイン残基で置き換えられ)、第2のFcドメインにおいて、加えて、349位のチロシン残基は、システイン残基(Y349C)によって置き換えられる(Kabat EUインデックスによる番号付け)。特定の実施形態では、第1のFcドメインは、アミノ酸置換S354CおよびT366Wを含み、第2のFcドメインは、アミノ酸置換Y349C、T366S、L368A、およびY407Vを含む(Kabat EUインデックスによる番号付け)。

【0172】

いくつかの実施形態では、静電ステアリング(例えば、Gunasekaran et al., 2010, J Biol Chem 285(25):19637-46に記載される)を使用して、Fcドメインの第1および第2のサブユニットの会合を促進することができる。

10

【0173】

ヘテロダイマー化を促進するために修飾されたFcドメインの使用の代替として、またはそれに加えて、Fcドメインを修飾して、Fcヘテロダイマーの選択を可能にする精製戦略を可能にすることができる。そのような一実施形態では、1つの半抗体は、プロテインAへのその結合を無効にする修飾Fcドメインを含み、よって、ヘテロダイマータンパク質をもたらす精製方法を可能にする。例えば、米国特許第8,586,713号を参照されたい。そのようなものとして、ABMは、第1のCH3ドメインおよび第2のIgCH3ドメインを含み、第1および第2のIgCH3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸ほど互いに異なっており、少なくとも1つのアミノ酸の相違は、アミノ酸の相違を欠失する対応するABMと比較して、プロテインAへABMの結合を低減させる。一実施形態では、第1のCH3ドメインは、プロテインAに結合し、第2のCH3ドメインは、H95R修飾(IMGTEクソン番号付けによる、EU番号付けではH435R)などのプロテインA結合を低減または消失する変異/修飾を含有する。第2のCH3は、Y96F修飾(IMGTEによるものであり、EUではY436F)をさらに含み得る。よって、修飾のクラスは、本明細書では「星型」変異と呼ばれる。

20

【0174】

6.3. 標的分子

本開示のABMは、各々、標的分子、例えば、小可溶性分子に特異的に結合する、少なくとも2つのFabドメイン、Fab1およびFab2を含む。特定の実施形態では、本開示のABMは、結合性または非結合性であり得る、2つの追加のFabドメイン、Fab3およびFab4をさらに含む。いくつかの実施形態では、Fab1、Fab2、ならびに存在する場合、Fab3およびFab4の結合形態によって結合される標的分子は、タンパク質分子である。

30

【0175】

好ましくは、Fab1およびFab2は、各々が同時にそのそれぞれのエピトープに特異的に結合することができるように選択される。いくつかの実施形態では、Fab1およびFab2は、各々、異なる標的分子、例えば、互いに相互作用することができる一対の分子(腫瘍関連抗原およびCD3など)に特異的に結合する。他の実施形態では、Fab1およびFab2は、同じ標的分子に、異なるエピトープまたは同じエピトープのいずれかに結合する。

40

【0176】

本開示のABMは、低分子量タンパク質、例えば、100 kDa未満、75 kDa未満、または60 kDa未満(グリコシル化などの翻訳後修飾を含むか、または含まない)の分子を有するタンパク質に結合するために特に利点であると考えられる。特定の実施形態では、本開示のABMによって結合されるタンパク質は、5 kDa~75 kDa、5 kDa~60 kDa、5 kDa~45 kDa、5 kDa~30 kDa、10 kDa~75 kDa、10 kDa~60 kDa、10 kDa~45 kDa、または10 kDa~30 kDaの範囲の分子量を有し、いずれの場合もグリコシル化などの翻訳後修飾を含むか、または含まない。

50

【0177】

F a b 1 および／または F a b 2 が結合することができる例示的な標的分子は、A B C F 1、A C V R 1、A C V R 1 B、A C V R 2、A C V R 2 B、A C V R L I、A D O R A 2 A、アグリカン、A G R 2、A I C D A、A I F 1、A I G 1、A K A P 1、A K A P 2、A M H、A M H R 2、A N G P T 1、A N G P T 2、A N G P T L 3、A N G P T L 4、A N P E P、A P C、A P O C 1、A R、A Z G P 1（亜鉛－a－糖タンパク質）、A R T－4、B 7、B 7. 1、B 7. 2、B A D、B A F F、B A G I、B A I i、B C L 2、B C L 6、B D N F、B L N K、B L R L（M D R L S）、B l y S、B M P L、B M P 2、B M P 3 B（G D F 10）、B M P 4、B M P 6、B M P S、B M P R 1 A、B M P R 1 B、B M P R 2、B P A G 1（プレクチン）、B R C A 1、B a－7 3 3、B A G E、B r E 3－抗原、C A 1 2 5、C A M E L、C A P－I、C A S P－8／m、C C C L 1 9、C C C L 2 1、C D 1、C D 1 a、C D 2、C D 3、C D 4、C D S、C D 8、C D I－I A、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 8、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 3、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 4 5、C D 4 6、C D 5 4、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 6 6 a－e、C D 6 7、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 a、C D 8 0、C D 8 3、C D 9 5、C D 1 2 6、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 4 7、C D 1 5 4、C D C 2 7、C D K－4／m、C D K N 2 A、C X C R 4、C X C R 7、C X C L 1 2、C 1 9 o r f 1 0（I L 2 7 w）、C 3、C 4 A、C S、C S R 1、C A N T 1、C A S P I、C A S P 4、C A V 1、C C B P 2（D 6／J A B 6 1）、C C L I（I－3 0 9）、C C L I I（エオタキシン）、C C L 1 3（M C P－4）、C C L I S（M I P－1 d）、C C L 1 6（H C C－4）、C C L 1 7（T A R C）、C C L I S（P A R C）、C C L 1 9（M I P－3 b）、C C L 2（M C P－1）、M C A F、C C L 2 0（M I P－3 a）、C C L 2 1（M I P－2）、S L C、エクソダス－2、C C L 2 2（M D C／S T C－1）、C C L 2 3（M P I F－1）、C C L 2 4（M P I F－2／エオタキシン－2）、C C L 2 S（T E C K）、C C L 2 6（エオタキシン－3）、C C L 2 7（C T A C K／I L C）、C C L 2 S、C C L 3（M I P 1 a）、C C L 4（M I P－1 b）、C C L S（R A N T E S）、C C L 7（M C P－3）、C C L S（m c p－2）、C C N A 1、C C N A 2、C C N D 1、C C N E 1、C C N E 2、C C R 1（C K R 1／H M 1 4 S）、C C R 2（m c p－1 R B／R A）、C C R 3（C K R 3／C M K B R 3）、C C R 4、C C R S（C M K B R S I C h e m R 1 3）、C C R 6（C M K B R 6／C K R－L 3／S T R L 2 2／D R Y 6）、C C R 7（C K R 7／E B 1）、C C R S（C M K B R S／T E R 1／C K R－L I）、C C R 9（G P R－9－6）、C C R L I（V S H K 1）、C C R L 2（L－C C R）、C D 1 6 4、C D l c、C D 2 0 0、C D－2 2、C D 2 4、C D 2 S、C D 3 S、C D 3 E、C D 3 G、C D 3 Z、C D 4、C D 4 4、C D 4 S R B、C D 4 7、C D 4 S、C D S 2、C D 6 9、C D 7 2、C D 7 9 A、C D 7 9 B、C D S O、C D S 1、C D S 3、C D S 6、C D 1 3 7、C D 1 3 S、B 7－1、B 7－2、I C O S L、B 7－H 3、B 7－H 4、C D 1 3 7 L、O X 4 0 L、C D H 1（E－カドヘリン）、C D H 1 0、C D H 1 2、C D H 1 3、C D H l S、C D H 1 9、C D H 2 0、C D H S、C D H 7、C D H S、C D H 9、C D K 2、C D K 3、C D K 4、C D K S、C D K 6、C D K 7、C D K 9、C D K N 1 A（p 2 1 W a p 1／C i p 1）、C D K N 1 B（p 2 7 K i p 1）、C D K N 1 C、C D K N 2 A（p 1 6 I N K 4 a）、C D K N 2 B、C D K N 2 C、C D K N 3、C E B P B、C E R 1、C H G A、C H G B、キチナーゼ、C H S T 1 0、C K L F S F 2、C K L F S F 3、C K L F S F 4、C K L F S F S、C K L F S F 6、C K L F S F 7、C K L F S F S、C L D N 3、C L D N 7（クローディン－7）、C L N 3、C L U（クラステリン）、C M K L R 1、C M K O R 1（R D C 1）、C N R 1、C O L I S A 1、C O L I A 1、C O L 4 A 3、C O L 6 A l、C R 2、C R P、C S F 1（M－C S F）、C S F 2（G M－C S F）、C S F 3（G C S F）、C T L A－4、C T N N B 1（b－カテニン）、C T S B（カテプシン B）、C X 3 C L I（S C Y D 1）、C X 3 C R 1（V 2 S）、C X

10

20

30

40

50

CL1 (GRO1)、CXCL10 (IP-10)、CXCL11 (I-TAC/IP-9)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2 (GRO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCL5 (ENA-7S/LIX)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYBS、CYC1、CYSLTR1、HIF-1 α 、結腸特異的抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAB2IP、DES、DKFZp4S1J011S、DNCLI、DPP4、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、EN01、EN02、EN03、EPHB4、EPO、EREG、ERKS、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FADD、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF1S、FGF19、FGF2 (bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGFS、FGF7 (KGF)、FGFS、FGF9、FGFR3、FIGF (VEGFD)、FILI (EPSILON)、FILI (ZETA)、FLJ12SS4、FLJ2SS30、FLRT1 (フィブロネクチン)、FOS、FOSLI (FRA-1)、FY (DARC)、Flt-I、Flt-3、葉酸塩受容体、G250抗原、GAGE、GROB、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDFS、GFil、GGTL、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44、GPRS1 (FKSGSO)、GRCC10 (C10)、GRP、GSN (ゲルソリン)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDACS、HDAC7A、HDAC9、HGF、HIP1ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HUMCYT2A、HLA-DR、HMI 24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素誘導因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2または1 α 、IGF-IR、

【数2】

IFN- γ

IFN- α 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IL-1、IL-10、IL-10RA、IL-10RB、IL-11、IL-11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL-13RA1、IL-13RA2、IL-14、IL-1S、IL-1SRA、IL-16、IL-17、IL-17B、IL-17C、IL-17R、IL-18、IL-18BP、IL-18R1、IL-18RAP、IL-19、IL-1A、IL-1B、IL-1F10、IL-1FS、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1HY1、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAP、IL-1RAPL1、IL-1RAPL2、IL-1RL1、IL-1RL2、IL-1RN、IL-2、IL-20、IL-20RA、IL-21R、IL-22、IL-22R、IL-22RA2、IL-23、IL-24、IL-2S、IL-26、IL-27、IL-28A、IL-28B、IL-29、IL-2RA、IL-2RB、IL-2RG、IL-3、IL-30、IL-3RA、IL-4、IL-4R、IL-S、IL-5RA、IL-6、IL-6R、IL-6ST (糖タンパク質130)、IL-7、IL-7R、IL-S、IL-SRA、IL-SRB、IL-9、IL-9R、IL-K、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、I

RAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 (a6インテグリン)、ITGAV、ITGB3、ITGB4 (b4インテグリン) インスリン様成長因子-I (IGF-1)、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4 IFNAS、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNW1、JAG1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KLF5 (GC Box BP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK1S、KLK3、KLK4、KLKS、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19 (ケラチン19)、KRT2A、KRTHB6 (毛髪特異的タイプIIケラチン)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、LAMAS、LEP (レプチン)、Lingo-p7S、Lingo-Troy、LPS、LTA (TNF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACM ARCKS、MAGまたはOmgp、MAP2K7 (c-Jun)、MDK、MIB1、ミッドカイン、MIF、MIP-2、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3 (メタロチオネクチン-III)、MTSS1、MUC1 (ムチン)、MYC、MYD88、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ES0-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、NCK2、ニューロカン、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (Noga)、NgRp7S、NgR-Troy、NME1 (NM23A)、NOXS、NPPB、NROB1、NROB2、NR1D1、NR1D2、NRIH2、NRIH3、NRIH4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NRS A1、NRS A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NTSE、NTN4、ODZ1、OPRD1、PCSK9、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCNA、PD-1、PD-L1、アルファ4ベータ7、OX40、GITR、TIM-3、Lag-3、B7-H3、B7-H4、GDFS、CGRP、Lingo-I、第IXa因子、第X因子、ICOS、GARP、BTLA、CD160、RORI、2B4、KIR、CD27、OX40、A2aR、PDGFA、PDGFB、PECAM1、PF4 (CXCL4)、PGF、PGR、ホスファカン、PIAS2、PIK3CG、PLAU (uPA)、PLG、PLXDC1、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、膵臓がんムチン、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺性酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、10PIGF、ILGF、ILGF-IR、IL-6、RS5、RANTES、RAC2 (p21Rac2)、RAR B、RGS1、RGS13、RGS3、RNFL10 (ZNF144)、ROB02、S100A2、SCGB1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A1 (マンマグロビン2)、SCGB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINBS (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B (Sprl)、ST6GAL1、STAB1、STATE、STEAP、STEAP2、TIOI、SAGE、5100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL受容体、TNF-a、Tn-抗原、Thomson F r i e d e n r e i c h 抗原、腫瘍壊死抗原、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1l1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIMP3、組織因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLRS、TLR6

10

20

30

40

50

、TLR7、TLRS、TLR9、TNF、TNF- α 、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSFS、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSFS、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF1S (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSFS (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSFS (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-LBBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TPS3、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAPS、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-IA抗原補体因子C3、C3a、C3b、C5a、CS、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、CD19/CD3、BCMA/CD3、EGFR、HER3、IL17RA/IL7R、IL-6/IL-23、IL1/IL-8、IL-6、IL-6R/IL-21、IL-21R、ANG2/VEGF、VEGF/PDGFR- β 、血管内皮成長因子 (VEGF) アクセプター2/CD3、PSMA/CD3、EPCAM/CD3、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、VEGFB、VEGFC、パーシカン、VHL CS、VLA-4、c-FMS/CSFIR、RET、HER3、HER4、IGFR、PDGFR、c-KIT、BCR、インテグリン、MMP VEGF、EGF、PIGF、PDGF、HGF、アンジオポエチン、ERBB-3/C-MET、ERBB-2/C-MET、EGF受容体1/CD3、EGFR/HER3、PSCA/CD3、C-MET/CD3、ENDOSIALIN/CD3、EPCAM/CD3、IGF-1R/CD3、FAPALPHA/CD3、EGFR/IGF-IR、IL 25 17A/F、EGF受容体1/CD3、およびCD19/CD16、KHI、Tn-抗原、TF-抗原、CD44、糖脂質、スフィンゴ糖脂質、例えば、30 Gg3、Gb3、GD3、GD2、Gb5、Gm1、Gm2、シアリルテトラオシルセラミド、XCL1 (リンホタクチン)、XCL2 (SCM-1b)、XCR1 (GPRS/CCXCR1)、YY1、ならびにZFPM2を含む。

【0178】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、例えば、Fab1およびFab2を介して、標的分子の対に結合することができる。例示的な標的分子の対は、CD137およびCD20、CD137およびEGFR、CD137およびHer-2、CD137およびPD-1、CD137およびPDL-1、VEGFおよびPD-L1、Lag-3およびTIM-3、OX40およびPD-1、TIM-3およびPD-1、TIM-3およびPDL-1、EGFRおよびDLL-4、CD138およびCD20、CDI 38およびCD40、CDI 9およびCD20、CD20およびCD3、CD3およびCD33、CD3およびCD133、CD47およびCD20、CD38およびCD138、CD38およびCD20、CD20およびCD22、CD38およびCD40、CD40およびCD20、CD-8およびIL-6、CSPGsおよびRGM A、CTLA-4およびBTN02、IGF1およびIGF2、IGF1/2およびErb2B、IGF-1RおよびEGFR、EGFRおよびCD13、IGF-1RおよびErbB3、EGFR-2およびIGFR、VEGFR-2およびMet、VEGF-Aおよびアンジオポエチン-2 (Ang-2)、IL-12およびTWEAK、IL-13およびIL-1 β 、PDGFRおよびVEGF、EPCAMおよびCD3、Her2およびCD3、CD19およびCD3、EGFRおよびHer3、CD16aおよびCD30、CD30およびPSMA、EGFRおよびCD3、CEAおよびCD3、TROP-2およびHSG、TROP-2およびCD3、MAGおよびRGM A、NgRおよびRGM A、NogoAおよびRGM A、OMGpおよびRGM A、PDL-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、RGMAおよびRGM B、Te38およ

10

20

30

40

50

びTNF α 、TNF α およびBlys、TNF α およびCD-22、TNF α およびCTLA-4ドメイン、TNF α およびGP130、TNF α およびIL-12p40、ならびにTNF α およびRANKリガンドを含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、例えば、Fab1およびFab2を介して、1つ以上のサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、および／またはサイトカイン受容体、例えば、1つもしくは対のサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、および／またはサイトカイン受容体に結合することができる。例示的なサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、および／またはサイトカイン受容体は、BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (aFGF)、FGF2 (bFGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1 (EPSILON)、FIL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、FGFR1、FGFR2、FGFR3、EGFR、ROR1、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L、A2aR、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70、CD40、PDGFB、TGF α 、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、LTA (TNF- β)、LTB、TNF (TNF- α)、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSF5 (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSF8 (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-1BBリガンド)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、FIGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (レプチン)、PTN、およびTHPOを含む。

【0180】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、例えば、Fab1およびFab2を介して、1つ以上のケモカイン、ケモカイン関連タンパク質、および／またはケモカイン受容体、例えば、1つもしくは対のケモカイン、ケモカイン関連タンパク質、および／またはケモカイン受容体に結合することができる。例示的なケモカイン、ケモカイン関連タンパク質、およびケモカイン受容体は、CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (エオタキシン)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1d)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/エクソダス-2)、CCL22 (

MDC／STC-1)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2／エオタキシン-2)、CCL25(TECK)、CCL26(エオタキシン-3)、CCL27(CTACK／ILC)、CCL28、CXCL1(GRO1)、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP 10)、CXCL11(I-TAC)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4(CXCL4)、PPBP(CXCL7)、CX3CL1(SCYD1)、SCYE1、XCL1(リンホタクチン)、XCL2(SCM-1b)、BLR1(MDR15)、CCBP2(D6／JAB61)、CCR1(CKR1／HM145)、CCR2(mcp-1RB／RA)、CCR3(CKR3／CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5／ChemR13)、CCR6(CMKBR6／CKR-L3／STRL22／DRY6)、CCR7(CKR7／EBI1)、CCRS(CMKBR8／TER1／CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CR)、XCR1(GPR5／CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CX3CR1(V28)、CXCR4、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR81(FKSGSO)、CXCR3(GPR9／CKR-L2)、CXCR6(TYMSTR／STRL33／Bonzo)、HM74、ILSRA(IL8Ra)、ILSRB(IL8Rb)、LTB4R(GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSFS、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10(C10)、EPO、FY(DARC)、GDF5、HIF1A、ILS、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2、およびVHLを含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、サイトカインの対、サイトカイン受容体、および／またはサイトカイン関連タンパク質に結合することができる。例示的なサイトカインの対は、IL-1aおよびIL-1β、IL-12およびIL-18、TNFaおよびIL-23、TNFaおよびIL-13、TNFおよびIL-18、TNFおよびIL-12、TNFおよびIL-1ベータ、TNFおよびMIF、TNFおよびIL-6、TNFおよびIL-6受容体、TNFおよびIL-17、IL-17およびIL-20、IL-17およびIL-23、TNFおよびIL-15、TNFおよびVEGF、VEGFRおよびEGFR、PDGFRおよびVEGF、IL-13およびIL-9、IL-13およびIL-4、IL-13およびIL-5、IL-13およびIL-25、IL-13およびTARC、IL-13およびMDC、IL-13およびMIF、IL-13およびTGF-β、IL-13およびLHRアゴニスト、IL-13およびCL25、IL-13およびSPRR2a、IL-13およびSPRR2b、IL-13およびADAM 8、ならびにTNFaおよびPGE4、IL-13およびPED2、ならびにTNFおよびPEG2を含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、単一のサイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカイン関連タンパク質上の少なくとも2つのエピトープに結合することができる。例示的なサイトカインは、TSLP、IL-1a、IL-1β、IL-12、IL-18、TNFa、IL-23、IL-13、MIF、IL-6、IL-6受容体、IL-17、IL-20、IL-15、VEGF、VEGFR、EGFR、PDGFR、IL-9、IL-4、IL-5、IL-25、TARC、MDC、TGF-β、LHRアゴニスト、CL25、SPRR2a、SPRR2b、ADAM 8、PGE4、PED2、およびPEG2を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、従来のフォーマットの抗体または抗体フラグメントと比較して、同様のまたはより大きな親和性でその抗原標的に結合することができる。

10

20

30

40

50

【0184】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、その標的分子に対してアゴニスト機能を有する。他の実施形態では、本開示のABMは、その抗原または標的分子に対して遮断および／またはアンタゴニスト機能を有する。

【0185】

特定の態様では、本開示のABMは、ABMのFabが由来し、例えば、従来のIgGフォーマットと比較して同様またはより低いIC₅₀を有する、親IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体などの親抗体（または親抗体の対）と比較して、その抗原または標的分子に対して同様またはより低いIC₅₀を有する。

10

【0186】

いくつかの実施形態では、本開示のABMは、単一のリガンドについて二重特異性であり、親抗体（複数可）と比較してより高いレベルで1：1リガンド複合体を形成する。

【0187】

Fab1およびFab2が同じ標的分子上の異なるエピトープに結合する場合、標的分子への結合は、好ましくは非競合性であり、すなわち、Fab1およびFab2は、標的分子への結合（例えば、エピトープが重複していた場合、発生し得る）について競合しない。抗体と抗体フラグメントとの間の結合競合を測定するためのアッセイは、当該技術分野で知られており、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、蛍光活性化細胞選別（FACS）アッセイ、および表面プラズモン共鳴アッセイを含む。

20

【0188】

標的分子への結合についての競合は、例えば、Octet HTXバイオセンサープラットフォーム（Pall ForteBio Corp.）でのリアルタイム、ラベルフリーバイオレイヤー干渉アッセイを使用して決定することができる。アッセイの具体的な実施形態では、アッセイ全体は、10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、1mg/mLのBSA、0.05% v/vの界面活性剤Tween-20、pH7.4の緩衝液（HBS-EBT緩衝液）中で25℃で、プレートを1000rpmの速度で振盪しながら行われる。2つの抗体またはその抗原結合フラグメントが、それらの特定の標的抗原上のそれぞれのエピトープへの結合について互いに競合することができるかを評価するために、ペンターHisタグ付き標的抗原（「ペンターHis」は配列番号34として開示される）は、まず抗ペンターHis抗体（「ペンターHis」は配列番号34として開示される）でコーティングされたOctetバイオセンサーチップ（ForteBio Inc.、#18-5122）上に、バイオセンサーチップをペンターHisタグ付き標的抗原（「ペンターHis」は配列番号34として開示される）を含有するウェルに浸漬することによって捕捉される。抗原捕捉バイオセンサーチップは、次いで、Ab-1の溶液（例えば、50μg/mL溶液）を含有するウェルに浸漬することによって、第1の抗体またはその抗原結合フラグメント（その後Ab-1と呼ばれる）で飽和させる。バイオセンサーチップは、次いでその後、第2の抗体またはその抗原結合フラグメント（その後Ab-2と呼ばれる）の溶液（例えば、50μg/mL溶液）を含有するウェルに浸漬される。バイオセンサーチップは、アッセイのすべてのステップ間にHBS-EBT緩衝液で洗浄される。リアルタイム結合応答をアッセイの経過全体の間モニターすることができ、すべてのステップの終了時の結合応答を記録することができる。Ab-1と予め複合体形成された標的抗原へのAb-2結合の応答を比較することができ、同じ標的抗原に対する異なる抗体／抗原結合フラグメントの競合性／非競合性挙動を決定することができる。

30

40

【0189】

様々な実施形態では、

・ABM（例えば、フォーマットA ABMまたはフォーマットB ABM）は、Fab3およびFab4を含まず、Fab1およびFab2は、同じ標的分子上の同じまたは異なるエピトープに結合し、

50

・ A B M（例えば、フォーマット A A B Mまたはフォーマット B A B M）は、F a b 3 および F a b 4 を含まず、F a b 1 および F a b 2 は、異なる標的分子に結合し、

・ A B M（例えば、フォーマット C A B M）は、非結合 F a b 3 および非結合 F a b 4 を含み、F a b 1 および F a b 2 は、同じ標的分子上の同じまたは異なるエピトープに結合し、

・ A B M（例えば、フォーマット C A B M）は、非結合 F a b 3 および非結合 F a b 4 を含み、F a b 1 および F a b 2 は、異なる標的分子に結合し、

・ A B M（例えば、フォーマット C A B M）は、結合 F a b 3 および結合 F a b 4 を含み、F a b 1 および F a b 2 は、同じエピトープに結合し、F a b 3 および F a b 4 は、F a b 1 および F a b 2 によって結合される標的分子と同じ、または異なる標的分子上のいずれかで、F a b 1 および F a b 2 によって結合されるエピトープとは異なる同じエピトープに結合し、

・ A B M（例えば、フォーマット C A B M）は、結合 F a b 3 および結合 F a b 4 を含み、F a b 1 および F a b 3 は、同じエピトープに結合し、F a b 2 および F a b 4 は、F a b 1 および F a b 3 によって結合される標的分子と同じ、または異なる標的分子上のいずれかで、F a b 1 および F a b 3 によって結合されるエピトープとは異なる同じエピトープに結合する。

【0190】

F a b 1、F a b 2、F a b 3、および F a b 4 のうちの2つ以上が、標的分子上の同じエピトープに結合する場合、そのような F a b ドメインは、同じもしくは異なる重鎖 C D R 配列および／または同じもしくは異なる V H 配列を有することができる。任意に、それらは、同じまたは異なる V L 配列を有することができる。

【0191】

理論によって拘束されることなく、本開示の A B M は、天然構成を有する親単一特異性抗体または二重特異性抗体よりも大きな親和性で標的分子に結合する利点を有すると考えられている。したがって、本開示の A B M は、いくつかの実施形態では、天然構成を有する親単一特異性抗体または二重特異性抗体よりも大きな親和性で1つ以上の標的分子に結合することができる。例えば、A B M は、いくつかの実施形態では、細胞ベースの結合アッセイにおいて対応する親単一特異性抗体または二重特異性抗体よりも（例えば、セクション 7 に記載されるように）標的分子への結合についてより低い K_D を有し、かつ／またははより強力な $E C_{50}$ 値を有することができる。

【0192】

所与の抗体または A B M のアゴニストまたはアンタゴニスト活性は、標的選択、エピトープカバレッジ、およびフォーマットの選択に依存する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗体の特定は、例えば、機能に基づくスクリーニングを通して、達成することができる。本開示の A B M フォーマットは、小可溶性分子に対するアンタゴニスト活性にとって特に有利である。

【0193】

6. 4. 抗体薬物コンジュゲート

本開示の A B M は、特に、A B M ががん治療剤としての使用を意図した場合、例えば、リンカーを介して、薬物部分にコンジュゲートすることができる。そのようなコンジュゲートは、便宜上、本明細書では抗体-薬物コンジュゲート（または「A D C」）と呼ばれる。

【0194】

特定の態様では、薬物部分は、細胞毒性または細胞増殖抑制活性を発揮する。一実施形態では、薬物部分は、メイタンシノイド、キネシン様タンパク質 K I F 1 1 阻害剤、V - A T P アーゼ（液胞型 H + - A T P アーゼ）阻害剤、アポトーシス促進剤、B c l 2（B 細胞リンパ腫 2）阻害剤、M C L 1（骨髄細胞白血病 1）阻害剤、H S P 9 0（熱ショックタンパク質 9 0）阻害剤、I A P（アポトーシスの阻害剤）阻害剤、m T O R（ラパマイシンの機械的標的）阻害剤、微小管安定剤、微小管不安定剤、オーリスタチン、ドラス

10

20

30

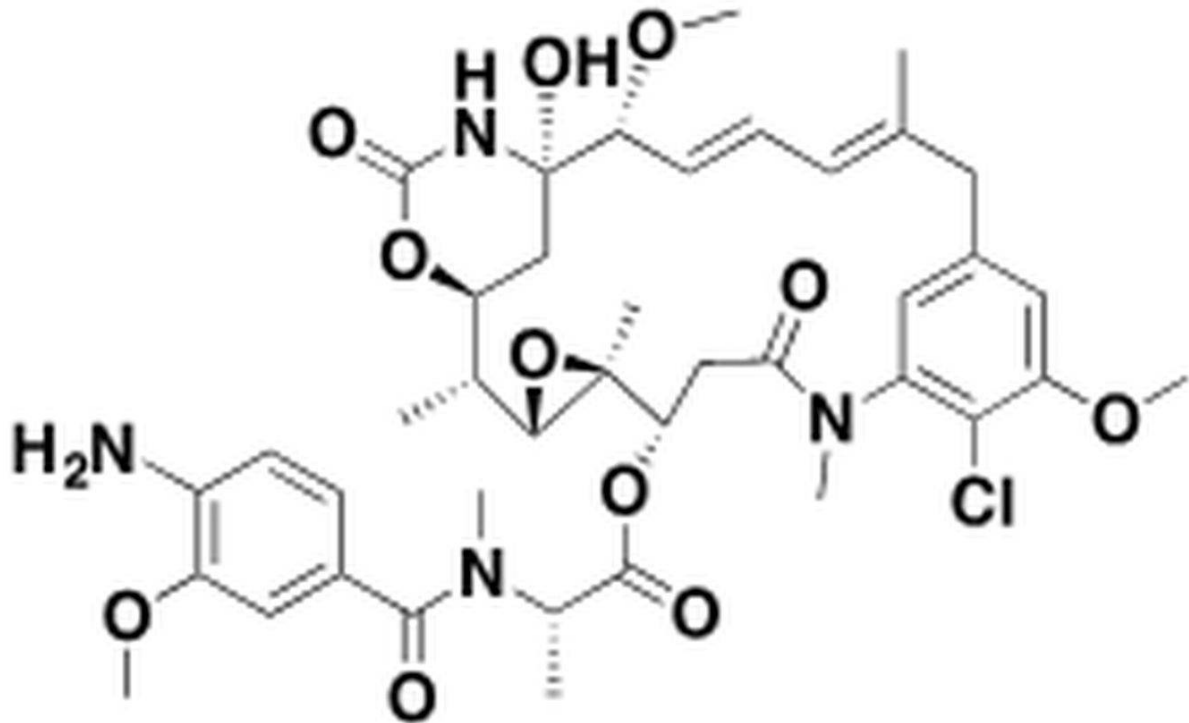
40

50

タチン、MetAP（メチオニンアミノペプチダーゼ）、CRM1（染色体維持1）阻害剤、DPPIV（ジペプチジルペプチダーゼIV）阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、CDK2（サイクリン依存性キナーゼ2）阻害剤、CDK9（サイクリン依存性キナーゼ9）阻害剤、キネシン阻害剤、HDAC（ヒストンデアセチラーゼ）阻害剤、DNA損傷剤、DNAアルキル化剤、DNA挿入剤、DNA副溝結合剤、RNAポリメラーゼ阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはDHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）阻害剤から選択される。

【0195】

いくつかの実施形態では、細胞毒性剤は、以下の構造を有するメイタンシノイドである。
【化1】



【0196】

いくつかの実施形態では、細胞毒性剤は、以下の構造を有するメイタンシノイドである。

10

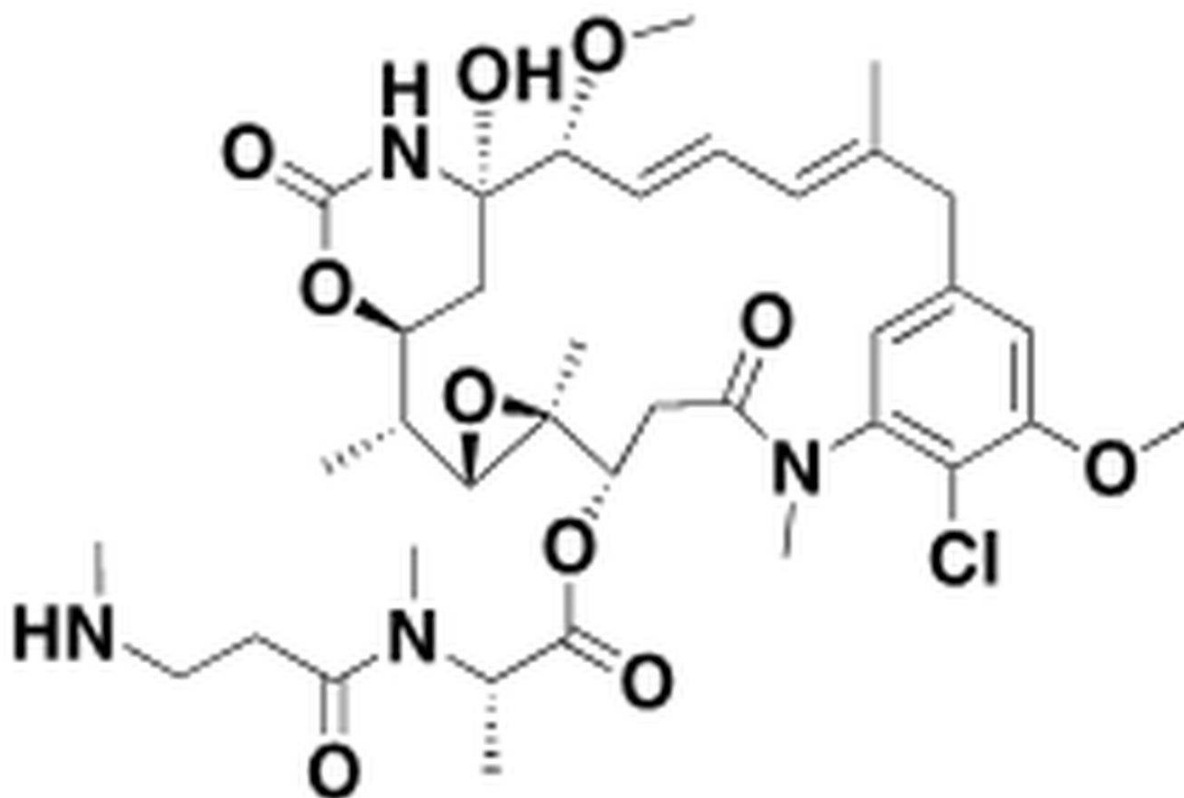
20

30

40

50

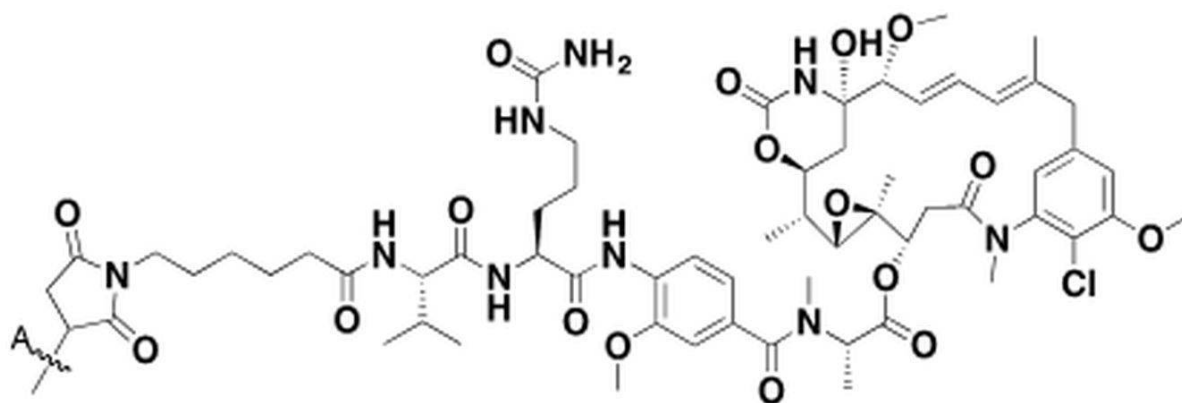
【化 2】



【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、ADCは、本開示のABMを含み、

【化 3】



【化 4】



は、ABMへの結合である。

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、本開示のABMを含み、

10

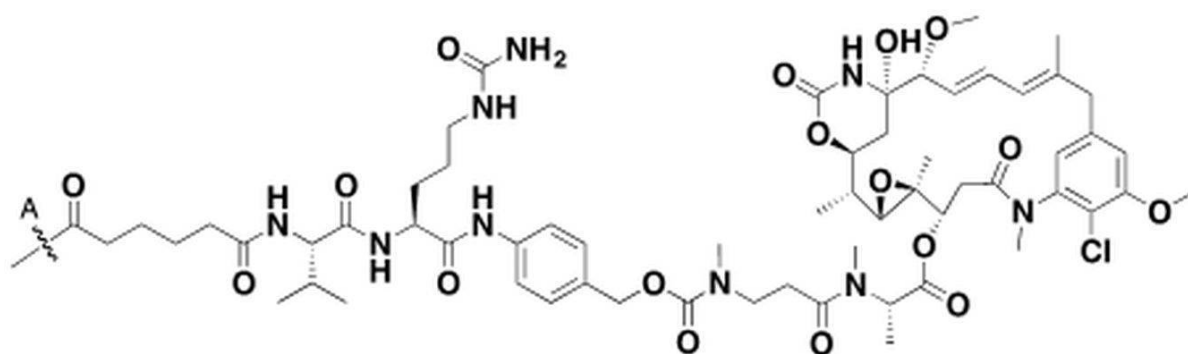
20

30

40

50

【化 5】



10

【 0 1 9 9 】

【化 6】



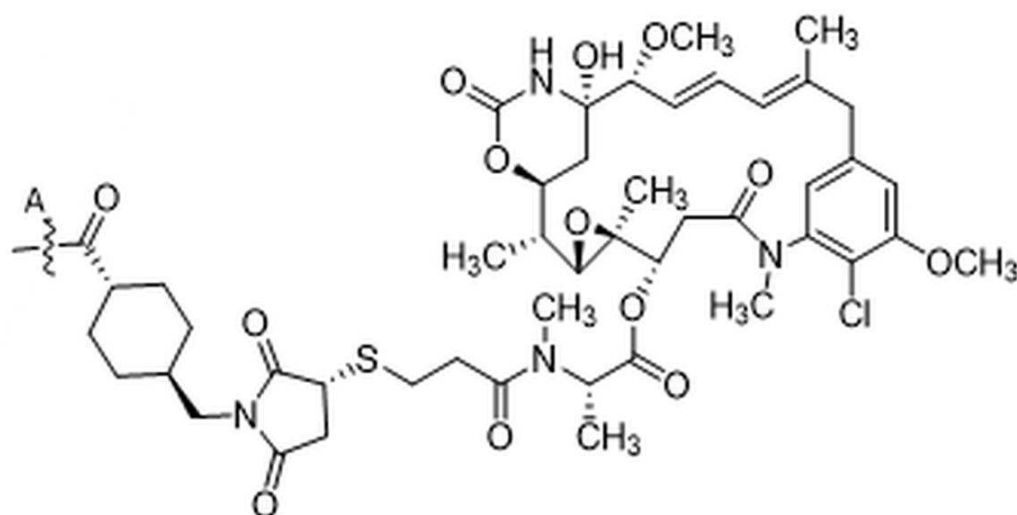
は、A B Mへの結合である。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態では、A D Cは、本開示のA B Mおよび

【化 7】

20



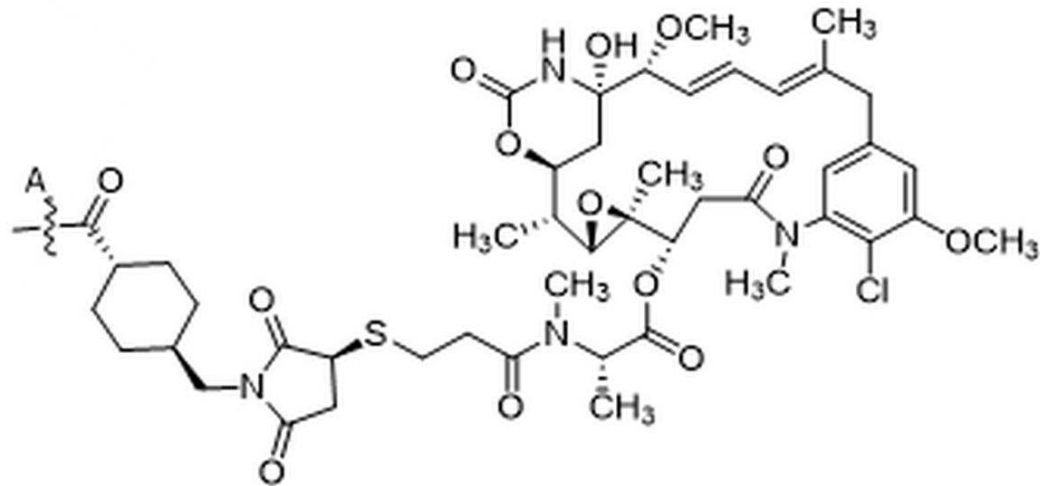
30

、または

40

50

【化 8】



10

、または
それらの混合物を含み、

【化 9】

20



は、本開示の A B M への結合である。

【0201】

いくつかの実施形態では、結合は、システイン残基の硫黄成分を介して A B M に連結される。

【0202】

いくつかの実施形態では、結合は、リジン残基の窒素成分を介して A B M に連結される。

【0203】

本開示の A D C では、細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤は、A D C リンカーによって A B M に連結される。細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤を A D C の A B M に連結する A D C リンカーは、短、長、疎水性、親水性、可撓性、もしくは剛性であり得るか、またはリンカーが異なる特性を有するセグメントを含み得るように、各々独立して上記の特性のうちの 1 つ以上を有するセグメントで構成され得る。リンカーは、2 つ以上の薬剤を A B M 上の単一の部位に共有的に連結するように多価であり得るか、または共有的にそれらが単一の薬剤を A B M 上の単一の部位に連結するように一価であり得る。

30

【0204】

特定の態様では、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性リンカー、プロ荷電リンカー、またはジカルボン酸ベースのリンカーから選択される。

40

【0205】

当業者によって理解されるように、A D C リンカーは、1 つ場所で細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤への共有連結、ならびに別の場所で A B M への共有連結を形成することによって、細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤を A B M に連結する。共有連結は、A D C リンカー上の官能基と薬剤および A B M 上の官能基との間の反応によって形成される。

【0206】

A D C リンカーは、好ましくは、細胞外で条件に対して化学的に安定であるが、そうである必要はなく、細胞内で切断、破壊、および／または他の方法で特異的に分解するように設計され得る。あるいは、細胞内で特異的に切断または分解するように設計されない A

50

D C リンカーが使用され得る。安定対不安定 A D C リンカーの選択は、細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤の毒性に依存し得る。正常細胞に毒性である薬剤について、安定リンカーが好ましい。選択的であるか、または標的化され、正常細胞に対してより低い毒性を有する薬剤が利用され得、細胞外環境に対する A D C リンカーの化学的安定性はあまり重要ではない。A D C の文脈で薬物を A B M に連結するために有用な多種多様な A D C リンカーは、当該技術分野で知られている。これらの A D C リンカー、および他の A D C リンカーのいずれかは、細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤を本開示の A D C の A B M に連結するために使用され得る。

【0207】

多くの細胞毒性剤および／または細胞増殖抑制剤を単一の A B M 分子に連結するために使用され得る例示的な多価 A D C リンカーは、例えば、WO 2 0 0 9 / 0 7 3 4 4 5、WO 2 0 1 0 / 0 6 8 7 9 5、WO 2 0 1 0 / 1 3 8 7 1 9、WO 2 0 1 1 / 1 2 0 0 5 3、WO 2 0 1 1 / 1 7 1 0 2 0、WO 2 0 1 3 / 0 9 6 9 0 1、WO 2 0 1 4 / 0 0 8 3 7 5、WO 2 0 1 4 / 0 9 3 3 7 9、WO 2 0 1 4 / 0 9 3 3 9 4、WO 2 0 1 4 / 0 9 3 6 4 0 に記載され、その内容は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、Mersana によって開発された Fleximer リンカー技術は、良好な物理化学的特性を有する高 D A R A D C を可能にする潜在性を有する。Mersana 技術は、一連のエステル結合を介して、薬物分子を可溶化ポリアセタール骨格に組み込むことに基づく。方法論は、良好な物理化学的特性を維持しながら、高負荷 A D C (最大 2 0 の D A R) を与える。

【0208】

使用され得る例示的な一価 A D C リンカーは、例えば、Nolting, 2013, Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology 1045: 71-100、Ducry et al., 2010, Bioconjugate Chem. 21: 5-13、Zhao et al., 2011, J. Med. Chem. 54: 3606-3623、米国特許第 7, 223, 837 号、米国特許第 8, 568, 728 号、米国特許第 8, 535, 678 号、および WO 2 0 0 4 / 0 1 0 9 5 7 に記載され、これらの各々は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0209】

限定ではなく例として、本開示の A D C に含まれ得るいくつかの切断可能および切断不可能な A D C リンカーを以下に記載する。

【0210】

特定の実施形態では、選択された A D C リンカーは、インビボで切断可能である。切断可能な A D C リンカーは、化学的または酵素的に不安定なまたは分解可能な連結を含み得る。切断可能な A D C リンカーは、一般に、細胞質における還元、リソソームにおける酸性条件への曝露、細胞内の特定のプロテアーゼまたは他の酵素による切断などの、薬物を遊離させる細胞内部のプロセスに依存する。切断可能な A D C リンカーは、一般に、化学的または酵素的のいずれかで切断可能な 1 つ以上の化学結合を組み込むが、A D C リンカーの残部は切断不可能である。特定の実施形態では、A D C リンカーは、ヒドラゾンおよび／またはジスルフィド基などの化学的に不安定な基を含む。化学的に不安定な基を含むリンカーは、血漿といくつかの細胞質コンパートメントとの間の異なる特性を利用する。ヒドラゾン含有 A D C リンカーの薬物放出を促進する細胞内条件は、エンドソームおよびリソソームの酸性環境であるが、ジスルフィド含有 A D C リンカーは、高チオール濃度、例えば、グルタチオンを含有する、サイトゾルにおいて還元される。特定の実施形態では、化学的に不安定な基を含む A D C リンカーの形質安定性は、化学的に不安定な基の近くの置換基を使用して立体障害を導入することによって増加され得る。

【0211】

切断可能な A D C リンカーは、切断不可能な部分もしくはセグメントを含み得、かつ／または切断可能なセグメントもしくは部分は、そうでなければ切断不可能な A D C リンカ

ーに含まれ、それを切断可能にし得る。ほんの一例として、ポリエチレングリコール（PEG）および関連ポリマーは、ポリマー骨格に切断可能な基を含み得る。例えば、ポリエチレングリコールまたはポリマーADCリンカーは、ジスルフィド、ヒドラゾン、またはジペプチドなどの1つ以上の切断可能な基を含み得る。

【0212】

ADCリンカーに含まれ得る他の分解可能な連結は、PEGカルボン酸または活性化PEGカルボン酸の、生物学的活性剤上のアルコール基との反応によって形成されるエステル連結を含み、そのようなエステル基は、一般に、生理学的条件下で加水分解して、生物学的活性剤を放出する。加水分解的に分解可能な連結は、これらに限定されないが、炭酸塩連結；アミンおよびアルデヒドの反応から生じるイミン連結；アルコールをリン酸塩基と反応させることによって形成されるリン酸エステル連結；アルデヒドおよびアルコールの反応産物であるアセタール連結；ギ酸塩およびアルコールの反応産物であるオルトエステル連結；ならびにポリマーの末端、およびオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基を含むが、これらに限定されない、ホスホラミダイト基によって形成されるオリゴヌクレオチド連結を含む。

【0213】

特定の実施形態では、ADCリンカーは、酵素的に切断可能なペプチド部分、例えば、トリペプチドまたはジペプチドを含む。特定の実施形態では、ジペプチドは、Val-Cit、Cit-Val、Ala-Ala、Ala-Cit、Cit-Ala、Asn-Cit、Cit-Asn、Cit-Cit、Val-Glu、Glu-Val、Ser-Cit、Cit-Ser、Lys-Cit、Cit-Lys、Asp-Cit、Cit-Asp、Ala-Val、Val-Ala、Phe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg、およびTrp-Citから選択される。特定の実施形態では、ジペプチドは、Cit-Val、およびAla-Valから選択される。

【0214】

上記または本明細書で論じられるADCの様々な実施形態のいずれにおいても、ADCは、1～20、より典型的には2～10の範囲の薬物：抗体比（または、この場合、薬物：ABM比）を有することができる。

【0215】

6.5. 核酸および宿主細胞

別の態様では、本開示は、本開示のABMをコードする核酸を提供する。いくつかの実施形態では、ABMは、単一の核酸によってコードされる。他の実施形態では、ABMは、複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の）核酸によってコードされる。

【0216】

単一の核酸は、単一のポリペプチド鎖を含むABM、2つ以上のポリペプチド鎖を含むABM、または3つ以上のポリペプチド鎖を含むABMの一部をコードすることができる（例えば、単一の核酸は、3つ、4つ以上のポリペプチド鎖を含むABMの2つのポリペプチド鎖、または4つ以上のポリペプチド鎖を含むABMの3つのポリペプチド鎖をコードすることができる）。別個の発現の制御のために、2つ以上のポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレームを、別個の転写調節要素（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）の制御下に置くことができる。2つ以上のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームはまた、同じ転写調節要素によって制御され、内部リボソーム進入部位（IRES）配列によって分離され、別個のポリペプチドへの翻訳を可能にし得る。

【0217】

いくつかの実施形態では、2つ以上のポリペプチド鎖を含むABMは、2つ以上の核酸によってコードされる。ABMをコードする核酸の数は、ABM中のポリペプチド鎖の数以下（例えば、2つ以上のポリペプチド鎖が単一の核酸によってコードされる場合）であり得る。

【0218】

本開示の核酸は、DNAまたはRNA（例えば、mRNA）であり得る。

【0219】

別の態様では、本開示は、本開示の核酸を含有する宿主細胞およびベクターを提供する。核酸は、本明細書に以下でより詳細に記載されるように、単一のベクターまたは同じ宿主細胞もしくは別個の宿主細胞に存在する別個のベクターに存在し得る。

【0220】

6.5.1. ベクター

本開示は、本明細書に記載されるABMまたはABM成分をコードするヌクレオチド配列、例えば、半抗体のポリペプチド鎖のうちの1つまたは2つを含むベクターを提供する。ベクターには、これらに限定されないが、ウイルス、プラスミド、コスミド、ラムダファージ、または酵母人工染色体（YAC）が含まれる。

【0221】

多数のベクターシステムを使用することができる。例えば、1つのクラスのベクターは、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス、MMTV、またはMOMLV）、またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNA要素を利用する。別のクラスのベクターは、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、およびフラビウイルスなどのRNAウイルスに由来するRNA要素を利用する。

【0222】

加えて、DNAをそれらの染色体に安定して組み込んだ細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択することができる。マーカーは、例えば、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）、または銅などの重金属に対する耐性などを提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結するか、または同時形質転換によって同じ細胞に導入することができる。mRNAの最適な合成には、追加の要素が必要な場合もある。これらの要素は、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。

【0223】

構築物を含有する発現ベクターまたはDNA配列が発現のために調製されると、発現ベクターは、トランスフェクトするか、または適切な宿主細胞に導入することができる。これを達成するために、例えば、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、レトロウイルス形質導入、ウイルストランスフェクション、遺伝子銃、脂質ベースのトランスフェクション、または他の従来の技法などの、様々な技法が使用され得る。得られるトランスフェクトされた細胞を培養し、発現されたポリペプチドを回収するための方法および条件は、当業者に知られており、本記載に基づいて、使用される特定の発現ベクターおよび哺乳動物宿主細胞に応じて変更または最適化され得る。

【0224】

6.5.2. 細胞

本開示はまた、本開示の核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0225】

一実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載される1つ以上の核酸を含むように遺伝子操作される。

【0226】

一実施形態では、宿主細胞は、発現カセットを使用することによって遺伝子操作される。「発現カセット」という句は、そのような配列と適合性の宿主における遺伝子の発現に影響を与えることができる、ヌクレオチド配列を指す。そのようなカセットは、プロモーター、イントロンを伴うまたは伴わないオープンリーディングフレーム、および終結シグナルを含み得る。例えば、誘導性プロモーターなどの、発現をもたらすのに必要または有用な追加の因子も使用され得る。

【0227】

本開示はまた、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0228】

細胞は、これらに限定されないが、真核細胞、細菌細胞、昆虫細胞、またはヒト細胞であり得る。好適な真核細胞には、Vero細胞、HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞、およびMDCKII細胞が含まれるが、これらに限定されない。好適な昆虫細胞には、Sf9細胞が含まれるが、これに限定されない。

【0229】

6.6. 薬学的組成物

本開示のABMおよび／またはADCは、ABMおよび／またはADCならびに1つ以上の担体、賦形剤、および／または希釈剤を、任意に、改善された移動、送達、耐性などを提供する1つ以上の他の薬剤とともに含む、組成物の形態であり得る。組成物は、ヒトにおける薬学的使用または獣医使用などの特定の使用のために製剤化され得る。組成物の形態（例えば、乾燥粉末、液体製剤など）、ならびに使用される賦形剤、希釈剤、および／または担体は、ABMおよび／またはADCの意図される使用、ならびに治療上の使用について、投与様式に依存する。

【0230】

患者に投与される、単一特異性抗原結合分子または二重特異性抗原結合分子などの抗原結合分子の用量は、患者の年齢および大きさ、標的疾患、状態、投与経路などに応じて変動し得る。好ましい用量は、典型的には、体重または体表面積に従って計算される。本開示の二重特異性抗原結合分子が成人患者において治療目的に使用される場合、本開示の抗原結合分子を、通常約0.01～約20mg/kg体重の単一用量で、より好ましくは約0.02～約7、約0.03～約5、または約0.05～約3mg/kg体重の単一用量で静脈内投与することが有利であり得る。状態の重症度に応じて、治療の頻度および期間を調整することができる。抗原結合分子を投与するための有効投与量およびスケジュールは、経験的に決定され、例えば、患者の経過は、定期的な評価によってモニターし、それに応じて用量を調整することができる。さらに、投与量の種間スケールリングは、当該技術分野において周知の方法を使用して実施することができる（例えば、Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351）。

【0231】

治療使用について、組成物は、薬学的に許容される担体を含む無菌薬学的組成物の一部として供給され得る。この組成物は、（それを患者に投与する所望の方法に応じて）任意の好適な形態であり得る。薬学的組成物は、経口、経皮、皮下、鼻腔内、静脈内、筋肉内、腫瘍内、髄腔内、局所（topically）、または局所（locally）などの様々な経路によって患者に投与することができる。任意の所与の場合における投与に最も適した経路は、特定の抗体および／またはADC、対象、ならびに疾患の性質および重症度ならびに対象の体調に依存するであろう。典型的には、薬学的組成物は、静脈内または皮下に投与されるであろう。

【0232】

薬学的組成物は、用量当たりの本開示の所定量のABMおよび／またはADCを含有する単位剤形で便利に提示することができる。単位用量に含まれるABMおよび／またはADCの量は、治療される疾患、および当該技術分野で周知の他の因子に依存するであろう。そのような単位投与量は、単回投与に適した量のABMおよび／もしくはADCを含有する凍結乾燥された乾燥粉末の形態、または液体の形態であり得る。乾燥粉末単位剤形は、シリンジ、好適な量の希釈剤、および／または投与に有用な他の成分を備えたキットに包装され得る。液体形態の単位投与量は、単回投与に適した量のABMおよび／またはADCが予め充填されたシリンジの形態で便利に供給され得る。

【0233】

薬学的組成物はまた、複数回の投与に適した量のADCを含有することから大量に供給され得る。

【0234】

薬学的組成物は、所望の純度を有するABMおよび／またはADCを、当該技術分野で典型的に使用される任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（これらのすべては本明細書で「担体」として参照される）、すなわち、緩衝剤、安定剤、防腐剤、等張剤、非イオン性洗浄剤、抗酸化剤、および他の種々の添加剤と混合することによって、凍結乾燥された製剤または水溶液としての保存のために調製され得る。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980) を参照されたい。そのような添加剤は、使用される投与量および濃度でレシピエントに無毒であるべきである。

【0235】

緩衝剤は、生理学的条件に近い範囲のpHを維持するのに役立つ。それらは、多種多様な濃度で存在し得るが、典型的には、約2mM～約50mMの範囲の濃度で存在するであろう。本開示での使用に適した緩衝剤には、有機および無機酸の両方、ならびにそれらの塩、例えば、クエン酸塩緩衝液（例えば、クエン酸－ナトリウム－クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸－クエン酸－ナトリウム混合物など）、コハク酸塩緩衝液（例えば、コハク酸－コハク酸－ナトリウム混合物、コハク酸－水酸化ナトリウム混合物、コハク酸－コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸塩緩衝液（例えば、酒石酸－酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸－酒石酸カリウム混合物、酒石酸－水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸塩緩衝液（例えば、フマル酸－フマル酸－ナトリウム混合物、フマル酸－フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸－ナトリウム－フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸塩緩衝液（例えば、グルコン酸－グリコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸－水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸－グリコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸塩緩衝液（例えば、シュウ酸－シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸－水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸－シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸塩緩衝液（例えば、乳酸－乳酸ナトリウム混合物、乳酸－水酸化ナトリウム混合物、乳酸－乳酸カリウム混合物など）、および酢酸塩緩衝液（例えば、酢酸－酢酸ナトリウム混合物、酢酸－水酸化ナトリウム混合物など）が含まれる。加えて、リン酸塩緩衝液、ヒスチジン緩衝液、およびトリスなどのトリメチルアミン塩を使用することができる。

【0236】

防腐剤は、微生物成長を遅らせるために添加され得、約0.2%～1%（w/v）の範囲の量で添加することができる。本開示での使用に適した防腐剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、ハロゲン化ベンザルコニウム（例えば、塩化物、臭化物、およびヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウム、およびアルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、ならびに3－ペンタノールが含まれる。「安定剤」として知られる等張化剤は、本開示の液体組成物の等張性を確保するために添加することができ、多価糖アルコール、例えば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、およびマンニトールなどの三価または高級糖アルコールを含む。安定剤とは、増量剤から、治療剤を可溶化するか、または変性もしくは容器壁への接着を防止するのを助ける添加剤まで、機能の範囲が及び得る幅広いカテゴリーの賦形剤を指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール（上記に列挙される）；アミノ酸、例えば、アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L－ロイシン、2－フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど、有機糖または糖アルコール、例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール、ガラクトクトール、グリセロールなど（シクリトール、例えば、イノシトールを含む）；ポリエチレングリコール；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α －モノチオグリセロール、およびチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（例えば、10残基以下のペプチド）；タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清ア

10

20

30

40

50

ルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン単糖類、例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース；二糖類、例えば、ラクトース、マルトース、スクロース、およびトレハロース；ならびに三糖類、例えば、ラフィノース；ならびに多糖類、例えば、デキストランであり得る。安定剤は、ADCの重量当たり0.5～10重量%の範囲の量で存在し得る。

【0237】

非イオン性界面活性剤または洗浄剤（「湿潤剤」としても知られる）は、糖タンパク質を可溶化するのを助け、糖タンパク質を攪拌によって誘導される凝集に対して保護するために添加され得、これはまた、製剤が、タンパク質の変性を引き起こすことなく応力を印加されたせん断表面に曝露されることを可能にする。好適な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート（20、80など）、ポリオキサマー（184、188など）、およびブルコニックポリオールが含まれる。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/mL～約1.0mg/mL、例えば、約0.07mg/mL～約0.2mg/mLの範囲で存在し得る。

【0238】

追加の種々の賦形剤には、増量剤（例えば、デンプン）、キレート剤（例えば、EDTA）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE）、および共溶媒が含まれる。

【0239】

6.7. 治療適応症

本開示のABM、ADC、および薬学的組成物は、本開示のABMによって結合される抗原または標的分子に関連する状態、例えば、抗原もしくは標的分子の異常な発現もしくは活性または抗原もしくは標的分子を発現する異常な細胞もしくは組織に関連する状態を治療するために使用することができる。本開示のABM、ADC、および薬学的組成物は、それを必要とする対象、例えば、ABMが結合する抗原または標的分子の異常な発現または活性に関連する状態の1つ以上の症状または兆候を示すヒトまたは非ヒト動物に投与することができる。

【0240】

いくつかの実施形態では、本開示のABM、ADC、または薬学的組成物は、抗原または標的分子の刺激、活性化、および／または標的化が望まれる任意の疾患または障害を治療するために投与される。特定の実施形態では、本発明のABMは、抗原または標的分子の発現または活性に関連するか、またはそれによって媒介される任意の疾患または障害の治療、予防、および／または改善に使用され得る。

【0241】

本開示のABMは、胸腺間質性リンホポイエチン（「TSLP」）、例えば、ヒトTSLPに結合する1つ以上のFabドメイン（例えば、Fab1および／またはFab2）を含有するABMによって例示することができる。TSLPは、プロアロジェニック表現型で樹状細胞媒介性CD4⁺T細胞応答を誘導する免疫サイトカインである（Gillet et al., 2003, J. Exp. Medicine 197(8):1059-1063）。TSLPは、アレルギー性炎症の開始に関与している（Watanabe et al., 2004, Nature Immunology 5:426-434）。TSLPは、広範囲の細胞型（例えば、樹状細胞、CD4⁺T細胞、好酸球、好塩基球、肥満細胞、および2型自然リンパ球系細胞（ILC2）（Mjosberg et al., 2012, Immunity 37(4):649-59）に作用して、炎症、および特に、2型炎症（サイトカインIL-5、IL-13、およびIL-4の産生を特徴とする）を駆動する。2型炎症は、喘息ならびにアトピー性皮膚炎およびネザートン症候群などの他のアレルギー性疾患の特徴である。TSLPは、線維性障害の促進における追加の役割を示す動物における線維芽細胞蓄積およびコラーゲン沈着を誘導することがわかっている。

【0242】

したがって、T S L P アンタゴニストである A B M は、炎症性、および特にアレルギー性炎症性、ならびに線維性障害の治療に有用である。T S L P に（単一特異的または二重特異的のいずれかで）結合する A B M は、治療を必要とする対象、例えば、ヒト対象において T S L P シグナル伝達に関連した状態を治療するために使用することができる。T S L P シグナル伝達に関連した例示的な状態には、喘息、特発性肺線維症、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、ネザートン症候群、好酸球性食道炎（E o E）、食物アレルギー、アレルギー性下痢、好酸球性胃腸炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（A B P A）、アレルギー性真菌性副鼻腔炎、がん、リウマチ性関節炎、C O P D、全身性硬化症、ケロイド、潰瘍性大腸炎、慢性鼻副鼻腔炎（C R S）、鼻ポリポーシス、慢性好酸球性肺炎、好酸球性気管支炎、セリアック病、チャージーストラウス症候群、好酸球性筋痛症候群、高好酸球性症候群、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、および炎症性腸疾患が含まれる。

【0243】

7. 実施例

7. 1. 実施例 1：代替フォーマット抗原結合分子の構築

サイトカインファミリーに属し、約 15～18 kDa（グリコシル化の状態に応じて）の分子量を有するタンパク質である、ヒト T S L P の代替フォーマット二重特異性 A B M の構築のために、非競合性親 m A b を選択した。これらの親 m A b は、共通の軽鎖を共有する。すべてのヘテロダイマー二重特異性 A B M を、F c ヘテロダイマー形成を促進するために、F c 領域に「ノブイントゥホール」変異で構築した（Merchant et al., 1998, Nat Biotechnol. 16:677-681）。F c - F a b フォーマット（図 1 B および図 2 B）について、（G 4 S）_n リンカー（G 4 S は配列番号 3 として開示される）、n = 1～6 を使用して V H - C H 1 フラグメントを F c の C 末端に接続することによって、重鎖を構築した。クランプフォーマット（図 3 B）では、内部 F a b フラグメントは、不活性であり、T S L P に結合しない。この不活性 F a b フラグメントは、リーチフォーマット（図 3 A）において、可撓性の長い（G 4 S）_n リンカー（G 4 S は配列番号 3 として開示される）、n = 6～8 で置き換えられる。2 + 2 タンデム F a b フォーマットでは、すべての 4 つの F a b フラグメントは、機能的であり、抗原に結合することができる（図 3 C～3 D）。クランプにおける F a b フラグメントと 2 + 2 タンデム F a b フォーマットとの間の短いリンカーは、2 x G 4 S（配列番号 18）または 3 x G 4 S（配列番号 4）である。

【0244】

同様に、非競合性親 m A b を、ヒトリガンド X の二重特異性 F c - F a b の構築のために選択した。これらの親抗リガンド X m A b は、共通の軽鎖を共有する。

【0245】

細胞表面標的について、F c - F a b を、二重特異性 F c - F a b に共通の軽鎖を共有する F a b フラグメントを使用し、低減したエフェクター機能を有する h I g G 4（h I g G 4 s として示される）（U S 9 3 5 9 4 3 7 B 2）または h I g G 1 のいずれかの定常領域を使用して、同様の方法で構築した。

【0246】

ヒト I g G 4 定常領域を使用するすべての抗体は、半抗体形成を最小限に抑えるために、ヒンジ領域に S 2 2 8 P（E U）置換を含有する（Labrijn et al., 2009, Nat Biotechnol. 27:767-771）。

【0247】

7. 2. 実施例 2：抗原結合分子の発現

すべての代替フォーマット二重特異性 A B M を、E x p i 2 9 3 F 細胞（Thermo Fisher Scientific）における一過性トランスフェクションによって発現した。E x p i 2 9 3 F 上清中の A B M を、H i T r a p r P r o t e i n A F F カラム（G E H e a l t h c a r e）を備える P r o t e i n M a k e r システム（P r o t e i n B i o S o l u t i o n s、G a i t h e r s b u r g、MD）を使用して

精製した。単一ステップ溶出後、ABMを中和し、5%グリセロールを含むリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)の最終緩衝液に透析し、アリコートし、-80℃で保存した。

【0248】

7.3. 実施例3: バイオアッセイにおける抗hTSLP二重特異性ABMの活性

精製された抗hTSLP二重特異性ABMを、ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてhTSLP活性を阻害するそれらの能力について評価した。hIL-7R、hTSLPR、およびSTAT3-ルシフェラーゼレポーターを安定して発現するBaf3細胞を、IL-3を含まない培地に40,000細胞/ウェルで播種し、一晚インキュベートした。hTSLP用量応答曲線について、1:3段階希釈hTSLPを、10nMで開始するhTSLPの最終濃度で、各ウェルに添加した(図4A)。抗hTSLP ABMの遮断活性を決定するために、ABMおよびhTSLPがレポーター細胞に同時に添加された「レースフォーマット」遮断アッセイを使用した。抗hTSLP ABMを、100nMで開始する各抗体の最終濃度で、1:3で段階希釈した。ヒトTSLPを、TSLP用量応答曲線の約EC50で一定濃度まで添加した。5.5時間のインキュベーション後、プレート室温で15分間平衡化した。100μlのOne-Glo基質(Promega)を各ウェルに加えた。室温で5分のインキュベーション後、発光をEnvisionで測定した。STAT3-ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける3つの非競合性抗hTSLP親抗体、30206、30217、および30230の活性を図4Bに示す。これらの親mAbを使用した3つの二重特異性対形成を試験した。従来のhIgG4二重特異性抗体は、対応する親抗体組み合わせと同様の遮断活性を示した(図5)。各二重特異性対形成について、すべての代替フォーマット二重特異性ABMは、従来のhIgG4二重特異性抗体よりも良好な遮断活性を示した(図6A~6C)。全体として、最良のフォーマットは、Fc-Fab(図13Aに示されるヒンジ構成を有する)および試験されたすべての二重特異性対形成の2+2タンデムFabヘテロダイマーである。これらのABMのIC50値を、表5-1にまとめる。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 5-1 hTSLP 遮断バイオアッセイにおける TSLP ABM の IC50 値	
hTSLP EC50[M]	4.35E-11
定常 hTSLP 阻害アッセイ	100pM
抗 TSLP	レースフォーマットの IC50 阻害アッセイ
30206-IgG4	6.64E-10
30217-IgG4	9.83E-10
30230-IgG4	>1.0E-07
30206x30217 二重特異性	
二重特異性 IgG4	1.86E-10
Fc-Fab_2xG4S(「2xG4S」は配列 番号 18 として開示される)	7.99E-11
Fc-Fab_4xG4S(「4xG4S」は配列 番号 19 として開示される)	6.48E-11
クランプ	1.27E-10
リーチ	1.07E-10
2+2 タンデム Fab_het	5.20E-11
2+2 タンデム Fab_ho	1.08E-10
30206x30230 二重特異性	
二重特異性 IgG4	1.74E-09
Fc-Fab_2xG4S(「2xG4S」は配列 番号 18 として開示される)	1.54E-10
Fc-Fab_4xG4S(「4xG4S」は配列 番号 19 として開示される)	1.70E-10
クランプ	4.70E-10
リーチ	1.28E-09
2+2 タンデム Fab_het	2.33E-10
2+2 タンデム Fab_ho	5.18E-10
30217x30230 二重特異性	
二重特異性 IgG4	1.30E-09
Fc-Fab_2xG4S(「2xG4S」は配列 番号 18 として開示される)	7.32E-11
Fc-Fab_4xG4S(「4xG4S」は配列 番号 19 として開示される)	7.63E-11
クランプ	1.39E-10
リーチ	3.82E-10
2+2 タンデム Fab_het	1.15E-10
2+2 タンデム Fab_ho	1.66E-10

【0249】

7. 4. 実施例 4：多角度レーザー光散乱）と組み合わせられた非対称流場流分画（A4F-MALLS）による抗 hTSLP 二重特異性抗体と組換え hTSLP との間で形成されたインビトロ複合体のサイズ分析

7. 4. 1. 概要

以下の表 5-2 に特定される抗 TSLP ABM と組換え hTSLP（REGN4009）との間で形成されたインビトロ複合体のサイズ分析を、多角度レーザー光散乱と組み合わせられた非対称流場流分画（A4F-MALLS）を使用して行った：抗 TSLP 親 Ab 30206 hIgG4、抗 TSLP 親 Ab 30217 hIgG4、抗 TSLP 親 Ab

30230 hIgG4、Fc-Fab_30206x30217-2xG4S（「2xG4S」は配列番号18として開示される）、Fc-Fab_30217x30230-2xG4S（「2xG4S」は配列番号18として開示される）、Clamp_30206x30217、Clamp_30217x30230、2+2タンデムFab_het_30206x30217、および2+2タンデムFab_het_30217x30230。この研究では、Fc-Fab ABMは、図13Aに示されるヒンジフォーマットを有した。

【0250】

7.4.2. 材料および方法

7.4.2.1. 分子

以下の表5-2は、A4F-MALLSによって分析された分子およびそれらの代替指定を列挙する。

【表5】

表 5-2 A4F-MALLS において分析された分子	
指定	説明
REGN4009	組換え hTSLP.mmh
H4H30206P2	抗 TSLP 親 Ab30206 hIgG4
H4H30217P2	抗 TSLP 親 Ab30217 hIgG4
H4H30230P2	抗 TSLP 親 Ab30230 hIgG4
TS-FC1-eL1	Fc-Fab_30206x30217-2xG4S (「2xG4S」は配列番号 18 として開示される)
TS-FC6-eL2	Fc-Fab_30217x30230-2xG4S (「2xG4S」は配列番号 18 として開示される)
TS-CL4-eL1	クランプ_30206x30217
TS-CL6-eL1	クランプ_30217x30230
TS-CL2-eL2	2+2 タンデム Fab_het_30206x30217
TS-CL3-eL2	2+2 タンデム Fab_het_30217x30230

【0251】

7.4.2.2. A4F-MALLS 移動相緩衝液

移動相緩衝液（10 mM のリン酸ナトリウム、500 mM の塩化ナトリウム、pH 7.0 ± 0.1）を、1.4 g のリン酸ナトリウム一塩基性一水和物、10.7 g のリン酸ナトリウム二塩基性七水和物、および 500 mL の 5 M 塩化ナトリウムを組み合わせることによって調製し、次いで、溶液を HPLC グレード水で 5.0 L の体積にした。緩衝液の最終的な測定された pH は、7.0 であった。移動相緩衝液を、使用前に濾過（0.2 μm）した。

【0252】

7.4.2.3. AF-MALLS

A4F-MALLS システムは、紫外線（UV）ダイオードアレイ検出器、Wyatt Technology Dawn HELEOS（登録商標）II レーザー光散乱装置（LS）、および Optilab（登録商標）T-REX 示差屈折計（RI）検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC システムと組み合わせられた Eclipse（商標）3+A4F 分離システムで構成した。検出器は、次の順序：UV-LS-RI で直列に接続した。LS および RI 検出器は、Wyatt Technology によって提供される指示に従って校正した。

【0253】

10

20

30

40

50

定義された量の抗TSLP mAbを、各々REGN4009（組換えTSLP）と組み合わせ、1X DPBS、pH7.4で希釈して、等モル比：1μM抗TSLP mAb：1μM hTSLPを得た。各親mAbの等モルの組み合わせを、組み合わせストック溶液として調製し、次いで各組み合わせストック溶液を等モル量のhTSLPと混合して、0.5μMのmAb1+0.5μMのmAb2+1μMのhTSLPの最終溶液濃度をもたらした。すべての試料を、周囲温度で2時間インキュベートし、4℃で濾過せずに維持した後、W350スパーサーホイル（スパーサーの厚さ350μm、スパーサーの幅2.2cm）を備えたEclipse（商標）短チャネルに、10kDaのMWCO再生セルロース膜を使用して注入した。各試料の注入前に、チャネルを、移動相緩衝液（10mMのリン酸ナトリウム、500mMの塩化ナトリウム、pH7.0±0.1）で予め平衡化した。ウシ血清アルブミン（BSA、2mg/mL、10μg試料負荷）を別個に注入し、システム好適性対照として含めた。

【0254】

分画方法は、4つのステップ：注入、集束、溶出、およびチャネル「ウォッシュアウト」ステップで構成された。A4F-MALLS移動相緩衝液（10mMのリン酸ナトリウム、500mMの塩化ナトリウム、pH7.0±0.1）を、分画方法全体を通して使用した。各試料（7μg）を、0.2mL/分の流量で1分間注入し、その後1.0mL/分の集束流量で3分間集束した。試料を、1.0mL/分のチャネル流量、一定のクロスフロー3.0mL/分で15分間溶出し、続いて3.0mL/分から0mL/分まで線形勾配クロスフローを5分かけて行った。最後に、クロスフローを0mL/分でさらに5分間保持して、チャネルをウォッシュアウトした。BSAを、同じパラメータ設定を使用して分画した。

【0255】

7.4.2.4. MALLSデータ分析

ASTRA Vソフトウェア（バージョン5.3.4.14、Wyatt Technology）を使用してデータを分析した。データを、過剰散乱光を溶質濃度および重量平均モル質量、Mwに関連付ける方程式に当てはめた（Kendrick et al., 2001, Anal Biochem. 299 (2) : 136-46, Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272 (1) : 1-40）：

【数3】

$$\text{式 1 : } \frac{K * c}{R(\theta, c)} = \frac{1}{MwP(\theta)} + 2A_2c$$

（式中、cは、溶質濃度であり、R（θ、c）は、散乱角および濃度の関数としての溶質からの過剰ラレー比であり、Mwは、モル質量であり、P（θ）は、散乱光の角度依存性を表し（回転半径<50nmを有する粒子について約1）、A2は、浸透圧の膨張における第2のビリアル係数である（測定は希薄溶液で行われるため無視できる））および

【数4】

10

20

30

40

50

式 2 :

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

10

（式中、 n_0 は、溶媒屈折率を表し、 N_A は、アボガドロの数であり、 λ_0 は、真空での入射光の波長であり、 dn/dc は、溶質の比屈折率増分を表す。

【0256】

B S Aモノマーのモル質量は、データ収集（システム好適性チェック）中に光散乱および示差屈折率検出器の較正定数を評価するのに役立った。U VおよびR I検出器から決定されたB S Aの平均モル質量の相対標準偏差（R S D %）は、 $\leq 5.0\%$ であった。

【0257】

光散乱検出器の正規化係数、検出器間遅延量、および広帯域化項は、使用されたA 4 F－M A L L S条件について収集されたB S Aクロマトグラムから計算した。これらの値を、これらの観点について補正するために、すべての他の試料について収集されたデータファイルに適用した。

20

【0258】

215 nmまたは280 nmでの dn/dc 値および消散係数（グリコシル化について補正）を、A s t r aソフトウェアで提供されるタンパク質コンジュゲート分析を使用して実験的に決定した。補正された消散係数および dn/dc 値を使用して、すべてのタンパク質－タンパク質複合体試料を分析した。

【0259】

7. 4. 3. 結果

30

A 4 F－M A L L Sを使用して、いくつかの抗h T S L P A B Mおよびh T S L Pの間で形成された複合体の相対的なサイズ分布を評価した。h T S L Pとの潜在的なA B M複合体の理論的モル質量および予測された化学量論を表5－3および5－4に示す。

【表 6】

表 5-3 親 mAb および Fc-Fab フォーマットの TSLP との複合体の理論的モル質量	
複合体における ABM:TSLP の比	理論的モル質量(kDa)
1:0	152
0:1	25
1:1	177
1:2	202
2:1	329
2:2	354

40

【表 7】

表 5-4 クランプおよび 2+2 タンデム Fab の TSLP との複合体の理論的モル質量	
ABM:TSLP 複合体の比	理論的モル質量(kDa)
1:0	254
0:1	25
1:1	279
1:2	304
2:1	533
2:2	558

10

【0260】

予想通り、各個々の親抗 T S L P m A b (H 4 H 3 0 2 0 6 P 2、H 4 H 3 0 2 1 7 P 2、H 4 H 3 0 2 3 0 P 2) は、等モル比で組み合わせられる場合、h T S L P との標準的な 1 : 1 および 1 : 2 複合体を形成した (ピーク 3、約 179 k D a、図 7、表 5 - 5)。

【表 8】

表 5-5 親 Ab とのヒト TSLP 複合体のモル質量および保持時間の要約											
試料	モル比 (mol:mol)	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4		ピーク 5	
		遊離 hTSLP		遊離 mAb		[mAb]1:[hTSLP]1-2 複合体		[mAb]2:[hTSLP]1-2 複合体		高次複合体	
		Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa
hTSLP	-	7.6	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H4H30217P2	-	ND	ND	9.8	151.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H4H30206P2 :hTSHLP	1:1	ND	ND	10.0	155.1	10.5	177.6	ND	ND	ND	ND
H4H30217P2 :hTSLP	1:1	ND	ND	10.0	147.5	10.5	169.7	ND	ND	ND	ND
H4H30230P2 :hTSLP	1:1	ND	ND	10.2	157.1	10.4	181.4	ND	ND	ND	ND

R_t:保持時間、M_w:重量平均モル質量、NA:該当なし、min:分、kDa:キロダルトン。

20

30

【0261】

しかしながら、2つの親mAb (H 4 H 3 0 2 0 6 P 2 + H 4 H 3 0 2 1 7 P 2 および H 4 H 3 0 2 1 7 P 2 + H 4 H 3 0 2 3 0 P 2) の異なる組み合わせを、等モル量の h T S L P と混合した場合、ヘテロマー複体の不均一な分布が観察され、各親mAbが h T S L P の同じ分子と結合して、「ペーパードーリング」と呼ばれるプロセスにおいて伸長抗体-抗原格子を形成することができることを示した (図 8)。これらの試料では、約 342 k D a のモル質量を有する異なるピーク (ピーク 4)、続いて約 650 ~ 5000 k D a の範囲の幅広いモル質量分布を有する一連の広範な低分解能種 (ピーク 5) が観察された。個々の成分の計算されたモル質量に基づき、ピーク 4 は、2 : 2 の m A b : h T L S P 複合体を表す可能性が高く、ピーク 5 は、 ≥ 3 分子の h T S L P を配位する ≥ 4 分子の m A b からなる高次ヘテロマー複体の不均一な分布に対応する (表 5 - 6)。

40

50

【表 9】

表 5-6 親 Ab の組み合わせとのヒト TSLP 複合体のモル質量および保持時間の要約											
試料	モル比 (mol:mol)	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4		ピーク 5	
		遊離 hTSLP		遊離 mAb		[mAb]1:[hTSLP]1-2 複合体		[mAb]2:[hTSLP]1-2 複合体		高次ヘテロマー 複合体	
		Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa
hTSLP	-	7.6	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H4H30217P2	-	ND	ND	9.8	151.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H4H30206P2:H4H30217P2:hTSLP	0.5:0.5:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.4	329	15.3	約 650~5000
H4H30217P2:H4H30230P2:hTSLP	0.5:0.5:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.0	345.2	15.1	約 800~5000

Rt:保持時間、Mw:重量平均モル質量、NA:該当なし、min:分、kDa:キロダルトン。

【0262】

加えて、hTSLPと、上記で試験された同じ親mAbの組み合わせに由来し、ヒトFcドメイン（Fc-Fab）のC末端に付着した、2つの固有のFabドメインを有する新規二重特異性抗体のセット（TS-FC1-eL1、TS-FC6-eL2）との間に形成される複合体も調査した。親mAbの組み合わせで得られた結果とは異なり、各Fc-Fab二重特異性抗体（bsAb）は、主に、hTSLPとの別個の1:1複合体を形成し（ピーク3、約178 kDa、図9、表5-7）、追加の高次複合体（「ペーパーリング」）はほとんど〜まったく観察されなかった。

【表 10】

表 5-7 Fc-Fab とのヒト TSLP 複合体のモル質量および保持時間の要約											
試料	モル比 (mol:mol)	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4		ピーク 5	
		遊離 hTSLP		遊離 bsAb		[bsAb]1:[hTSLP]1-2 複合体		[bsAb]2:[hTSLP]1-2 複合体		高次複合体	
		Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa	Rt, 分	Mw, kDa
hTSLP	-	7.6	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-FC1-eL1	-	ND	ND	9.8	156.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-FC6-eL2	-	ND	ND	9.8	148.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-FC1-eL1:TSLP	1:1	ND	ND	ND	ND	10.1	175.7	11.0	357.7	ND	ND
TS-FC6-eL2:TSLP	1:1	ND	ND	ND	ND	10.2	176.1	11.1	361.4	ND	ND

Rt:保持時間、Mw:重量平均モル質量、NA:該当なし、min:分、kDa:キロダルトン。

【0263】

これは、Fc-Fab bsAbの各々の上の両方のFabドメインが、一雌一雄の二価相互作用を形成するhTSLPの同じ分子と関与することを好み、よって「ペーパーリング」のプロセスを排除することを示す。

【0264】

各結合アーム上に追加の外部Fabドメイン（2+2タンデムFab、TS-CL2-eL2、TS-CL3-eL2）または各アーム上に追加の内部非結合Fab（クランプ、TS-CL4-eL1、TS-CL6-eL1）のいずれかを有する、本開示のABMフォーマットの2つの追加セットも、同様の方法でhTSLPとの複合体形成について評価した。一般に、各クランプABMは、ある程度のhTSLPとの1:1複合体を形成するように見えた（ピーク3、約272 kDa、図10、表5-8）が、これらの試料で

は、変動するレベルの「ペーパードーリング」を示す、高次複合体の広く、不均一な分布（ピーク5、約650～7000 kDa、図10、表5-8）も検出することができた。
【表11】

表 5-8 クランプとのヒト TSLP 複合体のモル質量および保持時間の要約											
試料	モル比 (mol:mol)	ピーク 1 遊離 hTSLP		ピーク 2 遊離 bsAb		ピーク 3 [bsAb]1:[hTSLP]1- 2 複合体		ピーク 4 [bsAb]2:[hTSLP]1- 2 複合体		ピーク 5 高次複合体	
		Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、分	Mw、 kDa	Rt、分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、kDa
TSLP	-	7.6	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL4-eL1	-	ND	ND	11.0	244.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL6-eL1	-	ND	ND	11.3	255.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL4-eL1:TSLP	1:1	ND	ND	ND	ND	10.8	264.4	13.4	491.6	15.0	約 650~7000
TS-CL6-eL1:TSLP	1:1	ND	ND	ND	ND	11.4	280.4	13.8	533.9	15.1	約 650~3000

Rt:保持時間、Mw:重量平均モル質量、NA:該当なし、min:分、kDa:キログダルトン。

10

【0265】

20

最後に、等モル量の h T L S P と混合した場合、各 2 + 2 タンデム F a b b s A b は、試験されたすべての新規二重特異性フォーマットの「ペーパードーリング」について最も高い傾向を示した。これらの試料では、遊離 2 + 2 タンデム F a b b s A b と一貫した異なるピーク（ピーク2、約255 kDa）、続いて、10メガダルトンを超えるモル質量を有する非常に大きな複合体において終結するますます大きな種の不均一な分布を表す一連の広範な低分解能ピーク（ピーク4-5、約500～14,000 kDa、図11、表5-9）を観察することができた。

【表12】

表 5-9 2+2 タンデム Fab とのヒト TSLP 複合体のモル質量および保持時間の要約											
試料	モル比 (mol:mol)	ピーク 1 遊離 hTSLP		ピーク 2 遊離 bsAb		ピーク 3 [bsAb]1:[hTSLP]1- 2 複合体		ピーク 4 [bsAb]2:[hTSLP]1- 2 複合体		ピーク 5 高次複合体	
		Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、 kDa	Rt、分	Mw、kDa	Rt、分	Mw、 kDa	Rt、 分	Mw、kDa
hTSLP	-	7.6	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL2-eL2	-	ND	ND	11.4	256.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL3-eL2	-	ND	ND	11.1	260.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TS-CL2-eL2:hTSLP	1:1	ND	ND	11.0	255.0	ND	ND	13.7	532.1	14.6	約 700~14,000
TS-CL3-eL2:hTSLP	1:1	ND	ND	10.9	248.9	ND	ND	13.8	574.7	14.8	約 700~10,000

30

40

【0266】

7.5. 実施例5：抗 h T S L P F c - F a b におけるリンカーの最適化

一連の抗 h T S L P 30217x30230 二重特異性 F c - F a b を、2 アミノ酸 G S リンカーから、30 アミノ酸 6 x G 4 S リンカー（配列番号38）まで、異なるリンカーを使用して構築した。これらの F c - F a b の活性を、h T S L P S T A T 3 - ル シ フ ェ ラー ゼ レ ポー ター アッセイにおいて評価した（図12）。最良の遮断活性は、2～5 x G 4 S のリンカー長を有する F c - F a b で見られた（G 4 S は配列番号3として開示される）。異なるヒンジフォーマットも、例として30217x30230 二重特異性 F c - F a b を使用して評価した（図13）。フォーマット#1では、ヒンジ配列は、天

50

然 $hIgG4$ 配列で発生するように、 $Fc-Fab$ の N 末端にあり、 $S228P$ (EU) 置換を有する (図 13A)。フォーマット #2 では、同じヒンジ配列は、 $Fc-Fab$ の N 末端から除去され、 $Fc-CH3$ ドメインの C 末端と ($G4S$)_n リンカーとの間に挿入される ($G4S$ は配列番号 3 として開示される) (図 13B)。フォーマット #3 では、ヒンジはまた、 $CH3$ ドメインと ($G4S$)_n リンカーとの間に位置している ($G4S$ は配列番号 3 として開示される)。しかしながら、上部ヒンジ配列は、 $G4S$ 配列で置き換えられる ($G4S$ は配列番号 3 として開示される) (図 13C)。すべての 3 つのヒンジフォーマットは、 $1 \times G4S$ (配列番号 3) または $4 \times G4S$ リンカー (配列番号 19) と組み合わせて、抗 $hTSLP$ 30217x30230 二重特異性 $Fc-Fab$ を構築した。これらの $Fc-Fab$ の活性は、 $hTSLP$ STAT3-ルシフェラーゼ Reporter Assay において評価した (図 13D)。 $4 \times G4S$ リンカー (配列番号 19) を有する $Fc-Fab$ について、異なるヒンジフォーマットは、それらの $TSLP$ 遮断活性にわずかな影響を及ぼし、ヒンジフォーマット #1 が最良の活性を示した。 $1 \times G4S$ リンカー (配列番号 3) を有する $Fc-Fab$ について、ヒンジフォーマット #1 は、他の 2 つのヒンジフォーマットよりも 5~10 倍良好な $IC50$ を有した。

【0267】

7. 6. 実施例 6: Fc 受容体への $Fc-Fab$ 結合の $Biacore$ 分析

精製された組換えヒト $Fc\gamma R$ およびヒト由来の $FcRn$ 受容体サブタイプに結合する異なる抗 $TSLP$ $Fc-Fab$ 抗体の平衡解離定数 (K_D 値) は、リアルタイム表面プラズモン共鳴ベースの $MASS-2$ ($Bruker$) / $Biacore$ 3000 (GE $Healthcare$) バイオセンサーを使用して決定した。アッセイされた $Fc-Fab$ 構築物は、抗 $FeLD1$ (−) $-IgG1$ および $IgG4$ アイソタイプ対照 (それぞれ、 $REGN1932$ および $REGN1945$ と呼ばれる) とともに、 $TSLP$ 30206x30217 $Fc-Fab$ 2x $G4S$ (「2x $G4S$ 」は配列番号 18 として開示される) ($REGN8759$ と呼ばれる) および $TSLP$ 30230x30217 $Fc-Fab$ 2x $G4S$ (「2x $G4S$ 」は配列番号 18 として開示される) ($REGN7860$ と呼ばれる) であった。アッセイされた Fc 受容体は、ヒト $Fc\gamma RIIA$ ($H131$) $-myc$. 6x His 、ヒト $Fc\gamma RIIA$ ($R167$) $-10xHis$ 、ヒト $Fc\gamma RIIB$ $-myc$. 6x His 、ヒト $Fc\gamma RIIB$ ($F176$) $-myc$. 6x His 、ヒト $Fc\gamma RIIB$ $-mmh$ 、ヒト $FcRn$ $-mmh$ 、およびヒト $Fc\gamma RI$ $-6xHis$ であった。

【0268】

7. 6. 1. 材料および方法

すべての結合研究は、 $10mM$ の $HEPES$ 、 $150mM$ の $NaCl$ 、 $3mM$ の $EDTA$ 、および $0.05\% v/v$ の界面活性剤 $Tween-20$ 、 $pH7.4$ ($HBS-ET$) または PBS 、 $0.05\% v/v$ 界面活性剤 $Tween-20$ 、 $pH6.0$ ($PBS-T$ $pH6.0$) 泳動緩衝液中、 $25^{\circ}C$ で実施した。 $MASS-2$ / $Biacore$ 3000 $CM5$ センサー表面は、マウス抗ペンターヒスチジンモノクローナル抗体 (「ペンターヒスチジン」は配列番号 34 として開示される) (GE $Healthcare$) または抗 myc モノクローナル抗体 ($REGN642$) のいずれかとのアミンカップリングによって誘導体化され、 C 末端 myc $-myc$ $-$ ヘキサヒスチジン (「ヘキサヒスチジン」は配列番号 35 として開示される) またはヒスチジン領域で発現される $Fc\gamma R$ および $FcRn$ 受容体細胞外ドメインを捕捉した。結合研究は、異なる抗 $TSLP$ $Fc-Fab$ および野生型 Fc アイソタイプ対照で実施した。 $HBS-ET$ または $PBS-T$ $pH7.4$ および $pH6.0$ 泳動緩衝液で調製された異なる濃度の抗 $TSLP$ $Fc-Fab$ ($5\mu M$ ~ $0.3125\mu M$ の範囲、2 倍希釈液) を、 $Fc\gamma R$ および $FcRn$ 受容体捕捉表面に $50\mu L$ / 分の流速で注入した。捕捉 $Fc\gamma R$ および $FcRn$ 受容体の各々へのすべての抗 $TSLP$ $Fc-Fab$ の会合を 1.5 ~ 2 分間モニターし、 $HBS-T$ 泳動緩衝液中でのそれらの解離を 10 分間モニターした。各サイクルの終わりに、 $Fc\gamma R$ および $FcRn$ 受容体捕捉表面は、マウス抗ペンターヒスチジンモノクローナル抗体 (「ペ

ンターヒスチジン」は配列番号 34 として開示される) または抗 myc モノクローナル抗体について 10 mM のグリシン-HCl pH 1.5 の 20 ~ 30 秒の注入を使用して再生した。すべての結合速度実験を、25 °C で実施した。

【0269】

7.6.2. データ分析

結合解離平衡定数 (KD) および解離半減期 ($t_{1/2}$) を、動的速度から以下のよう
に計算した:

$$KD (M) = k_d / k_a \text{ および } t_{1/2} (\text{分}) = \ln 2 / (60 \times k_d)$$

【0270】

7.6.3. 結果

25 °C での本開示の異なる FcγR および FcRn 受容体への異なる抗 TSLP Fc-
Fab および対照抗体結合の結合速度パラメータを、それぞれ、表 5-10 および 5-
11 に示す。表 5-10 では、NT は、未試験を意味し、IC は、不確定を意味する。表
5-11 では、NB は、結合なしを意味し、IC は、不確定を意味する。

10

20

30

40

50

【表 13】

表 5-10:HBS-ET pH7.4 における 25℃での抗 TSLP Fe-Fab およびアイソタイプ对照 mAb への Fe γ R 受容体結合の結合速度パラメータ												
捕捉表面	FeRg.Mmh 捕捉(RU)	最高濃度試験済み	REGN8759					REGN8760				
			REGN 8759 結合(RU)	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	tl/2 (分)	REGN8760 結合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	tl/2 (分)
ヒト Fe γ RI-6xHis	344.9 $\pm$ 4.1	100nM	161.1	7.03E+05	3.77E-03	5.37E-09	3.1	161.1	5.54E+05	4.54E-03	8.20E-09	2.5
ヒト Fe γ RIIA(H131)-myc.6xHis	346.1 $\pm$ 1.6	5 μ M	42.4			1.56E-05		42.4			2.11E-05	
ヒト Fe γ RIIA(R167)-10xHis	323.2 $\pm$ 3.6	5 μ M	59.6			1.23E-05		59.6			1.08E-05	
ヒト Fe γ RIIB-myc.6xHis	353.1 $\pm$ 2.8	5 μ M	98.5			3.80E-06	定常状態の動力学	98.5			6.20E-06	定常状態の動力学
ヒト Fe γ RIIA(F176)-myc.6xHis	201.4 $\pm$ 0.8	5 μ M	18.2			5.50E-06		18.2			3.40E-05	
ヒト Fe γ RIIA(V176)-myc.6xHis	NT	NT				NT					NT	
ヒト Fe γ RIIB-10xHis	192.7 $\pm$ 15.8	5 μ M	38.9			IC		38.9			IC	
表面の説明	FeRg.Mmh 捕捉(RU)	最高濃度試験済み	REGN1932					REGN1945				
			REGN 1932 結合(RU)	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	tl/2 (分)	REGN1945 結合(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	tl/2 (分)
ヒト Fe γ RI-6xHis	344.9 $\pm$ 4.1	100nM	183.1	4.38E+05	7.63E-04	1.74E-09	15.1	130.9	4.33E+05	2.33E-03	5.39E-09	4.9
ヒト Fe γ RIIA(H131)-myc.6xHis	346.1 $\pm$ 1.6	5 μ M	190.0			1.07E-06		60.1			1.17E-05	
ヒト Fe γ RIIA(R167)-10xHis	323.2 $\pm$ 3.6	5 μ M	167.8			9.50E-07	定常状態の動力学	86.1			5.20E-06	定常状態の動力学
ヒト Fe γ RIIB-myc.6xHis	353.1 $\pm$ 2.8	5 μ M	141.5			2.50E-06		105.8			4.30E-06	
ヒト Fe γ RIIA(F176)-myc.6xHis	201.4 $\pm$ 0.8	5 μ M	120.1			1.47E-06		9.5			7.00E-05	
ヒト Fe γ RIIA(V176)-myc.6xHis	NT	NT	NT			NT		NT			NT	
ヒト Fe γ RIIB-10xHis	192.7 $\pm$ 15.8	5 μ M	120.3			3.00E-06		-0.7			NB	

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 5-11:PBS-T pH7.4 および pH6.0 中の 25℃での抗 TSLP Fe-Fab およびアイソタイプ対照 mAb への FcRn 受容体結合の結合速度パラメータ													
mAb 試験済み	構築物	泳動緩衝液:PBSP、pH7.4						泳動緩衝液:PBSP、pH6.0					
		hFcRn.mmh 捕捉(RU)	5uM mAb 結合 (RU)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	t1/2(分)	hFcRn.mmh 捕捉(RU)	5uM mAb 結合 (RU)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	t1/2(分)
REGN8759	Fe-Fab- hlgG4	390.7±18.8	-16.2	NB	NB	NB	NB	121.4±5.8	45.6	4.91E+04	1.09E-01	2.22E-06	0.1
REGN8760	Fe-Fab- hlgG4	331.3±14.1	-11.6	NB	NB	NB	NB	105±3.6	42.5	6.65E+04	1.53E-01	2.30E-06	0.1
REGN1932	hlgG1	286.3±9.9	9.1	IC	IC	IC	IC	93±2.4	80.3	1.12E+05	1.18E-01	1.06E-06	0.1
REGN1945	hlgG4	252.8±8.4	8.0	IC	IC	IC	IC	82±2.4	65.0	6.16E+04	1.08E-01	1.75E-06	0.1

【0 2 7 1】

7. 7. 実施例 7：野生型マウスにおける抗 T S L P F c - F a b 二重特異性抗体の薬物動態評価

7. 7. 1. 概要

抗 f e l d 1 I g G 4 アイソタイプ対照、REGN1945、無関係な従来の二重特異性 I g G 4 対照、H 4 H 2 1 2 3 7 D、および h F c γ ホモダイマー、REGN1627と比較した、2つの抗 T S L P F c - F a b 二重特異性結合分子、(1) REGN8759とも呼ばれる 2 x G 4 S リンカー（配列番号 18）を有する 3 0 2 0 6 x 3 0 2 1 7 I g G 4 F c - F a b 二重特異性、および (2) REGN 8 7 6 0 とも呼ばれ

る2 x G4Sリンカー（配列番号18）を有する30230 x 30217 IgG4 Fc-Fab二重特異性の薬物動態プロファイルの評価は、C57BL/6野生型（WT）マウスで実施した。

【0272】

7.7.2. 材料および方法

コホートは、試験された抗体当たり5匹のマウスを含有した。REGN8759、REGN8760、REGN1945、およびH4H21237Dが投与されたマウスは、単一の皮下（SC）1mg/kg用量を受けた。hFcγホモダイマー、REGN1627が投与されたマウスは、研究において他の抗体に対してモル当量（0.35mg/kg）に基づいて正規化されたSC用量を受けた。血液試料は、投与後6時間、ならびに1、2、3、4、7、10、14、および21日で収集した。血液は、血清に加工し、分析されるまで-80℃で凍結した。GyroLab xExploreプラットフォーム（Gyros）を使用して、REGN8759およびREGN8760の総および機能的血清濃度、ならびにREGN1945、H4H21237D、およびREGN1627の総血清濃度を測定した。

【0273】

Gyros技術は、レーザー誘導性蛍光検出での自動イムノアッセイに親和性フロースルーフォーマットを使用する。試料は、複数の放射状に配置されたナノリットルスケールの親和性捕捉カラムを含有するコンパクトディスク（CD）に装填される。液体流は、遠心力および毛管力によって制御される。

【0274】

総および機能的REGN8759、REGN8760の測定、ならびに血清中の総REGN1945、H4H21237D、およびREGN1627の測定について、100μg/mLの試験物品または対照物品特異的ビオチン化捕捉試薬（表5-11）を、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ（Dynospheres）が予め装填された親和性カラムを含有するGyroLab Bioaffy 200CDに添加した。較正に使用された標準物（表5-11）を、0.488~2000ng/mLの範囲の濃度で分析した。血清試料の段階希釈液は、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）を含有するリン酸塩緩衝生理食塩水（PBS）で調製した。標準の段階希釈液は、2%正常マウス血清（NMS）を含有するPBS+0.5%BSAで調製した。1:50で希釈された血清試料の一重項および標準物の複製を、室温で捕捉試薬でコーティングされた親和性カラムに添加した。捕捉されたヒトIgGは、Rexxip F緩衝液（Gyros）で希釈されたAlexa-647コンジュゲート化マウス抗ヒトIgG1/hIgG4モノクローナル抗体（REGN2567、0.5μg/mL）を使用して検出し、得られた蛍光シグナルは、GyroLab xExplore機器によって応答ユニット（RU）に記録した。それぞれのアッセイの定量下限（LLOQ）は、品質管理（QC）試料が予想濃度から一貫して25%未満で逸脱すると決定された標準曲線上の最低濃度として定義した（表5-12）。試料濃度は、GyroLab Evaluator Softwareにおいて4パラメータロジスティック曲線当てはめを使用して構築された標準曲線からの補間によって決定した。2つの反復実験からの平均濃度を使用して、最終濃度を計算した。

10

20

30

40

50

【表 15】

表 5-12:PK 分析において使用される試薬			
検出されたヒト IgG	捕捉試薬	標準	LLOQ
REGN8759 (総)	ビオチンコンジュゲート化ヤ ギ抗ヒト IgG、Fcγフラグメン ト特異的 pAb	REGN8759	0.195μg/mL
REGN8760 (総)		REGN8760	0.195μg/mL
REGN1945 (総)		REGN1945	0.0488μg/mL
H4H21237D (総)		H4H21237D	0.391μg/mL
REGN1627 (総)		REGN1627	0.195μg/mL
REGN8759 (機能的)	ビオチンコンジュゲート化 hTSLP-mFc(REGN4010)	REGN8759	0.391μg/mL
REGN8760 (機能的)		REGN8760	0.391μg/mL

10

【0275】

PKパラメータは、Phoenix（登録商標）WinNonlin（登録商標）ソフトウェアバージョン6.3（Certara、L. P.、Princeton、NJ）および血管外投与モデルを使用した非コンパートメント分析（NCA）によって決定した。各抗体についてそれぞれの平均濃度値（総薬物）を使用して、観察された血清中の最大濃度（ C_{max} ）、観察された推定半減期（ $t_{1/2}$ ）、最後の測定可能な濃度までの時間に対する濃度曲線下の面積（ AUC_{last} ）、および抗体クリアランス率（CL）を含むすべてのPKパラメータを、線形補間および均一重み付けとともに線形台形公式を使用して決定した。

20

【0276】

7.7.3. 結果

WTマウスにおける抗TSLP Fc-Fab二重特異性抗体および対照の1mg/kg SC投与後、REGN8759およびREGN8760は、同様の血清中の薬物の最大総濃度（それぞれ、 $C_{max}=11.7$ および $10.7\mu g/mL$ ）を示し、hIgG4アイソタイプ対照、REGN1945、無関係な従来の二重特異性IgG4対照、H4H21237D、およびhFcγホモダイマー、REGN1627（ C_{max} 用量正規化）は、約1.5～2倍低い濃度（それぞれ、 $C_{max}=8.2$ 、 7.8 、および $6.4\mu g/mL$ ）を有した。

30

【0277】

加えて、REGN8759、REGN8760、REGN1945、およびH4H21237Dは、すべて同様の半減期値（それぞれ、 $T_{1/2}=12.1$ 、 12.2 、 10.9 、および 11.2 日）を示し、REGN1627は、すべての他の試験された薬物と比較してより速い半減期（ 6.4 日）を有した。追加的に、REGN8759およびREGN8760は、REGN1945、H4H21237D、およびREGN1627と比較される場合（それぞれ、 $AUC_{last}=88.0$ 、 84.1 、および 19.7 、それぞれ、 $AUC_{last}/D=56.2$ （ $d*\mu g/mL$ ）/（ mg/kg ）、それぞれ、 $CL=9.5$ 、 8.2 、および $45.2mL/日/kg$ ）と比較される場合、より良好な薬物曝露（それぞれ、 $AUC_{last}=131$ 、および 122 （ $d*\mu g/mL$ ）/（ mg/kg ））およびより遅いクリアランス率（それぞれ、 $CL=5.2$ 、 $5.5mL/日/kg$ ）を示した。

40

【0278】

さらに、REGN8759およびREGN8760の総および機能的TSLP結合濃度

50

は、試験されたすべての時点で同等であり、これらの F c - F a b 分子が 21 日で依然として無傷であることを示した。全体として、PK プロファイルは、h I g G 4 アイソタイプ対照、無関係な従来の二重特異性 I g G 4 対照、または h F c γ ホモダイマーと比較して、REGN8759 および REGN8760 について同様またはより良好である。

【0279】

総および機能的 REGN8759 および REGN8760 薬物濃度、ならびに総 REGN1945、H4H21237D、および REGN1627 薬物濃度のデータの要約を表 5-13 に要約し、平均 PK パラメータを表 5-14 に示し、平均総抗体濃度対時間を図 14 および図 15 に示す。

【表 16-1】

表 5-13:経時的な WT マウスにおける REGN8759 もしくは REGN8760 抗 TSLP 抗体または対照の単回 1mg/kg(または用量当量)皮下注射後の血清中の総および機能的薬物濃度の平均濃度(±SEM)					
抗体	時間 (d)	総薬物濃度		機能的薬物濃度	
		1mg/kg(0.345mg/kg 用量正規化)			
		平均 (μ g/mL)	+/-SEM	平均 (μ g/mL)	+/-SEM
REGN8759	0.25	7.3	0.4	6.8	0.2
	1	11.6	0.2	11.5	0.3
	2	10.7	0.6	9.8	0.4
	3	9.6	0.5	8.9	0.6
	4	8.4	0.4	8.1	0.4
	7	7.2	0.4	7.1	0.4
	10	5.7	0.6	5.2	0.4
	14	4.6	0.4	4.2	0.4
	21	3.8	0.3	3.3	0.2
REGN8760	0.25	6.6	0.4	6.2	0.2
	1	10.7	0.3	10.0	0.2
	2	9.8	0.3	8.7	0.3
	3	8.8	0.4	7.9	0.6
	4	8.2	0.3	7.7	0.4
	7	6.6	0.3	5.9	0.4
	10	5.1	0.5	5.0	0.2
	14	4.4	0.3	3.7	0.1
	21	3.5	0.2	3.0	0.2
REGN1945	0.25	5.2	0.5	NT	NT
	1	8.9	0.9	NT	NT
	2	8.6	1.3	NT	NT
	3	8.1	0.7	NT	NT
	4	7.1	0.8	NT	NT
	7	5.6	0.4	NT	NT
	10	4.2	0.5	NT	NT
	14	3.4	0.4	NT	NT
	21	2.6	0.4	NT	NT
H4H21237D	0.25	4.1	0.5	NT	NT
	1	7.8	0.3	NT	NT
	2	7.2	0.2	NT	NT
	3	6.5	0.1	NT	NT
	4	5.6	0.3	NT	NT
	7	4.5	0.2	NT	NT
	10	3.7	0.1	NT	NT
	14	2.8	0.2	NT	NT
	21	2.4	0.1	NT	NT
REGN1627	0.25	1.3	0.1	NT	NT
	1	2.2	0.03	NT	NT
	2	2.0	0.04	NT	NT
	3	1.9	0.04	NT	NT
	4	1.6	0.1	NT	NT

10

20

30

40

50

【表 16-2】

表 5-13:経時的な WT マウスにおける REGN8759 もしくは REGN8760 抗 TSLP 抗体または対照の単回 1mg/kg(または用量当量)皮下注射後の血清中の総および機能的薬物濃度の平均濃度(±SEM)					
抗体	時間 (d)	総薬物濃度		機能的薬物濃度	
		1mg/kg(0.345mg/kg 用量正規化)			
		平均 (μ g/mL)	+/-SEM	平均 (μ g/mL)	+/-SEM
	7	1.1	0.04	NT	NT
	10	0.8	0.04	NT	NT
	14	0.5	0.01	NT	NT
21	0.3	0.01	NT	NT	

10

【表 17】

表 5-14:薬物動態パラメータの要約						
パラメータ	単位	1mg/kg(0.345mg/kg 用量正規化)				
		REGN8759	REGN8760	REGN1945	H4H21237D	REGN1627
C_{max}	μ g/mL	11.7±0.17	10.7±0.33	8.2±1.6	7.8±0.3	2.2±0.03
C_{max_D}	(μ g/mL)/kg	11.7±0.17	10.7±0.33	8.2±1.6	7.8±0.3	6.4±0.086
$T_{1/2}$	D	12.1±0.75	12.2±0.58	10.9±0.56	11.2 0.5	6.4±0.094
AUC_{last}	d* μ g/mL	131±8	122±4.9	88±15	84.1±2.1	19.7±0.45
AUC_{last_D}	(日*kg* μ g/mL/mg)	131±8	122±4.9	88±15	84.1±2.1	56.2±1.3
Cl	mL/日/kg	5.2±0.43	5.5±0.28	9.7±2.4	8.2±0.29	45.2±1.1

20

【0280】

30

PKパラメータは、総薬物濃度の平均濃度対時間プロファイルから導き出した。 $T_{1/2}$ および AUC_{last} は、21日目までの濃度に基づく。各PKパラメータについての平均±SEM値は、すべての用量群について示される。

【0281】

略語： AUC_{last} =投与時から最後の測定可能な濃度までの曲線下面積、 $AUC_{last}/D=1mg/kg$ 投与に正規化されたAUC最終用量、 $t_{1/2}$ =終末相消失半減期、 C_{max} =ピーク濃度、 $C_{max}/d=1mg/kg$ 投与に正規化された C_{max} 用量、 $t_{max}=C_{max}$ が観察される時間、Cl=経時的な抗体のクリアランス率、SEM=平均の標準誤差。

【0282】

40

7.8. 実施例8：リガンドXへの抗リガンドX Fc-Fab結合のBiacore分析

ヒトリガンドXに対する3つの非競合性mAb、mAbX1、mAbX2、およびmAbX3からのFabフラグメントを使用して、リンカーがG4S₂（すなわち、GGGGSGGGGS（配列番号18））である、15~20 kDaの範囲の分子量を有するヒトリガンドXの二重特異性Fc-Fab、可溶性モノマータンパク質を作製した。Fc-Fabは、図13Aに示されるヒンジフォーマットを有した。

【0283】

精製された抗リガンドX抗体に結合するリガンドXの平衡解離定数(KD値)を、Biacore T200機器でリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して決定した。Biacoreセンサー表面を、モノクローナルマウス抗ヒトFc抗体(RE

50

G N 2 5 6 7) とのアミンカップリングによって誘導体化して、ヒト F c 定常領域で発現された抗リガンド X 抗体を捕捉した。B i a c o r e 結合研究を、H B S T 泳動緩衝液 (0 . 0 1 M H E P E S p H 7 . 4、0 . 1 5 M N a C l、3 m M E D T A、0 . 0 5 % v / v 界面活性剤 P 2 0) で実施した。ヒトリガンド X は、インハウス供給源 (R E G N 1 3 8) から入手した。H B S T 泳動緩衝液中で調製された異なる濃度のヒトリガンド X (9 0 n M ~ 0 . 1 2 n M の範囲、3 倍希釈液) を、5 0 μ L / 分の流速で抗リガンド X 抗体捕捉表面に注入した。捕捉されたモノクローナル抗体の各々へのすべてのリガンド X 試薬の会合を 4 分間モニターし、H B S T 泳動緩衝液中でのそれらの解離を 1 0 分間モニターした。すべての結合速度実験を、3 7 ° C で実施した。B i a e v a l u a t i o n 曲線適合ソフトウェアを使用してリアルタイムセンサーグラムを 1 : 1 結合モデルへあて

10

はめることによって、動的会合 (k_a) および解離 (k_d) 速度定数を決定した。結合解離平衡定数 (K_D) および解離半減期 ($t_{1/2}$) を、動的速度定数から以下のように計算した：

$K_D (M) = k_d / k_a$ および $t_{1/2} (分) = \ln 2 / (60 \times k_d)$

【 0 2 8 4 】

3 7 ° C での抗リガンド X 抗体へのヒトリガンド X 結合の結合速度パラメータを表 5 - 1 5 に示す。3 7 ° C で、本開示の抗リガンド X F c - F a b は、0 . 2 5 p M ~ 1 8 . 4 p M の範囲の K_D 値でヒトリガンド X に結合し、親 m A b は、表 5 - 1 5 に示されるように、0 . 5 6 p M および 5 5 7 p M のそれぞれの K_D 値でヒトリガンド X に結合した。

【表 1 8】

20

表 5-15:37°Cでヒトリガンド X に結合する抗リガンド X モノクローナル抗体の結合速度パラメータ						
説明	mAb 捕捉 (RU)	90nM ヒトリガ ンド X 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分)
mAbX1 x mAbX2 IgG4 Fc-Fab	57.2±0.1	5.8	4.61E+07	1.14E-05	2.47E-13	1016.0
mAbX1 x mAbX3 IgG4 Fc-Fab	56.2±0.2	7.2	1.18E+07	1.58E-04	1.34E-11	73.1
mAbX2 x mAbX3 IgG4 Fc-Fab	62.6±0.2	7.6	4.78E+07	8.80E-04	1.84E-11	13.1
mAbX1 IgG4	106.7±0.7	21.4	1.24E+06	6.05E-05	4.86E-11	191.1
mAbX2 IgG4	77.7±0.3	14.2	5.19E+07	2.89E-02	5.57E-10	0.4
mAbX3 IgG4	63.3±0.1	13.8	1.81E+07	≤1.00E-05	5.51E-13	≥1155.2
REGN1945	70.6±0.1	0.1	NB	NB	NB	NB

30

【 0 2 8 5 】

7 . 9 . 実施例 9 : バイオアッセイにおける抗ヒトリガンド X 二重特異性 F c - F a b の活性

精製された抗ヒトリガンド X 二重特異性 F c - F a b を、受容体 X シグナル伝達バイオアッセイにおいてヒトリガンド X を阻害するそれらの能力について評価した。受容体 X を通したリガンド X シグナル伝達についてのバイオアッセイを、操作されたルシフェラーゼレポーター細胞株を使用して実施した。レポーター細胞を、0 . 1 % ウシ胎児血清 (S e r a d i g m) を含む O p t i - M E M (G i b c o) に 1 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで播種し、一晚インキュベートした。リガンド X 用量応答曲線について、1 : 3 段階希釈リガンド X を、2 n M で開始するリガンド X の最終濃度で、各ウェルに添加した。抗リガンド X 親 m A b および二重特異性 F c - F a b の遮断活性を決定するために、抗体およびリガンド X を同時にレポーター細胞に添加された「レースフォーマット」遮断アッセイを使用した。抗リガンド X 抗体を、1 0 0 n M で開始する最終濃度で、1 : 3 で段階希釈した。ヒトリガンド X を、1 0 p M、1 0 0 p M、または 1 n M の一定濃度まで添加した。5 . 5 時間のインキュベーション後、アッセイプレートを室温で 1 5 分間平衡化した。1 0 0

40

50

μlのOne-Glo基質(Promega)を各ウェルに加えた。室温で5分のインキュベーション後、発光をEnvisionで測定した。

【0286】

受容体Xバイオアッセイにおける3つの抗ヒトリガンドX二重特異性Fc-Fabの活性を、図16A~16C(mAbX1 x mAbX2)、図17A~17C(mAbX2 x mAbX3)、および図18A~18C(mAbX1 x mAbX3)に示す。それらの活性を、同じアッセイにおいて対応する抗ヒトリガンドX親mAbと比較した。mAbX1 x mAbX2 Fc-Fabは、最良の遮断活性を有し、親抗リガンドX mAbよりも大幅に改善されたIC₅₀値を示す。親mAbのうちの1つ、mAbX3は、mAbがヒトリガンドXに対して100~1000倍モル過剰である場合も、バイオアッセイにおいてベースラインに対してリガンドX活性を遮断しない。興味深いことに、mAbX3 Fc-Fabを使用する2つのFc-Fabは、ベースラインに対してリガンドX活性を遮断することができる(図17A~17Cおよび図18A~18C)。これらの結果は、それらの親抗リガンドX mAbと比較される場合、二重特異性Fc-Fabの優れた活性を示す。これらの抗リガンドX抗体のIC₅₀値を、表5-16にまとめる。

【表19】

表 5-16 リガンドX遮断バイオアッセイにおけるリガンドX二重特異性Fc-FabのIC ₅₀ 値			
リガンドX EC ₅₀ [M]	4.90E-12	1.19E-11	1.19E-11
阻害アッセイにおける定常リガンドX	10pM	100pM	1nM
抗リガンドX	レースフォーマット阻害アッセイにおけるIC ₅₀		
mAbX3-hlgG4	5.12E-11	弱い阻害	阻害なし
mAbX1-hlgG4	4.84E-09	2.88E-08	弱い阻害
mAbX2-hlgG4	9.42E-10	5.87E-09	弱い阻害
Fc-Fab mAbX3 x mAbX1	4.2E-11	2.33E-10	1.99E-09
Fc-Fab mAbX3 x mAbX2	1.36E-11	1.49E-10	1.72E-09
Fc-Fab mAbX1 x mAbX2	7.34E-12	1.07E-10	9.07E-10

【0287】

7.10. 実施例10: 多角度レーザー光散乱と組み合わせられた非対称流場流分画(A4F-MALLS)による抗リガンドXヘテロダイマーと組換えリガンドXとの間で形成されたインビトロ複合体のサイズ分析

親mAbとの複合体と比較した、Fc-Fab、クランプ、および2+2タンデムFabヘテロダイマーフォーマットにおける組換えリガンドXと二重特異性mAbX1 x mAbX2との間で形成されたインビトロ複合体のサイズ分析は、セクション7.4に記載される多角度レーザー光散乱と組み合わせられた非対称流場流分画(A4F-MALLS)を使用して実施した。この分析の結果を、図19A~19Eに示す。図19Aおよび19Bは、リガンドXと親mAb(単独または組み合わせ)との複合体のインビトロ分析の結果を示し、図19Cは、リガンドXとmAbX1 x mAbX2 Fc-Fabとの複合体のインビトロ分析の結果を示し、図19Dは、リガンドXとmAbX1 x mAbX2 クランプとの複合体のインビトロ分析の結果を示し、図19Eは、リガンドXとmAbX1 x mAbX2 2+2タンデムFabヘテロダイマーとの複合体のインビトロ分析の結果を示す。図19Cに示されるように、Fc-Fabフォーマットは、最小量のペーパードーリングまたは凝集を示す。

【0288】

7.11. 実施例11: Fc-Fabは細胞表面標的への結合を維持する

低分子可溶性抗原に加えて、細胞表面タンパク質をFc-Fabの標的として試験した。抗原Y、細胞表面抗原に対するIgG抗体は、低減したエフェクター機能を有するhIgG1定常領域(図20A)またはhIgG4定常領域(US9359437B2)(hIgG4として示される、図20B、20C、20D)のいずれかを使用して、単一特異性Fc-Fabに再フォーマット化した(図1Bに示され、ヒンジフォーマットは図13

Aに示される)。3つの異なるリンカー、1 x G 4 S (配列番号3)、2 x G 4 S (配列番号18)、および3 x G 4 S (配列番号4)を、各抗抗原Y Fc-Fabについて試験した。これらのFc-Fabは、フローサイトメトリー (FACS) 結合アッセイにおいて細胞表面抗原Yへの結合について評価した。抗原Y発現細胞を収集し、冷FACS洗浄緩衝液 (PBS + 1% FBS) に再懸濁した。各結合アッセイについて、50,000 ~ 100,000個の細胞をFACS洗浄緩衝液中の一次抗体と4℃で30分間インキュベートした。細胞を冷FACS洗浄緩衝液で2回洗浄し、APC-F(ab)'₂抗ヒトIgG Fcγフラグメント (Jackson ImmunoResearch Laboratories) の1:200希釈液と4℃で30分間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、細胞を冷FACS洗浄緩衝液で2回洗浄し、FACS Canto (BD Biosciences) で分析した。

10

【0289】

すべてのFc-Fabは、細胞表面抗原Yへの強い結合を維持した。2セットのFc-Fabは、それらの親mAbと同様の結合活性を有した (図20Aおよび20B)。他の2セットのFc-Fabは、それらの親mAbと比較される場合、抗原Yへの中程度に低減した結合を示した (図20Cおよび20D)。1 x G 4 S (配列番号3) と3 x G 4 S (配列番号4) との間のリンカー長の変動は、抗抗原Y Fc-Fabの標的結合に最小限の影響を有した。

【0290】

CD3および細胞表面腫瘍関連抗原、抗原Zを含む、追加の細胞表面タンパク質をFc-Fabの標的として試験した。Fc-Fabは、図13Aに示されるヒンジフォーマットを有した。FACS結合アッセイでは、抗CD3 hIgG1 Fc-Fabは、CD3 + Jurkat細胞への特異的結合を示し (図21A)、抗抗原Z hIgG1 Fc-Fabは、抗原Z + 細胞株への特異的結合を示した (図21B)。1 x G 4 S (配列番号3) と5 x G 4 S (配列番号39) との間のリンカー長の変動は、これらのFc-Fabの標的結合にわずかな影響を及ぼし、最短のリンカーは、CD3および抗原Zの両方への適度により弱い結合活性をもたらした。

20

【0291】

7.12. 実施例12: 二重特異性CD3 x 抗原Z Fc-Fabはエフェクター細胞としてT細胞を使用するバイオアッセイにおいて活性である

30

CD3および抗原Z (細胞表面腫瘍関連抗原) に対する二重特異性Fc-Fabを、hIgG1の定常領域を使用して、実施例1に記載されるように生成した。3つの異なるリンカー、1 x G 4 S (配列番号3)、2 x G 4 S (配列番号18)、および3 x G 4 S (配列番号4)を、図13Aに示されるヒンジフォーマットを有するこれらの二重特異性Fc-Fabについて試験した。二重特異性Fc-Fabの活性を、Jurkat NFAT-ルシフェラーゼレポーターアッセイ (図22A) およびインビトロ細胞毒性アッセイ (図22B) において評価した。Jurkat NFAT-ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、Jurkat/NFAT-Lucレポーター細胞株を96ウェルプレートにおいて抗原Z + 細胞株 (各50,000細胞) と1:1比で混合した。CD3 x 抗原Z二重特異性Fc-Fabを各ウェルに100μLの最終体積まで添加した。反応物を37℃で5時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、100μLのOne-Glo基質 (Promega) の各ウェルへの添加前に室温で10分間平衡化した。発光をVictorで測定した。細胞毒性アッセイでは、CD3/CD28ビーズおよびIL-2で7日間活性化されたヒトドナーPBMCを使用して、予め活性化されたヒトT細胞を調製した。細胞毒性アッセイの日に、抗原Z + 細胞を採取し、8μMのカルセインAM (Invitrogen) で30分間標識した。標識された標的細胞を2回洗浄し、予め活性化されたヒトT細胞と1:10比で、約10,000個の標的細胞/ウェルで混合した。CD3 x 抗原Z二重特異性Fc-Fabの段階希釈液を、200μLの最終体積まで添加した。反応物を37℃で3時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを遠心分離し、100μLの上清を蛍光読み取りのために半透明の黒い透明な底の

40

50

プレートに移した。C D 3 x 抗原 Z 二重特異性 F c - F a b は、J u r k a t レポーターアッセイ (図 2 2 A) および細胞毒性アッセイ (図 2 2 B) の両方において活性であった。両方のアッセイにおいて、より長いリンカーを有する F c - F a b は、より強い活性を示した。

【0292】

8. 具体的な実施形態

本開示は、以下の群 A および群 B 具体的な実施形態によって例示される。

【0293】

以下の具体的な実施形態および以下の特許請求の範囲の好ましい態様では、抗原結合ドメイン (例えば、F a b) は、ヒト化またはヒト V H および V L 配列を含有し、F c ドメインは、ヒト C H 2 および／または C H 3 ドメインならびにそのバリエーション、例えば、そのようなヒト配列に対して少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% の配列同一性を有するバリエーションを含む。さらに、F a b ドメインは、2 つのポリペプチド鎖、本明細書に記載される V H ポリペプチド鎖および V L ポリペプチド鎖、または V H および V L が単一のポリペプチド鎖に存在する単鎖 F a b (「s c F a b」) から構成される F a b ドメインであり得る。特に明記されない限り、F a b ドメインはまた、ドメイン交換、例えば、C r o s s m a b フォーマットに存在するドメイン交換を含むことができる。

【0294】

8. 1. 群 A 具体的な実施形態

1. 第 1 の標的分子に結合し、

(a)

(i) 2 つの F c ドメインを含む F c 領域、

(i i) 第 1 の F a b ドメインおよび第 2 の F a b ドメインを含み、

F c 領域、第 1 の F a b ドメインおよび第 2 の F a b ドメインが、非天然免疫グロブリン構成であり

第 1 の F a b ドメインおよび／または第 2 の F a b ドメインが、第 1 の標的分子に結合することができ、

(b) 少なくとも 2 つの F a b ドメインを含む天然免疫グロブリンよりも大きな親和性および／または親和力で第 1 の標的分子に結合する、抗原結合分子。

2. 第 1 の標的分子に結合し、

(a) N から C 末端配向で

(i) 第 1 の F c ドメイン、および

(i i) 第 1 の軽鎖可変領域 (V L) に会合した第 1 の重鎖可変領域 (V H) を含む第 1 の F a b ドメインを含む、第 1 のポリペプチドと、

(b) N から C 末端配向で

(i) 第 2 の F c ドメイン、および

(i i) 第 2 の V L に会合した第 2 の V H を含む第 2 の F a b ドメインを含む、第 2 のポリペプチドと、を含み、

第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインが、互いに会合して F c 領域を形成し、任意に、第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドが、同一である、任意に、実施形態 1 による抗原結合分子である、抗原結合分子。

3. 第 1 の F c ドメインと第 1 の V H との間に第 1 のリンカーを含む、実施形態 2 の抗原結合分子。

4. 第 1 のリンカーが、5 アミノ酸～60 アミノ酸の長さである、実施形態 3 の抗原結合分子。

5. 第 1 のリンカーが、10 アミノ酸～60 アミノ酸残基の長さである、実施形態 3 の抗原結合分子。

6. 第 1 のリンカーが、5 アミノ酸～20 アミノ酸残基の長さである、実施形態 3 の抗

10

20

30

40

50

原結合分子。

7. 第1のリンカーが、5アミノ酸～30アミノ酸残基の長さである、実施形態3の抗原結合分子。

8. 第1のリンカーが、10アミノ酸～30アミノ酸残基の長さである、実施形態3の抗原結合分子。

9. 第1のリンカーが、10アミノ酸～20アミノ酸残基の長さである、実施形態3の抗原結合分子。

10. 第1のリンカーが、20アミノ酸～50アミノ酸の長さである、実施形態3の抗原結合分子。

11. 第1のリンカーが、25～35アミノ酸の長さである、実施形態3の抗原結合分子。

10

12. 第1のリンカーが、 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、任意に、 n が、1～7の整数である、実施形態3～11のいずれか1つの抗原結合分子。

13. 第1のリンカーが、 G_4S （配列番号3）のマルチマーを含む、実施形態12の抗原結合分子。

14. 第1のリンカーが、 G_4S （配列番号3）の2～6つのリピートを含む、実施形態13の抗原結合分子。

15. 第1のリンカーが、 $(G_4S)_2$ （配列番号18）、 $(G_4S)_3$ （配列番号4）、または $(G_4S)_4$ （配列番号19）を含む、実施形態14の抗原結合分子。

16. 第2のFcドメインと第2のVHとの間に第2のリンカーを含む、実施形態3～15のいずれか1つの抗原結合分子。

20

17. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態16の抗原結合分子。

18. 第2のリンカーが、5アミノ酸～60アミノ酸の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

19. 第2のリンカーが、10アミノ酸～60アミノ酸の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

20. 第1のリンカーが、5アミノ酸～20アミノ酸残基の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

21. 第1のリンカーが、5アミノ酸～30アミノ酸残基の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

30

22. 第1のリンカーが、10アミノ酸～30アミノ酸残基の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

23. 第1のリンカーが、10アミノ酸～20アミノ酸残基の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

24. 第2のリンカーが、20アミノ酸～50アミノ酸の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

25. 第2のリンカーが、25～35アミノ酸の長さである、実施形態16または実施形態17の抗原結合分子。

26. 第2のリンカーが、 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、任意に、 n が、1～7の整数である、実施形態16～25のいずれか1つの抗原結合分子。

40

27. 第2のリンカーが、 G_4S （配列番号3）のマルチマーを含む、実施形態26の抗原結合分子。

28. 第2のリンカーが、 G_4S （配列番号3）の2～6つのリピートを含む、実施形態27の抗原結合分子。

29. 第2のリンカーが、 $(G_4S)_2$ （配列番号18）、 $(G_4S)_3$ （配列番号4）、または $(G_4S)_4$ （配列番号19）を含む、実施形態28の抗原結合分子。

30. 第1のポリペプチドが、第1のFcドメインのN末端にある第1のヒンジドメインを含み、第2のポリペプチドが、第2のFcドメインのN末端にある第2のヒンジドメインを含む、実施形態2～29のいずれか1つの抗原結合分子。

50

31. 第1のヒンジドメインおよび第2のヒンジドメインが、ジスルフィド結合を介して連結される、実施形態30の抗原結合分子。

32. 第1のヒンジドメインおよび第2のヒンジドメインが、ジスルフィド結合を介して連結されない、実施形態30の抗原結合分子。

33. 第1のポリペプチドが、第1のFcドメインのN末端にあるVHを含まない、実施形態2～32のいずれか1つの抗原結合分子。

34. 第2のポリペプチドが、第2のFcドメインのN末端にあるVHを含まない、実施形態2～33のいずれか1つの抗原結合分子。

35. 1つのヒンジ領域を有する、実施形態2～29のいずれか1つの抗原結合分子。

36. 図13Aに示されるヒンジフォーマットを有する、実施形態35の抗原結合分子。

37. 図13Cに示されるヒンジフォーマットを有する、実施形態35の抗原結合分子。

38. 2つのヒンジ領域を有する、実施形態2～29のいずれか1つの抗原結合分子。

39. 図13Bに示されるヒンジフォーマットを有する、実施形態38の抗原結合分子。

40. 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、非同一である、実施形態2～39のいずれか1つの抗原結合分子。

41. 第1のVLおよび第2のVLが、普遍的な軽鎖である、実施形態2～40のいずれか1つの抗原結合分子。

42. 第1のFabドメインまたは第2のFabドメインの軽鎖定常領域および第1の重鎖定常領域(CH1)が、Crossma b配置にある、実施形態2～40のいずれか1つの抗原結合分子。

43. 二価である、実施形態1～42のいずれか1つの抗原結合分子。

44.

(a) NからC末端配向で

(i) 第1のVLに会合した第1のVHを含む第1のFabドメイン、

(ii) 第1のスペーサドメイン、

(iii) 第1のFcドメインを含む、第1のポリペプチドと、

(b) NからC末端配向で

(i) 第2のVLに会合した第2のVHを含む第2のFabドメイン、

(ii) 第2のスペーサドメイン、

(iii) 第2のFcドメインを含む、第2のポリペプチドと、を含む、任意に、

実施形態1による抗原結合分子であり、

第1のFabドメインおよび／または第2のFabドメインが、第1の標的分子に結合することができ、第1のFcドメインおよび第2のFcドメインが、互いに会合してFc領域を形成し、任意に第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、同一である、抗原結合分子。

45. 第1のスペーサドメインと第1のFcドメインとの間、および第2のスペーサドメインと第2のFcドメインとの間にヒンジドメインを含む、実施形態44の抗原結合分子。

46. ヒンジドメインが、ジスルフィド結合を介して連結される、実施形態44または実施形態45の抗原結合分子。

47. 第1のVLおよび第2のVLが、普遍的な軽鎖である、実施形態44～46のいずれか1つの抗原結合分子。

48. 第1のFabドメインまたは第2のFabドメインの軽鎖定常領域および第1の重鎖定常領域(CH1)が、Crossma b配置にある、実施形態44～46のいずれか1つの抗原結合分子。

49. 第1のスペーサドメインおよび第2のスペーサドメインが、各々伸長リンカーを含む、実施形態44～48のいずれか1つの抗原結合分子。

50. 各伸長リンカーが、少なくとも30アミノ酸の長さである、実施形態49の抗原結合分子。

51. 各伸長リンカーが、30酸残基～70アミノ酸の長さである、実施形態49また

10

20

30

40

50

は実施形態50の抗原結合分子。

52. 各伸長リンカーが、30酸残基～55アミノ酸の長さである、実施形態49または実施形態50の抗原結合分子。

53. 各伸長リンカーが、30酸残基～40アミノ酸の長さである、実施形態49または実施形態50の抗原結合分子。

54. 各伸長リンカーが、 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、任意に、 n が、1～7の整数である、実施形態49～53のいずれか1つの抗原結合分子。

55. 各伸長リンカーが、 G_4S （配列番号3）のマルチマーを含む、実施形態54の抗原結合分子。

56. 各伸長リンカーが、 G_4S （配列番号3）の5～12個のリピートをを含む、実施形態55の抗原結合分子。

57. 各伸長リンカーが、 $(G_4S)_6$ （配列番号38）、 $(G_4S)_7$ （配列番号36）、または $(G_4S)_8$ （配列番号37）を含む、実施形態56の抗原結合分子。

58. 第1および第2のスペーサドメインが、同一である、実施形態44～57のいずれか1つの抗原結合分子。

59. 二価である、実施形態44～58のいずれか1つの抗原結合分子。

60. 第1のスペーサドメインが、第3のVLに会合した第3のVHを含む第3のFabドメインを含み、第2のスペーサドメインが、第4のVLに会合した第4のVHを含む第4のFabドメインを含む、実施形態44の抗原結合分子。

61. 第3のVLおよび第4のVLが、Fc領域を有する普遍的な軽鎖である、実施形態60の抗原結合分子。

62. 第1のポリペプチドが、第1のVHと第3のVHとの間に第1のリンカーを含み、第2のポリペプチドが、第2のVHと第4のVHとの間に第2のリンカーを含む、実施形態60または実施形態61の抗原結合分子。

63. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々10アミノ酸～60アミノ酸の長さである、実施形態62の抗原結合分子。

64. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々20アミノ酸～50アミノ酸の長さである、実施形態62または実施形態63の抗原結合分子。

65. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々25～35アミノ酸の長さである、実施形態62または実施形態63の抗原結合分子。

66. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々 G_nS または SG_n のマルチマーを含み、任意に、 n が、1～7の整数である、実施形態62または実施形態63の抗原結合分子。

67. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々 G_4S （配列番号3）のマルチマーを含む、実施形態66の抗原結合分子。

68. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々 G_4S （配列番号3）の2～6つのリピートをを含む、実施形態67の抗原結合分子。

69. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々 $(G_4S)_2$ （配列番号18）、 $(G_4S)_3$ （配列番号4）、または $(G_4S)_4$ （配列番号19）を含む、実施形態68の抗原結合分子。

70. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態62～69のいずれか1つの抗原結合分子。

71. 第3のFabドメインおよび第4のFabドメインが、非結合性である、実施形態60～70のいずれか1つの抗原結合分子。

72. 第3のVHおよび第4のVHが、普遍的な重鎖である、実施形態71の抗原結合分子。

73. 第1のFabドメインおよび第2のFabドメインが、各々第1の標的分子上の同じまたは異なるエピトープに結合することができる、実施形態71または実施形態72の抗原結合分子。

74. 二価である、実施形態60～73のいずれか1つの抗原結合分子。

10

20

30

40

50

75. 第3のFabドメインおよび第4のFabドメインが、各々同じまたは異なるエピトープに結合することができる、実施形態60～70のいずれか1つの抗原結合分子。

76. 第3のFabドメインおよび第4のFabドメインが、各々同じ標的分子に結合することができる、実施形態75の抗原結合分子。

77. 第3のFabドメインおよび第4のFabドメインが、各々第1の標的分子に結合することができる、実施形態76の抗原結合分子。

78. 第1および第2のFabドメインが、同じエピトープに結合する、実施形態75～77のいずれか1つの抗原結合分子。

79. 第1および第2のFabドメインが、同一の配列を有する、実施形態78の抗原結合分子。

80. 第3および第4のFabドメインが、同じエピトープに結合する、実施形態75～79のいずれか1つの抗原結合分子。

81. 第3および第4のFabドメインが、同一の配列を有する、実施形態80の抗原結合分子。

82. 第1および第3のFabドメインが、同じエピトープに結合する、実施形態75～77のいずれか1つの抗原結合分子。

83. 第1および第3のFabドメインが、同一の配列を有する、実施形態82の抗原結合分子。

84. 第2および第4のFabドメインが、同じエピトープに結合する、実施形態75～77、82、および83のいずれか1つの抗原結合分子。

85. 第2および第4のFabドメインが、同一の配列を有する、実施形態84の抗原結合分子。

86. 四価である、実施形態60～70および75～85のいずれか1つの抗原結合分子。

87. 第1の標的分子のアンタゴニストである、実施形態1～86のいずれか1つの抗原結合分子。

88. 結合パートナーへの第1の標的分子の結合を阻害し、任意に、結合パートナーが、第1の標的分子の受容体である、実施形態1～87のいずれか1つの抗原結合分子。

89. Fc領域が、ヒトFc配列を含む、実施形態1～88のいずれか1つの抗原結合分子。

90. Fc領域が、ヒトIgG₁またはヒトIgG₄ Fc配列を含む、実施形態1～89のいずれか1つの抗原結合分子。

91. Fc領域が、Fcヘテロダイマーを含む、実施形態1～90のいずれか1つの抗原結合分子。

92. FcヘテロダイマーにおけるFcドメインが、野生型Fcドメインと比較してノブインホール変異を含む、実施形態89の抗原結合分子。

93. 第1のポリペプチドにおけるFcドメインが、ノブ変異を含み、第2のポリペプチドにおけるFcドメインが、ホール変異を含む、実施形態92の抗原結合分子。

94. 第2のポリペプチドにおけるFcドメインが、ノブ変異を含み、第1のポリペプチドにおけるFcドメインが、ホール変異を含む、実施形態92の抗原結合分子。

95. Fc領域が、野生型Fc領域と比較して星型変異を含む、実施形態89の抗原結合分子。

96. 第1のポリペプチドにおけるFcドメインが、H435R変異およびY436F変異を含む、実施形態89の抗原結合分子。

97. 第2のポリペプチドにおけるFcドメインが、H435R変異およびY436F変異を含む、実施形態89の抗原結合分子。

98. 第1のFabドメインにおけるCLおよびCH1が、ジスルフィド結合によって連結される、実施形態1～97のいずれか1つの抗原結合分子。

99. 第2のFabドメインにおけるCLおよびCH1が、ジスルフィド結合によって連結される、実施形態1～98のいずれか1つの抗原結合分子。

10

20

30

40

50

100. 第1のFabドメインおよび第2のFabドメインが、第1の標的分子に結合する、実施形態1～99のいずれか1つの抗原結合分子。

101. 第1の標的分子が、低分子可溶性リガンドである、実施形態1～100のいずれか1つの抗原結合分子。

102. 第1の標的分子が、サイトカインまたはケモカインである、実施形態1～101のいずれか1つの抗原結合分子。

103. 第1の標的分子が、細胞表面タンパク質である、実施形態1～100のいずれか1つの抗原結合分子。

104. 第1の標的分子が、腫瘍関連抗原である、実施形態1～100および103のいずれか1つの抗原結合分子。

105. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて100 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

106. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて100 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

107. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて75 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

108. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて75 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

109. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて60 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

110. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて60 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

111. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて45 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

112. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて45 kDa未満の分子量を有する分子を有する、実施形態1～104のいずれか1つの抗原結合分子。

113. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて少なくとも5 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

114. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて少なくとも5 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

115. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて少なくとも5 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

116. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて少なくとも5 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

117. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を除いて少なくとも10 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

118. 第1の標的分子が、翻訳後修飾を含めて少なくとも10 kDaの分子量を有する分子を有する、実施形態1～112のいずれか1つの抗原結合分子。

119. 第1の標的分子が、グリコシル化される、実施形態1～118のいずれか1つの抗原結合分子。

120. 第1の標的分子が、グリコシル化されない、実施形態1～118のいずれか1つの抗原結合分子。

121. 第1の標的分子が、モノマーである、実施形態1～120のいずれか1つの抗原結合分子。

122. 第1の標的分子が、ダイマーである、実施形態1～120のいずれか1つの抗原結合分子。

123. 第1の標的分子が、ホモダイマーである、実施形態122の抗原結合分子。

124. 第1の標的分子が、ヘテロダイマーである、実施形態122の抗原結合分子。

125. 第1の標的分子が、トリマーである、実施形態1～120のいずれか1つの抗原結合分子。

10

20

30

40

50

126. 第1の標的分子が、ホモトリマーである、実施形態125の抗原結合分子。
127. 第1の標的分子が、テトラマーである、実施形態1～120のいずれか1つの抗原結合分子。
128. 第1の標的分子が、ホモテトラマーである、実施形態127の抗原結合分子。
129. 単一特異性である、実施形態1～128のいずれか1つの抗原結合分子。
130. 二重特異性である、実施形態1～128のいずれか1つの抗原結合分子。
131. 第1の標的分子上の第1のエピトープおよび第2のエピトープに結合することができる、実施形態130の抗原結合分子。
132. 第1の標的分子上の第1のエピトープに結合する少なくとも1つのFabドメインおよび第2のエピトープに結合する少なくとも1つのFabドメインを含む、実施形態131の抗原結合分子。
133. 第1の標的分子上の異なるエピトープに同時に結合することができる、実施形態132の抗原結合分子。
134. 第1の標的分子および第2の標的分子に結合することができる、実施形態130の抗原結合分子。
135. 第1の標的分子に結合する少なくとも1つのFabドメインおよび第2の標的分子に結合する少なくとも1つのFabドメインを含む、実施形態134の抗原結合分子。
136. 第1の標的分子および第2の標的分子に同時に結合することができる、実施形態135の抗原結合分子。
137. 第1のFabおよび第2のFabを含むヒトIgG抗体と比較してより低いIC₅₀でその受容体への標的分子の結合を遮断する、実施形態1～136のいずれか1つの抗原結合分子。
138. 第1のFabおよび第2のFabを含むヒトIgG抗体よりも大きな親和性で標的分子に結合する、実施形態1～137のいずれか1つの抗原結合分子。
139. 実施形態1～138のいずれか1つの抗原結合分子および細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤を含むコンジュゲート。
140. 実施形態1～138のいずれか1つの抗原結合分子または実施形態139のコンジュゲートおよび賦形剤を含む薬学的組成物。
141. 対象に有効量の実施形態1～138のいずれか1つによる抗原結合分子、実施形態139のコンジュゲート、または実施形態140の薬学的組成物を投与することを含む、標的分子の異常な発現または活性に関連した状態を有する対象を治療する方法。
142. 対象に有効量の実施形態1～138のいずれか1つによる抗原結合分子、実施形態139のコンジュゲート、または実施形態140の薬学的組成物を投与することを含む、対象における標的分子に関連した分子経路を阻害する方法。
143. 抗原結合分子、コンジュゲート、または薬学的組成物にそれぞれ存在する抗原結合分子もしくはコンジュゲートによって結合した標的分子に関連した状態の治療のための医薬品の製造における、実施形態1～138のいずれか1つによる抗原結合分子、実施形態139のコンジュゲート、または実施形態140の薬学的組成物の使用。
144. 実施形態1～138のいずれか1つの抗原結合分子をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む核酸分子または複数の核酸分子。
145. 1つ以上のヌクレオチド配列が、各々発現制御配列に作動可能に連結されている、実施形態144の核酸分子または複数の核酸分子。
146. 実施形態1～138のいずれか1つの抗原結合分子を発現するように操作された細胞。
147. 実施形態1～138のいずれか1つの抗原結合分子を1つ以上のプロモーターの制御下でコードする1つ以上の核酸配列を含む1つ以上の発現ベクターでトランスフェクトされた細胞。
148. (a) 実施形態146または実施形態147の細胞を抗原結合分子が発現される条件下で培養することと、
- (b) 細胞培養から抗原結合分子を回収することと、を含む、実施形態1～138の

10

20

30

40

50

いずれか1つの抗原結合分子を産生する方法。

149. 抗原結合分子を濃縮することをさらに含む、実施形態148の方法。

150. 抗原結合分子を精製することをさらに含む、実施形態148または実施形態149の方法。

【0295】

8. 2. 群B 具体的な実施形態

1. (a) 第1の重鎖ポリペプチドであって、第1の重鎖ポリペプチドが、第1のCHアミノ酸配列、第1のVHアミノ酸配列、および第2のCHアミノ酸配列を含み、第1のVHアミノ酸配列が、第1のCHアミノ酸配列と第2のCHアミノ酸配列との間にある、第1の重鎖ポリペプチドと、

(b) 第2の重鎖ポリペプチドであって、第2の重鎖ポリペプチドが、第3のCHアミノ酸配列、第2のVHアミノ酸配列、および第4のCHアミノ酸配列を含み、第2のVHアミノ酸配列が、第3のCHアミノ酸配列と第4のCHアミノ酸配列との間にある、第2の重鎖ポリペプチドと、を含む、抗原結合分子。

2. 第1のCHアミノ酸配列が、第1のVHアミノ酸配列のN末端に位置する第1のCH3アミノ酸配列を含む、実施形態1の抗原結合分子。

3. 第1のCH3が、H435R変異およびY436F変異を含む、実施形態2の抗原結合分子。

4. 第1のVHアミノ酸配列のN末端を第1のCH3アミノ酸配列のC末端に連結する第1のリンカーをさらに含む、実施形態2または実施形態3の抗原結合分子。

5. 第3のCHアミノ酸配列が、第2のVHアミノ酸配列のN末端に位置する第2のCH3アミノ酸配列を含む、実施形態1～4のいずれか1つの抗原結合分子。

6. 第2のVHアミノ酸配列のN末端を第2のCH3アミノ酸配列のC末端に連結する第2のリンカーをさらに含む、実施形態5の抗原結合分子。

7. 第2のCHアミノ酸配列が、第1のVHアミノ酸配列のC末端に位置する第1のCH1アミノ酸配列を含む、実施形態1～6のいずれか1つの抗原結合分子。

8. 第4のCHアミノ酸配列が、第2のVHアミノ酸配列のC末端に位置する第2のCH2アミノ酸配列を含む、実施形態1～7のいずれか1つの抗原結合分子。

9. 第1のCH3アミノ酸配列のN末端に位置する第1のCH2アミノ酸配列をさらに含む、実施形態1～8のいずれか1つの抗原結合分子。

10. 第2のCH3アミノ酸配列のN末端に位置する第2のCH2アミノ酸配列をさらに含む、実施形態1～9のいずれか1つの抗原結合分子。

11. 抗原結合分子が、ヒンジ領域ジスルフィド結合を含まない、実施形態1～10のいずれか1つの抗原結合分子。

12. 第1の軽鎖ポリペプチドをさらに含み、第1の軽鎖ポリペプチドが、第1のVLアミノ酸配列、および第1のCLアミノ酸配列を含む、実施形態1～11のいずれか1つの抗原結合分子。

13. 第1のCLを第1のCH1に連結するジスルフィド結合をさらに含む、実施形態12の抗原結合分子。

14. 第2の軽鎖ポリペプチドをさらに含み、第2の軽鎖ポリペプチドが、第2のVLアミノ酸配列、および第2のCLアミノ酸配列を含む、実施形態1～13のいずれか1つの抗原結合分子。

15. 第2のCLを第2のCH1に連結するジスルフィド結合をさらに含む、実施形態14の抗原結合分子。

16. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々ポリペプチドを含む、実施形態6～15のいずれか1つの抗原結合分子。

17. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、0～50アミノ酸の長さを有する、実施形態16の抗原結合分子。

18. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態16～17のいずれか1つの抗原結合分子。

10

20

30

40

50

19. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列を含む、実施形態16～18のいずれか1つの抗原結合分子。

20. ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列が、2～6つのリピーティングGGGS（配列番号3）アミノ酸配列を含む、実施形態19の抗原結合分子。

21. ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列が、(G4S)₂（配列番号18）、(G4S)₃（配列番号4）、または(G4S)₄（配列番号19）を含む、実施形態20の抗原結合分子。

22. 第1の軽鎖ポリペプチドおよび第2の軽鎖ポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態14～21のいずれか1つの抗原結合分子。

23. 第1の重鎖ポリペプチド、第2の重鎖ポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態1～22のいずれか1つの抗原結合分子。

24. 第1の重鎖ポリペプチド、第2の重鎖ポリペプチドが、非同一のアミノ酸配列を有する、実施形態1～22のいずれか1つの抗原結合分子。

25. 抗原結合分子が、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRLI、ADORA2A、アグリカン、AGR2、AICDA、AIF1、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、AZGP1（亜鉛-α-糖タンパク質）、ART-4、B7、B7.1、B7.2、BAD、BAFF、BAGI、BAII、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLRL（MDRLS）、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B（GDF10）、BMP4、BMP6、BMPS、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、BPAG1（プレクチン）、BRCA1、Ba-733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-I、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CDS、CD8、CDI-IA、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、C19orf10（IL27w）、C3、C4A、CS、CSR1、CANT1、CASPI、CASP4、CAV1、CCBP2（D6/JAB61）、CCLI（I-309）、CCLII（エオタキシン）、CCL13（MCP-4）、CCLIS（MIP-1d）、CCL16（HCC-4）、CCL17（TARC）、CCLIS（PARC）、CCL19（MIP-3b）、CCL2（MCP-1）、MCAF、CCL20（MIP-3a）、CCL21（MIP-2）、SLC、エクソダス-2、CCL22（MDC/STC-1）、CCL23（MPIF-1）、CCL24（MPIF-2/エオタキシン-2）、CCL2S（TECK）、CCL26（エオタキシン-3）、CCL27（CTACK/ILC）、CCL2S、CCL3（MIP1a）、CCL4（MIP-1b）、CCLS（RANTES）、CCL7（MCP-3）、CCLS（mcp-2）、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1（CKR1/HM14S）、CCR2（mcp-1RB/RA）、CCR3（CKR3/CMKBR3）、CCR4、CCRS（CMKBRSI chemR13）、CCR6（CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6）、CCR7（CKR7/EB1）、CCRS（CMKBR3/TER1/CKR-LI）、CCR9（GPR-9-6）、CCRLI（VSHK1）、CCRL2（L-CCR）、CD164、CDLC、CD200、CD-22、CD24、CD2S、CD3S、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD44、CD4SRB、CD47、CD4S、CD52、CD69、CD72、CD79A、CD79B、CDSO、CDS1、CDS3、CDS6、CD137、CD13S、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CDH1（E-カドヘリン）、CDH10、CD

10

20

30

40

50

H12、CDH13、CDH15、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A (p21 Wap1/Cip1)、CDKN1B (p27 Kip1)、CDKN1C、CDKN2A (p16 INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSFS、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSFS、CLDN3、CLDN7 (クローディン-7)、CLN3、CLU (クラステリン)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CNR1、COLISA1、COLIA1、COL4A3、COL6A1、CR2、CRP、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、CTLA-4、CTNNB1 (b-カテニン)、CTSB (カテプシンB)、CX3CLI (SCYD1)、CX3CR1 (V2S)、CXCLI (GRO1)、CXCLIO (IP-10)、CXCL11 (I-TAC/IP-9)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2 (GRO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCLS (ENA-7S/LIX)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCR3 (GPR9/CKRL2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYBS、CYC1、CYSLTR1、HIF-1-a、結腸特異的抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAB2IP、DES、DKFZp4S1J011S、DNCLI、DPP4、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、EN01、EN02、EN03、EPHB4、EPO、EREG、ERKS、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FADD、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF1S、FGF19、FGF2 (bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGFS、FGF7 (KGF)、FGFS、FGF9、FGFR3、FIGF (VEGFD)、FILI (EPSILON)、FILI (ZETA)、FLJ12SS4、FLJ2SS30、FLRT1 (フィブロネクチン)、FOS、FOSLI (FRA-1)、FY (DARC)、Flt-I、Flt-3、葉酸塩受容体、G250抗原、GAGE、GROB、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDFS、GFIL、GGTL、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44、GPRS1 (FKSGSO)、GRCC10 (C10)、GRP、GSN (ゲルソリン)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDACS、HDAC7A、HDAC9、HGF、HIP1ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HUMCYT2A、HLA-DR、HMI 24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素誘導因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2または1a、IGF-IR、
 【数5】

IFN- γ

IFN- α 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IL-1、IL-10、IL-10RA、IL-10RB、IL-11、IL-11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL-13RA1、IL-13RA2、IL-14、IL-1S、IL-1SRA、IL-16、IL-17、IL-17B、IL-1

7C、IL-17R、IL-18、IL-18BP、IL-18R1、IL-18RAP
 、IL-19、IL-1A、IL-1B、IL-1F10、IL-1FS、IL-1F6
 、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1HY1、IL-1R1、IL-
 1R2、IL-1RAP、IL-1RAPL1、IL-1RAPL2、IL-1RL1、
 IL-1RL2 IL-1RN、IL-2、IL-20、IL-20RA、IL-21R
 、IL-22、IL-22R、IL-22RA2、IL-23、IL-24、IL-2S
 、IL-26、IL-27、IL-28A、IL-28B、IL-29、IL-2RA、
 IL-2RB、IL-2RG、IL-3、IL-30、IL-3RA、IL-4、IL-
 4R、IL-S、IL-5RA、IL-6、IL-6R、IL-6ST (糖タンパク質1
 30)、IL-7、IL-7R、IL-S、IL-SRA、IL-SRB、IL-9、I
 L-9R、IL-K、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、I
 RAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 (a6インテグリン)、I
 TGAV、ITGB3、ITGB4 (b4インテグリン) インスリン様成長因子-I (I
 GF-1)、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA
 2、IFNA4 IFNAS、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNW1、JA
 G1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KITLG、KLF
 S (GC Box BP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14
 、KLK1S、KLK3、KLK4、KLKS、KLK6、KLK9、KRT1、KRT
 19 (ケラチン19)、KRT2A、KRTHB6 (毛髪特異的タイプIIケラチン)、
 KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、LAMAS
 、LEP (レプチン)、Lingo-p7S、Lingo-Troy、LPS、LTA (T
 NF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACM
 ARCKS、MAGまたはOmgp、MAP2K7 (c-Jun)、MDK、MIB1、
 ミッドカイン、MIF、MIP-2、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、
 MS4A1、MSMB、MT3 (メタロチオネクチン-III)、MTSS1、MUC1
 (ムチン)、MYC、MYD88、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF)、MAGE、
 MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCR
 P、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3
 、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA
 90、NCK2、ニューロカン、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGF
 R、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (Noga)、NgRp7S、NgR-
 Troy、NME1 (NM23A)、NOXS、NPPB、NROB1、NROB2、N
 R1D1、NR1D2、NRIH2、NRIH3、NRIH4、NR1I2、NR1I3
 、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2
 F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NRSA1、N
 RSA2、NR6A1、NRP1、NRP2、NTSE、NTN4、ODZ1、OPRD
 1、PCSK9、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、P
 CNA、PD-1、PD-L1、アルファ4ベータ7、OX40、GITR、TIM-3
 、Lag-3、B7-H3、B7-H4、GDFS、CGRP、Lingo-I、第IX
 a因子、第X因子、ICOS、GARP、BTLA、CD160、RORI、2B4、K
 IR、CD27、OX40、A2aR、PDGFA、PDGFB、PECAM1、PF4
 (CXCL4)、PGF、PGR、ホスファカン、PIAS2、PIK3CG、PLAU
 (uPA)、PLG、PLXDC1、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PR
 KCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR
 、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、膵臓がんムチン、胎盤成長因子、p5
 3、PLAGL2、前立腺性酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、10
 PIGF、ILGF、ILGF-IR、IL-6、RS5、RANTES、RAC2 (p
 21Rac2)、RARb、RGS1、RGS13、RGS3、RNFL10 (ZNF1
 44)、ROB02、S100A2、SCGB1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A
 1 (マンマグロビン2)、SCGB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球

10

20

30

40

50

活性化サイトカイン)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINBS (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B (Sprl)、ST6GAL1、STAB1、STATE、STEAP、STEAP2、TIOI、SAGE、5100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL受容体、TNF- α 、Tn-抗原、ThomsonFriedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1l1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TH1L、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIMP3、組織因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLRS、TLR6、TLR7、TLRS、TLR9、TNF、TNF- α 、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSFS、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSFS、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF1S (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSFS (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSFS (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-1BBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TPS3、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAPS、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-IA抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、CS、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、CD19/CD3、BCMA/CD3、EGFR、HER3、IL17RA/IL7R、IL-6/IL-23、IL1/IL-8、IL-6、IL-6R/IL-21、IL-21R、ANG2/VEGF、VEGF/PDGFR-ベータ、血管内皮成長因子 (VEGF) アクセプター2/CD3、PSMA/CD3、EPCAM/CD3、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、VEGFB、VEGFC、パーシカン、VHL CS、VLA-4、c-FMS/CSFIR、RET、HER3、HER4、IGFR、PDGFR、c-KIT、BCR、インテグリン、MMP VEGF、EGF、PIGF、PDGF、HGF、アンジオポエチン、ERBB-3/C-MET、ERBB-2/C-MET、EGF受容体1/CD3、EGFR/HER3、PSCA/CD3、C-MET/CD3、ENDOSIALIN/CD3、EPCAM/CD3、IGF-1R/CD3、FAPALPHA/CD3、EGFR/IGF-IR、IL 25 17A/F、EGF受容体1/CD3、およびCD19/CD16、KHI、Tn-抗原、TF-抗原、CD44、糖脂質、スフィンゴ糖脂質、例えば、30 Gg3、Gb3、GD3、GD2、Gb5、Gm1、Gm2、シアリルテトラオシルセラミド、XCL1 (リンホタクチン)、XCL2 (SCM-1b)、XCR1 (GPRS/CCXCR1)、YY1、ならびにZFPM2からなる群から選択される1つ以上の抗原に結合することができる、実施形態1~24のいずれか1つの抗原結合分子。

26. 抗原結合分子が、CD137およびCD20、CD137およびEGFR、CD137およびHer-2、CD137およびPD-1、CD137およびPDL-1、VEGFおよびPD-L1、Lag-3およびTIM-3、OX40およびPD-1、TIM-3およびPD-1、TIM-3およびPDL-1、EGFRおよびDLL-4、CD138およびCD20、CDI 38およびCD40、CDI 9およびCD20、CD20およびCD3、CD3およびCD33、CD3およびCD133、CD47およびCD20、CD38およびCD138、CD38およびCD20、CD20およびCD22、CD38およびCD40、CD40およびCD20、CD-8およびIL-6、CSPGsおよびRGM A、CTLA-4およびBTN02、IGF1およびIGF2、IGF

10

20

30

40

50

1／2およびErbB2、IGF-1RおよびEGFR、EGFRおよびCD13、IGF-1RおよびErbB3、EGFR-2およびIGFR、VEGFR-2およびMet、VEGF-Aおよびアンジオポエチン-2(Ang-2)、IL-12およびTWEAK、IL-13およびIL-1ベータ、PDGFRおよびVEGF、EpCAMおよびCD3、Her2およびCD3、CD19およびCD3、EGFRおよびHer3、CD16aおよびCD30、CD30およびPSMA、EGFRおよびCD3、CEAおよびCD3、TROP-2およびHSG、TROP-2およびCD3、MAGおよびRGM A、NgRおよびRGM A、NogoAおよびRGM A、OMGpおよびRGM A、PDL-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、RGMAおよびRGM B、Te38およびTNFa、TNFaおよびBlys、TNFaおよびCD-22、TNFaおよびCTLA-4ドメイン、TNFaおよびGP130、TNFaおよびIL-12p40、ならびにTNFaおよびRANKリガンドからなる群から選択される標的抗原の対に結合することができる、実施形態1～24のいずれか1つの抗原結合分子。

27. 抗原結合分子が、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(aFGF)、FGF2(bFGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1(EPSILON)、FIL1(ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、FGER1、FGFR2、FGFR3、EGFR、RORI、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L、A2aR、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70、CD40、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA(TNF-b)、LTB、TNF(TNF-a)、TNFSF4(OX40リガンド)、TNFSF5(CD40リガンド)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27リガンド)、TNFSF8(CD30リガンド)、TNFSF9(4-1BBリガンド)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(AP03L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、FIGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、ILIR1、ILIR2、ILIRLI、ILIRL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、ILIORA、ILIORB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、ILIRAP、ILIRAPLI、ILIRAPL2、ILIRN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP(レプチン)、PTN、およびTHPOからなる群から選択される1つまたは2つのサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、およびサイトカイン受容体に結合することができる、実施形態1～24のいずれか1つの抗原結合分子。

28. 抗原結合分子が、CCL1(I-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、CCL3(MIP1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCL11(エオタキシン)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CC

10

20

30

40

50

LI 7 (TARC)、CCLI 8 (PARC)、CCLI 9 (MIP-3b)、CCL 20 (MIP-3a)、CCL 21 (SLC/エクソダス-2)、CCL 22 (MDC/STC-1)、CCL 23 (MPIF-1)、CCL 24 (MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL 25 (TECK)、CCL 26 (エオタキシン-3)、CCL 27 (CTACK/ILC)、CCL 28、CXCLI (GRO1)、CXCL 2 (GRO2)、CXCL 3 (GRO3)、CXCL 5 (ENA-78)、CXCL 6 (GCP-2)、CXCL 9 (MIG)、CXCLIO (IP 10)、CXCL 11 (I-TAC)、CXCL 12 (SDF1)、CXCL 13、CXCL 14、CXCL 16、PF4 (CXCL 4)、PPBP (CXCL 7)、CX3CL 1 (SCYD1)、SCYE1、XCL 1 (リンホタクチン)、XCL 2 (SCM-1b)、BLR 1 (MDR15)、CCBP 2 (D6/JAB61)、CCR 1 (CKR1/HM145)、CCR 2 (mcp-1RB/RA)、CCR 3 (CKR3/CMKBR3)、CCR 4、CCR 5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR 6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR 7 (CKR7/EBI1)、CCRS (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR 9 (GPR-9-6)、CCRL 1 (VSHK1)、CCRL 2 (L-CCR)、XCR 1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR 1 (V28)、CXCR 4、GPR 2 (CCR10)、GPR 31、GPR 81 (FKSGSO)、CXCR 3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR 6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、ILSRA (IL8Ra)、ILSRB (IL8Rb)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSFS、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HIF1A、ILS、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2、およびVHLからなる群から選択される1つ以上のケモカイン、ケモカイン受容体、およびケモカイン関連タンパク質に結合することができる、実施形態1~24のいずれか1つの抗原結合分子。

10

20

29. 二重特異性抗原結合分子が、サイトカインの対に結合することができる、実施形態1~24のいずれか1つの抗原結合分子。

30. 二重特異性抗原結合分子が、TSLP、IL-1aおよびIL-1β、IL-12およびIL-18、TNFaおよびIL-23、TNFaおよびIL-13、TNFおよびIL-18、TNFおよびIL-12、TNFおよびIL-1ベータ、TNFおよびMIF、TNFおよびIL-6、TNFおよびIL-6受容体、TNFおよびIL-17、IL-17およびIL-20、IL-17およびIL-23、TNFおよびIL-15、TNFおよびVEGF、VEGFRおよびEGFR、PDGFRおよびVEGF、IL-13およびIL-9、IL-13およびIL-4、IL-13およびIL-5、IL-13およびIL-25、IL-13およびTARC、IL-13およびMDC、IL-13およびMIF、IL-13およびTGF-β、IL-13およびLHRアゴニスト、IL-13およびCL25、IL-13およびSPRR2a、IL-13およびSPRR2b、IL-13およびADAM 8、ならびにTNFaおよびPGE4、IL-13およびPED2、ならびにTNFおよびPEG2からなる群から選択されるサイトカインの対に結合することができる、実施形態29の抗原結合分子。

30

40

31. 二重特異性抗原結合分子が、単一特異性抗体または各エピトープに特異的な抗体フラグメントと比較して同様のまたはより高い親和性で各エピトープに結合することができる、実施形態1~30のいずれか1つの抗原結合分子。

32. 抗原結合分子が、アゴニスト機能を有する、実施形態1~31のいずれか1つの抗原結合分子。

33. 抗原結合分子が、遮断機能を有し、親抗体と比較して同様のまたはより低いIC50を有し、任意に親抗体が、IgGアイソタイプのヒト抗体である、実施形態1~31のいずれか1つの抗原結合分子。

34. 抗原結合分子が、単一のリガンドについて二重特異性であり、親抗体（複数可）

50

と比較してより高いレベルで1：1リガンド複合体を形成する、実施形態1～33のいずれか1つの抗原結合分子。

35. 第1のエピトープに特異的に結合する第1の抗原結合Fabドメインと、

第1のエピトープとは異なる第2のエピトープに特異的に結合する第2の抗原結合Fabドメインと、

第1の重鎖ポリペプチドおよび第2の重鎖ポリペプチドを含むFcドメインと、

第1の抗原結合Fabドメインの重鎖のN末端を第1の重鎖ポリペプチドのC末端に連結する第1のリンカーと、

第2の抗原結合Fabドメインの重鎖のN末端を第2の重鎖ポリペプチドのC末端に連結する第2のリンカーと、を含む、抗原結合分子。

10

36. 第1の重鎖ポリペプチドが、

第1のCHアミノ酸配列と、

第1のVHアミノ酸配列と、

第2のCHアミノ酸配列と、を含み、第1のVHアミノ酸配列が、第1のCHアミノ酸配列と第2のCHアミノ酸配列との間にある、実施形態35の抗原結合分子。

37. 第1のCHアミノ酸配列が、第1のVHアミノ酸配列のN末端に位置する第1のCH3アミノ酸配列を含む、実施形態36の抗原結合分子。

38. 第1のCH3が、H435R変異およびY436F変異を含む、実施形態36の抗原結合分子。

39. 第2の重鎖ポリペプチドが、

第3のCHアミノ酸配列と、

第2のVHアミノ酸配列と、

第4のCHアミノ酸配列と、を含み、第2のVHアミノ酸配列が、第3のCHアミノ酸配列と第4のCHアミノ酸配列との間にある、実施形態35～38のいずれか1つの抗原結合分子。

20

40. 第1のCHアミノ酸配列が、第1のVHアミノ酸配列のN末端に位置する第1のCH3アミノ酸配列を含む、実施形態39の抗原結合分子。

41. 第1のCH3が、H435R変異およびY436F変異を含む、実施形態40の抗原結合分子。

42. 第1のVHアミノ酸配列のN末端を第1のCH3アミノ酸配列のC末端に連結する第1のリンカーをさらに含む、実施形態40または実施形態41の抗原結合分子。

30

43. 第3のCHアミノ酸配列が、第2のVHアミノ酸配列のN末端に位置する第2のCH3アミノ酸配列を含む、実施形態35～42のいずれか1つの抗原結合分子。

44. 第2のVHアミノ酸配列のN末端を第2のCH3アミノ酸配列のC末端に連結する第2のリンカーをさらに含む、実施形態43の抗原結合分子。

45. 第2のCHアミノ酸配列が、第1のVHアミノ酸配列のC末端に位置する第1のCH1アミノ酸配列を含む、実施形態35～44のいずれか1つの抗原結合分子。

46. 第4のCHアミノ酸配列が、第2のVHアミノ酸配列のC末端に位置する第2のCH1アミノ酸配列を含む、実施形態35～45のいずれか1つの抗原結合分子。

47. 第1のCH3アミノ酸配列のN末端に位置する第1のCH2アミノ酸配列をさらに含む、実施形態35～46のいずれか1つの抗原結合分子。

40

48. 第2のCH3アミノ酸配列のN末端に位置する第2のCH2アミノ酸配列をさらに含む、実施形態35～47のいずれか1つの抗原結合分子。

49. 抗原結合分子が、ヒンジ領域ジスルフィド結合を含まない、実施形態35～48のいずれか1つの抗原結合分子。

50. 第1の軽鎖ポリペプチドをさらに含み、第1の軽鎖ポリペプチドが、第1のVLアミノ酸配列、および第1のCLアミノ酸配列を含む、実施形態35～49のいずれか1つの抗原結合分子。

51. 第1のCLを第1のCH1に連結するジスルフィド結合をさらに含む、実施形態50の抗原結合分子。

50

52. 第2の軽鎖ポリペプチドをさらに含み、第2の軽鎖ポリペプチドが、第2のVLアミノ酸配列、および第2のCLアミノ酸配列を含む、実施形態35～51のいずれか1つの抗原結合分子。

53. 第2のCLを第2のCH1に連結するジスルフィド結合をさらに含む、実施形態521の抗原結合分子。

54. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々ポリペプチドを含む、実施形態44～53のいずれか1つの抗原結合分子。

55. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、0～50アミノ酸の長さを有する、実施形態54の抗原結合分子。

56. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態54～55のいずれか1つの抗原結合分子。

57. 第1のリンカーおよび第2のリンカーが、各々ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列を含む、実施形態54～56のいずれか1つの抗原結合分子。

58. ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列が、2～6つのリピーティングGGGGS（配列番号3）アミノ酸配列を含む、実施形態57の抗原結合分子。

59. ポリグリシンおよびセリンアミノ酸配列が、(G4S)₂（配列番号18）、(G4S)₃（配列番号4）、または(G4S)₄（配列番号19）を含む、実施形態58の抗原結合分子。

60. 第1の軽鎖ポリペプチドおよび第2の軽鎖ポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態52～59のいずれか1つの抗原結合分子。

61. 第1の重鎖ポリペプチド、第2の重鎖ポリペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、実施形態35～60のいずれか1つの抗原結合分子。

62. 第1の重鎖ポリペプチド、第2の重鎖ポリペプチドが、非同一のアミノ酸配列を有する、実施形態35～60のいずれか1つの抗原結合分子。

63. 抗原結合分子が、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRLI、ADORA2A、アグリカン、AGR2、AICDA、AIF1、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、AZGP1（亜鉛-a-糖タンパク質）、ART-4、B7、B7.1、B7.2、BAD、BAFF、BAGI、BAIi、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLRL（MDRLS）、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B（GDF10）、BMP4、BMP6、BMPS、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、BPAG1（プレクチン）、BRCA1、Ba-733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-I、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CDS、CD8、CDI-IA、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、C19orf10（IL27w）、C3、C4A、CS、CSR1、CANT1、CASPI、CASP4、CAV1、CCBP2（D6/JAB61）、CCLI（I-309）、CCLII（エオタキシン）、CCL13（MCP-4）、CCLIS（MIP-1d）、CCL16（HCC-4）、CCL17（TARC）、CCLIS（PARC）、CCL19（MIP-3b）、CCL2（MCP-1）、MCAF、CCL20（MIP-3a）、CCL21（MIP-2）、SLC、エクソダス-2、CCL22（MDC/STC-1）、CCL23（MPIF-1）、CCL24（MPIF-2/エオタキシン-2）、CCL2S（TECK）、CCL26（エオタキシン-3）、CCL27（CTACK/ILC）、CCL2S、CCL3（MIP1a）、CCL4（MIP-1b）、CCLS（RANTES）、CCL7（M

10

20

30

40

50

CP-3)、CCLS (mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE
 1、CCNE2、CCR1 (CKR1/HM14S)、CCR2 (mcp-1RB/RA
)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCRS (CMKBRSI Ch
 emR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、C
 CR7 (CKR7/EB1)、CCRS (CMKBR5/TER1/CKR-LI)、C
 CR9 (GPR-9-6)、CCRLI (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、C
 D164、CDLC、CD200、CD-22、CD24、CD2S、CD3S、CD3
 E、CD3G、CD3Z、CD4、CD44、CD4SRB、CD47、CD4S、CD
 S2、CD69、CD72、CD79A、CD79B、CDSO、CDS1、CDS3、
 CDS6、CD137、CD13S、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B
 7-H4、CD137L、OX40L、CDH1 (E-カドヘリン)、CDH10、CD
 H12、CDH13、CDHLS、CDH19、CDH20、CDHS、CDH7、CD
 HS、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDKS、CDK6、CDK7、CD
 K9、CDKN1A (p21 Wap1/Cip1)、CDKN1B (p27Kip1)
 、CDKN1C、CDKN2A (p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、C
 DKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ、CHST10、C
 KLFSF2、KLFSF3、KLFSF4、KLFSFS、KLFSF6、C
 KLFSF7、KLFSFS、CLDN3、CLDN7 (クローディン-7)、CLN
 3、CLU (クラスチリン)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CNR1、C
 OLISA1、COLIA1、COL4A3、COL6A1、CR2、CRP、CSF1
 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、CTLA-4、C
 TNNB1 (b-カテニン)、CTSB (カテプシンB)、CX3CLI (SCYD1)
 、CX3CR1 (V2S)、CXCLI (GRO1)、CXCLIO (IP-10)、C
 XCL11 (I-TAC/IP-9)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、C
 XCL2 (GRO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCLS (ENA-7S/LIX)
 、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCR3 (GPR9/CKR-
 L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYBS、CYC1
 、CYSLTR1、HIF-1-a、結腸特異的抗原-p (CSAp)、CEA (CEA
 CAM5)、CEACAM6、c-met、DAB2IP、DES、DKFZp4S1J
 011S、DNCLI、DPP4、DAM、EGFR、EGFRvLLI、EGP-1、
 EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、E2F1、ECGF1、EDG1、EFNA
 1、EFNA3、EFNB2、EGF、EGFR、ELAC2、ENG、ENO1、EN
 O2、ENO3、EPHB4、EPO、EREG、ERKS、ESR1、ESR2、F3
 (TF)、FADD、FasL、FASN、FCER1A、FCER2、FCGR3A、
 FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、
 FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF1S、FGF19、FGF2
 (bFGF)、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3 (int-
 2)、FGF4 (HST)、FGFS、FGF7 (KGF)、FGFS、FGF9、FG
 FR3、FIGF (VEGFD)、FILI (EPSILON)、FILI (ZETA)
 、FLJ12SS4、FLJ2SS30、FLRT1 (フィブロネクチン)、FOS、F
 OSLI (FRA-1)、FY (DARC)、Flt-I、Flt-3、葉酸塩受容体、
 G250抗原、GAGE、GROB、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAG
 EC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GDFS、GFil、GGTL、GM
 -CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44
 、GPRS1 (FKSGSO)、GRCC10 (C10)、GRP、GSN (ゲルソリン)
)、GSTP1、HAVCR2、HDAC4、HDACS、HDAC7A、HDAC9、
 HGF、HIP1ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、H
 M74、HMOX1、HUMCYT2A、HLA-DR、HMI 24、ヒト絨毛性ゴナ
 ドトロピン (HCG) およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸
 素誘導因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2または1a、IGF-IR、

10

20

30

40

50

【数 6】

IFN- γ

IFN- α 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、IL-1、IL-10、IL-10RA、IL-10RB、IL-11、IL-11RA、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL-13RA1、IL-13RA2、IL-14、IL-1S、IL-1SRA、IL-16、IL-17、IL-17B、IL-17C、IL-17R、IL-18、IL-18BP、IL-18R1、IL-18RAP、IL-19、IL-1A、IL-1B、IL-1F10、IL-1FS、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1HY1、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAP、IL-1RAPL1、IL-1RAPL2、IL-1RL1、IL-1RL2、IL-1RN、IL-2、IL-20、IL-20RA、IL-21R、IL-22、IL-22R、IL-22RA2、IL-23、IL-24、IL-2S、IL-26、IL-27、IL-28A、IL-28B、IL-29、IL-2RA、IL-2RB、IL-2RG、IL-3、IL-30、IL-3RA、IL-4、IL-4R、IL-S、IL-5RA、IL-6、IL-6R、IL-6ST (糖タンパク質130)、IL-7、IL-7R、IL-S、IL-SRA、IL-SRB、IL-9、IL-9R、IL-K、INH A、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 (a6インテグリン)、ITGAV、ITGB3、ITGB4 (b4インテグリン) インスリン様成長因子-I (IGF-1)、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNAS、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNW1、JAG1、JAK1、JAK3、JUN、K6HF、Kai1、KDR、KITLG、KLF S (GC Box BP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK1S、KLK3、KLK4、KLKS、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19 (ケラチン19)、KRT2A、KRTHB6 (毛髪特異的タイプIIケラチン)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、LAMAS、LEP (レプチン)、Lingo-p7S、Lingo-Troy、LPS、LTA (TNF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACM ARCKS、MAGまたはOmgp、MAP2K7 (c-Jun)、MDK、MIB1、ミッドカイン、MIF、MIP-2、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3 (メタロチオネクチン-II)、MTSS1、MUC1 (ムチン)、MYC、MYD88、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ES0-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、NCK2、ニューロカン、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (Noga)、NgRp7S、NgR-Troy、NME1 (NM23A)、NOXS、NPPB、NROB1、NROB2、NR1D1、NR1D2、NRIH2、NRIH3、NRIH4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NRSA1、NRSA2、NR6A1、NRP1、NRP2、NTSE、NTN4、ODZ1、OPRD1、PCSK9、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCNA、PD-1、PD-L1、アルファ4ベータ7、OX40、GITR、TIM-3、Lag-3、B7-H3、B7-H4、GDFS、CGRP、Lingo-I、第IX

10

20

30

40

50

a 因子、第 X 因子、ICOS、GARP、BTLA、CD160、RORI、2B4、KIR、CD27、OX40、A2aR、PDGFA、PDGFB、PECAM1、PF4 (CXCL4)、PGF、PGR、ホスファカン、PIAS2、PIK3CG、PLAU (uPA)、PLG、PLXDC1、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、膵臓がんムチン、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺性酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、10PIGF、ILGF、ILGF-IR、IL-6、RS5、RANTES、RAC2 (p21Rac2)、RARB、RGS1、RGS13、RGS3、RNFL10 (ZNF144)、ROB02、S100A2、SCGB1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A1 (マンマグロビン2)、SCGB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SDF2、SERPINA1、SERPINA3、SERPINBS (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)、SERPINF1、SHBG、SLA2、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPP1、SPRR1B (Sprl)、ST6GAL1、STAB1、STATE、STEAP、STEAP2、TIOI、SAGE、5100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネニン、TRAIL 受容体、TNF- α 、Tn-抗原、Thomson Friedenreich 抗原、腫瘍壊死抗原、TB4R2、TBX21、TCP10、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1l1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、THBS2、THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIMP3、組織因子、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLRS、TLR6、TLR7、TLRS、TLR9、TNF、TNF- α 、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSFS、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSFS、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF1S (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSFS (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSFS (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-LBBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TPS3、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAPS、TRAF6、TREM1、TREM2、TRPC6、TSLP、TWEAK、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-IA 抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、CS、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、CD19/CD3、BCMA/CD3、EGFR、HER3、IL17RA/IL7R、IL-6/IL-23、IL1/IL-8、IL-6、IL-6R/IL-21、IL-21R、ANG2/VEGF、VEGF/PDGFR- β 、血管内皮成長因子 (VEGF) アクセプター2/CD3、PSMA/CD3、EPCAM/CD3、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、VEGFB、VEGFC、パーシカン、VHL CS、VLA-4、c-FMS/CSFIR、RET、HER3、HER4、IGFR、PDGFR、c-KIT、BCR、インテグリン、MMP VEGF、EGF、PIGF、PDGF、HGF、アンジオポエチン、ERBB-3/C-MET、ERBB-2/C-MET、EGF 受容体1/CD3、EGFR/HER3、PSCA/CD3、C-MET/CD3、ENDOSIALIN/CD3、EPCAM/CD3、IGF-1R/CD3、FAPALPHA/CD3、EGFR/IGF-IR、IL 25 17A/F、EGF 受容体1/CD3、およびCD19/CD16、KHI、Tn-抗原、TF-抗原、CD44、糖脂質、スフィンゴ糖脂質、例えば、30 Gg3、Gb3、GD3、GD2、Gb5、Gm1、Gm2、シアリルテトラオシルセラミド、XCL1 (リンホタクチン)、XCL2 (SCM-1b)、XCR1

10

20

30

40

50

(GPRS/CCXCR1)、YY1、ならびにZFPM2からなる群から選択される1つ以上の抗原に結合することができる、実施形態35～61のいずれか1つの抗原結合分子。

64. 抗原結合分子が、CD137およびCD20、CD137およびEGFR、CD137およびHer-2、CD137およびPD-1、CD137およびPDL-1、VEGFおよびPD-L1、Lag-3およびTIM-3、OX40およびPD-1、TIM-3およびPD-1、TIM-3およびPDL-1、EGFRおよびDLL-4、CD138およびCD20、CD138およびCD40、CD138およびCD20、CD20およびCD3、CD3およびCD33、CD3およびCD133、CD47およびCD20、CD38およびCD138、CD38およびCD20、CD20およびCD22、CD38およびCD40、CD40およびCD20、CD-8およびIL-6、CSPGsおよびRGM A、CTLA-4およびBTN02、IGF1およびIGF2、IGF1/2およびErbB2、IGF-1RおよびEGFR、EGFRおよびCD13、IGF-1RおよびErbB3、EGFR-2およびIGFR、VEGFR-2およびMet、VEGF-Aおよびアンジオポエチン-2 (Ang-2)、IL-12およびTWEAK、IL-13およびIL-1ベータ、PDGFRおよびVEGF、EPCAMおよびCD3、Her2およびCD3、CD19およびCD3、EGFRおよびHer3、CD16aおよびCD30、CD30およびPSMA、EGFRおよびCD3、CEAおよびCD3、TROP-2およびHSG、TROP-2およびCD3、MAGおよびRGM A、NgRおよびRGM A、NogoAおよびRGM A、OMGpおよびRGM A、PDL-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、RGMAおよびRGM B、Te38およびTNFa、TNFaおよびBlys、TNFaおよびCD-22、TNFaおよびCTLA-4ドメイン、TNFaおよびGP130、TNFaおよびIL-12p40、ならびにTNFaおよびRANKリガンドからなる群から選択される標的抗原の対に結合することができる、実施形態35～61のいずれか1つの抗原結合分子。

65. 抗原結合分子が、BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (aFGF)、FGF2 (bFGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1 (EPSILON)、FIL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、FGFR1、FGFR2、FGFR3、EGFR、RORI、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L、A2aR、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70、CD40、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA (TNF-b)、LTB、TNF (TNF-a)、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSF5 (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSF8 (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-1BBリガンド)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、FIGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、ILIR1、ILIR2、ILIRLI、ILIRL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、

10

20

30

40

50

IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、ILIRAP、ILIRAPLI、ILIRAPL2、ILIRN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP（レプチン）、PTN、およびTHPOからなる群から選択される1つまたは2つのサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、およびサイトカイン受容体に結合することができる、実施形態35～61のいずれか1つの抗原結合分子。

66．抗原結合分子が、CCL1（I-309）、CCL2（MCP-1/MCAF）、CCL3（MIP1a）、CCL4（MIP-1b）、CCL5（RANTES）、CCL7（MCP-3）、CCL8（mcp-2）、CCL11（エオタキシン）、CCL13（MCP-4）、CCL15（MIP-1d）、CCL16（HCC-4）、CCL17（TARC）、CCL18（PARC）、CCL19（MIP-3b）、CCL20（MIP-3a）、CCL21（SLC/エクソダス-2）、CCL22（MDC/STC-1）、CCL23（MPIF-1）、CCL24（MPIF-2/エオタキシン-2）、CCL25（TECK）、CCL26（エオタキシン-3）、CCL27（CTACK/ILC）、CCL28、CXCL1（GRO1）、CXCL2（GRO2）、CXCL3（GRO3）、CXCL5（ENA-78）、CXCL6（GCP-2）、CXCL9（MIG）、CXCL10（IP10）、CXCL11（I-TAC）、CXCL12（SDF1）、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4（CXCL4）、PPBP（CXCL7）、CX3CL1（SCYD1）、SCYE1、XCL1（リンホタクチン）、XCL2（SCM-1b）、BLR1（MDR15）、CCBP2（D6/JAB61）、CCR1（CKR1/HM145）、CCR2（mcp-1RB/RA）、CCR3（CKR3/CMKBR3）、CCR4、CCR5（CMKBR5/ChemR13）、CCR6（CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6）、CCR7（CKR7/EBI1）、CCRS（CMKBR8/TER1/CKR-L1）、CCR9（GPR-9-6）、CCRL1（VSHK1）、CCRL2（L-CCR）、XCR1（GPR5/CCXCR1）、CMKLR1、CMKOR1（RDC1）、CX3CR1（V28）、CXCR4、GPR2（CCR10）、GPR31、GPR81（FKSGSO）、CXCR3（GPR9/CKR-L2）、CXCR6（TYMSTR/STRL33/Bonzo）、HM74、ILSRA（IL8Ra）、ILSRB（IL8Rb）、LTB4R（GPR16）、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSFS、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10（C10）、EPO、FY（DARC）、GDF5、HIF1A、ILS、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2、およびVHLからなる群から選択される1つ以上のケモカイン、ケモカイン受容体、およびケモカイン関連タンパク質に結合することができる、実施形態35～61のいずれか1つの抗原結合分子。

67．抗原結合分子が、サイトカインの対に結合することができる、実施形態35～61のいずれか1つの抗原結合分子。

68．抗原結合分子が、TSLP、IL-1aおよびIL-1β、IL-12およびIL-18、TNFaおよびIL-23、TNFaおよびIL-13、TNFおよびIL-18、TNFおよびIL-12、TNFおよびIL-1ベータ、TNFおよびMIF、TNFおよびIL-6、TNFおよびIL-6受容体、TNFおよびIL-17、IL-17およびIL-20、IL-17およびIL-23、TNFおよびIL-15、TNFおよびVEGF、VEGFRおよびEGFR、PDGFRおよびVEGF、IL-13およびIL-9、IL-13およびIL-4、IL-13およびIL-5、IL-13およびIL-25、IL-13およびTARC、IL-13およびMDC、IL-13およびMIF、IL-13およびTGF-β、IL-13およびLHRアゴニスト、IL-13およびCL25、IL-13およびSPRR2a、IL-13およびSPRR2b、IL-

10

20

30

40

50

13およびADAM 8、ならびにTNF α およびPGE4、IL-13およびPED2、ならびにTNFおよびPEG2からなる群から選択されるサイトカインの対に結合することができる、実施形態67の抗原結合分子。

69. 抗原結合分子が、単一特異性抗体または各エピトープに特異的な抗体フラグメントと比較して同様のまたはより高い親和性で各エピトープに結合することができる、実施形態35～68のいずれか1つの抗原結合分子。

70. 抗原結合分子が、アゴニスト機能を有する、実施形態35～69のいずれか1つの抗原結合分子。

71. 抗原結合分子が、遮断機能を有し、親抗体と比較して同様のまたはより低いIC50を有し、任意に親抗体が、IgGアイソタイプのヒト抗体である、実施形態35～70のいずれか1つの抗原結合分子。

10

72. 抗原結合分子が、単一のリガンドについて二重特異性であり、親抗体（複数可）と比較してより高いレベルで1:1リガンド複合体を形成する、実施形態35～71のいずれか1つの抗原結合分子。

73. 抗原結合分子が、免疫アドヘシン（immunoadhesin）分子、造影剤、治療剤、および細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされる、実施形態35～72のいずれか1つの抗原結合分子。

74. 実施形態1～73のいずれか1つの抗原結合、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

75. 実施形態1～73のいずれか1つの抗原結合分子をコードする、核酸分子。

20

76. 核酸分子が、発現制御配列に作動可能に連結される、実施形態74の核酸分子。

77. 実施形態75または76の核酸分子を含む、発現ベクター。

78. 実施形態75もしくは76の核酸分子または実施形態77のベクターを含む、宿主細胞。

79. 細胞が、真核細胞である、実施形態78の宿主細胞。

80. 細胞が、動物細胞である、実施形態78または79の宿主細胞。

81. 細胞が、哺乳動物細胞、任意にCHO細胞である、実施形態78～79のいずれか1つの宿主細胞。

82. 対象に、有効量の、実施形態1～73のうちのいずれか1つの抗原結合分子を投与することを含む、実施形態63に列挙される抗原のうちのいずれか1つ以上に関連した状態を有する対象を治療する方法。

30

83. 対象に、有効量の、分子経路を阻害する実施形態1～73のいずれか1つの抗原結合分子を投与することを含む、対象における分子経路を阻害する方法。

84. 対象に、有効量の、分子経路を活性化する実施形態1～73のいずれか1つの抗原結合分子を投与することを含む、対象における分子経路を活性化する方法。

85. 実施形態63に列挙される抗原のうちのいずれか1つ以上に関連した状態の治療のための医薬品の製造における、実施形態1～73のいずれか1つの抗原結合分子の、使用。

【0296】

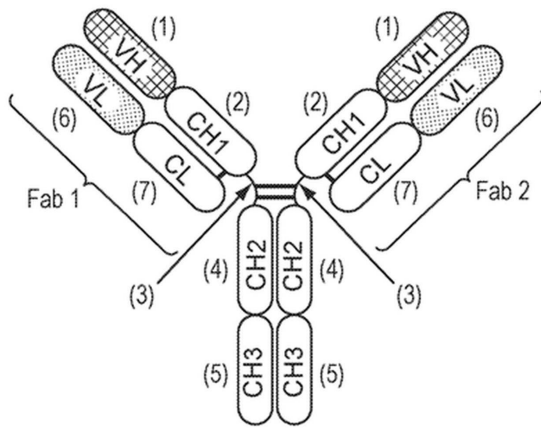
9. 参考文献の引用

40

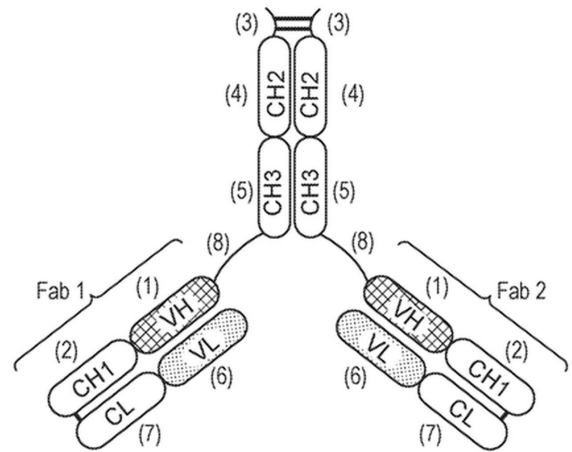
本出願で引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、および他の文書は、各個々の刊行物、特許、特許出願、または他の文書がすべての目的のために参照によって組み込まれることが個別に示された場合と同程度に、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。本明細書および本開示に組み込まれる参考文献のうちの1つ以上の教示間に矛盾がある場合、本明細書の教示が意図される。

【図面】

【図 1 A】

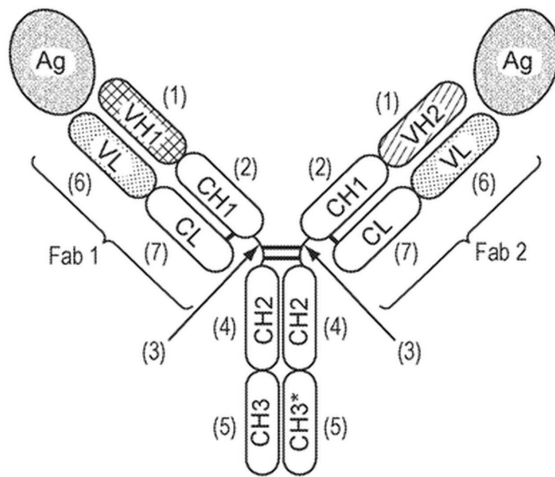


【図 1 B】

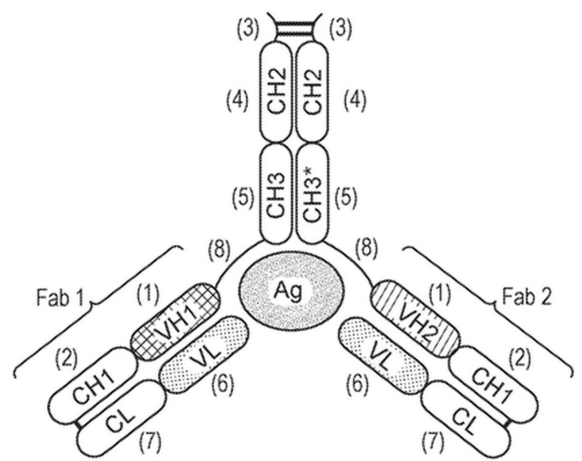


10

【図 2 A】



【図 2 B】



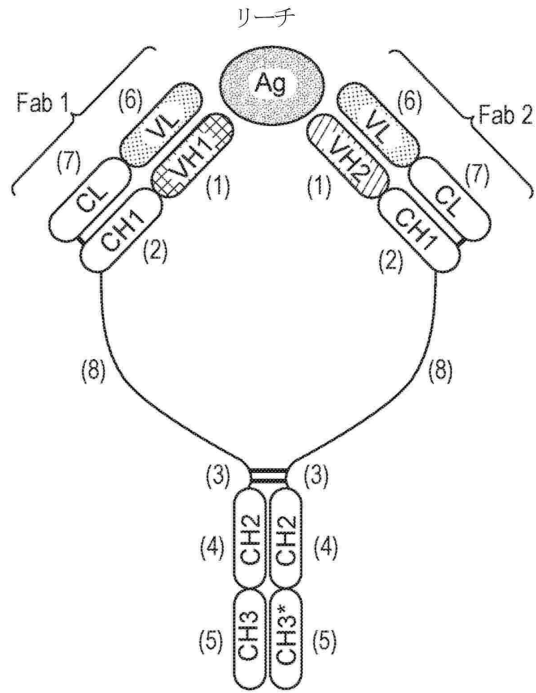
20

30

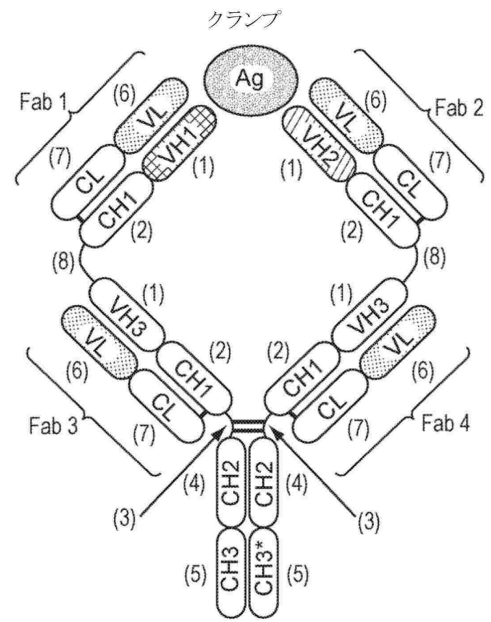
40

50

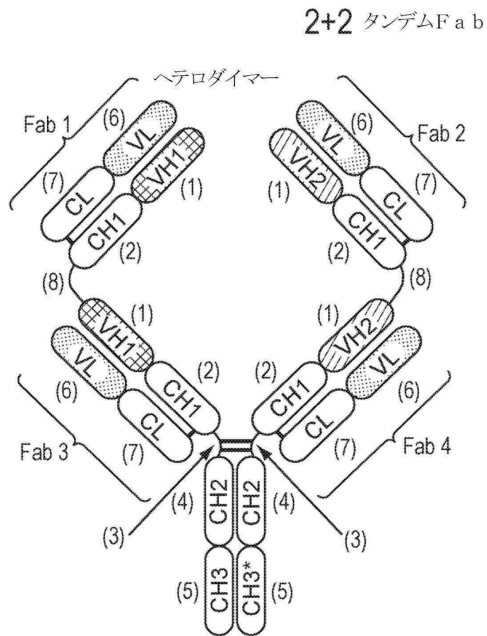
【図 3 A】



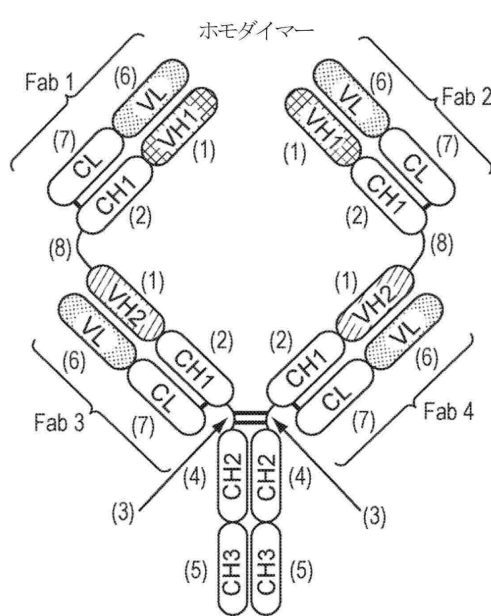
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 D】



10

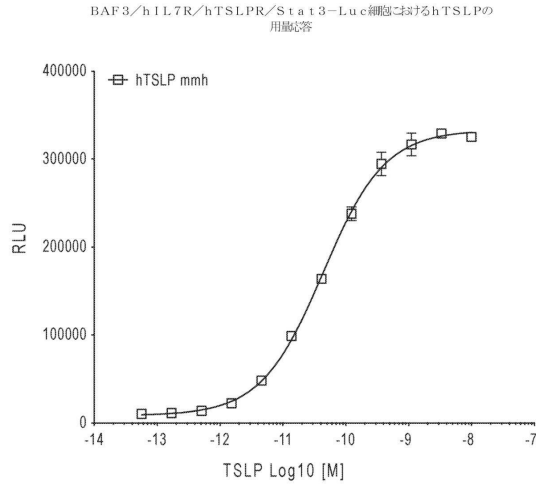
20

30

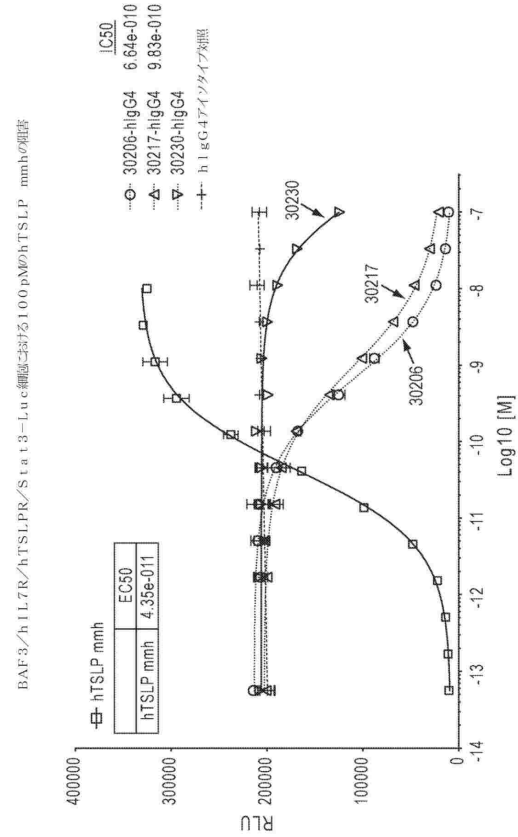
40

50

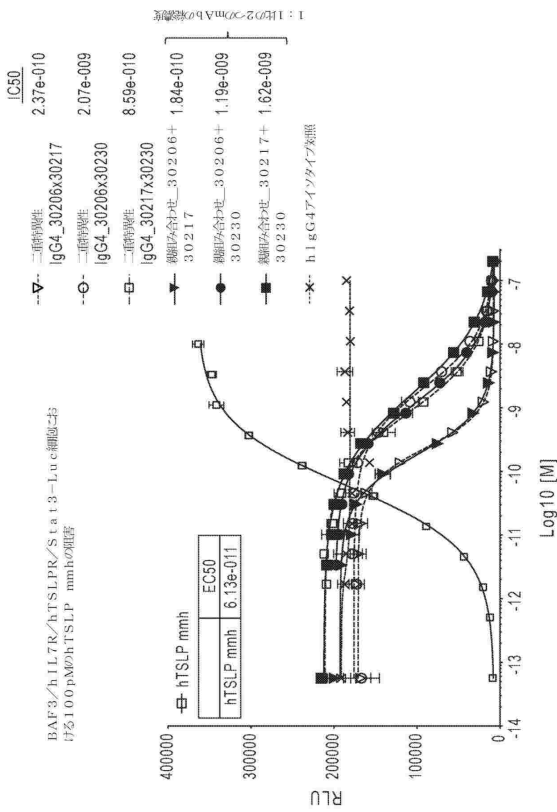
【図 4 A】



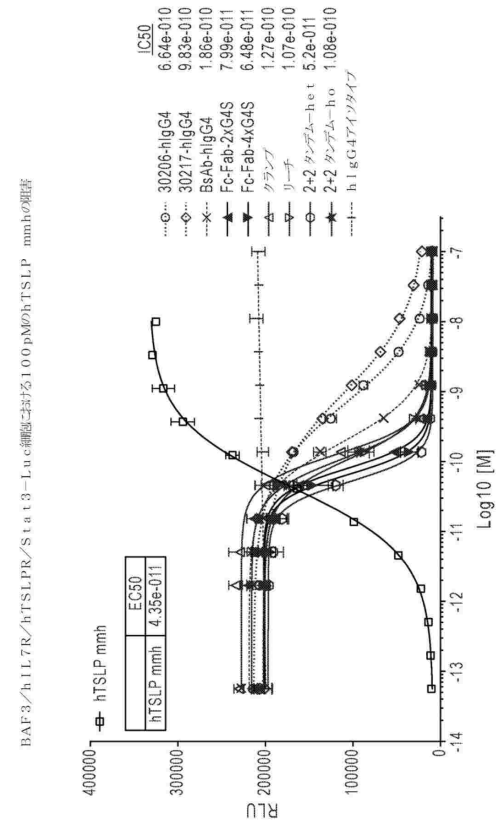
【図 4 B】



【図 5】



【図 6 A】



10

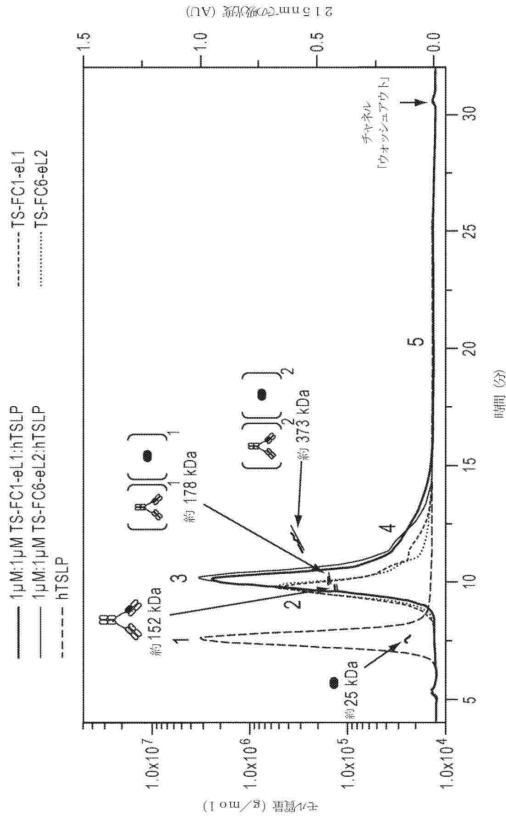
20

30

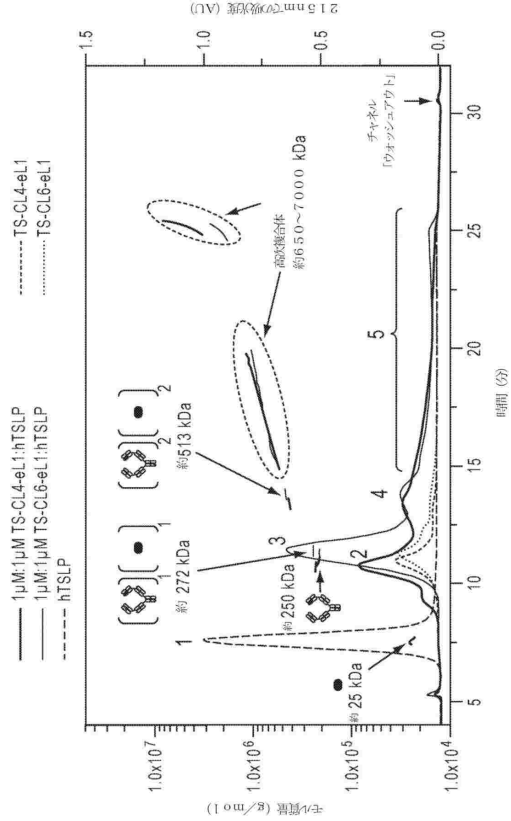
40

50

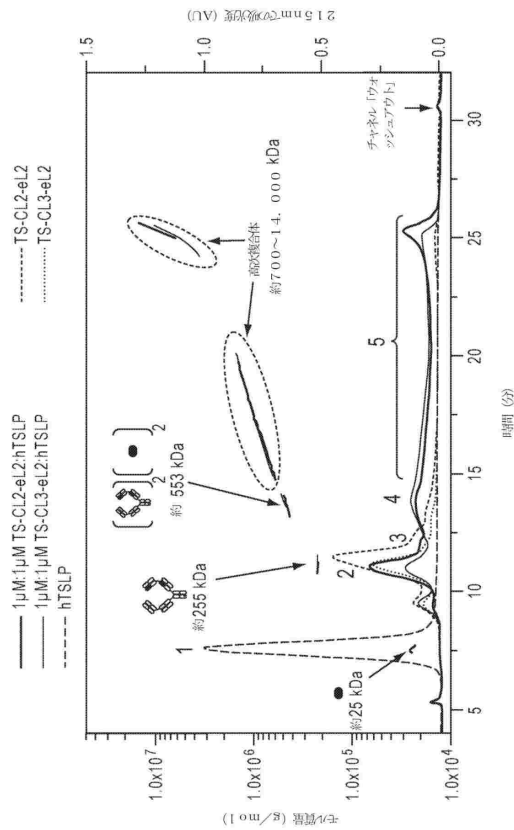
【図 9】



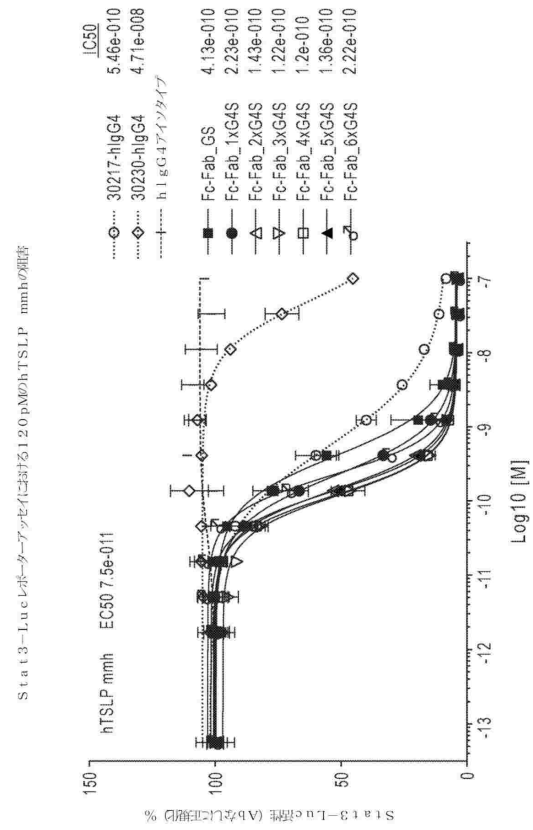
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

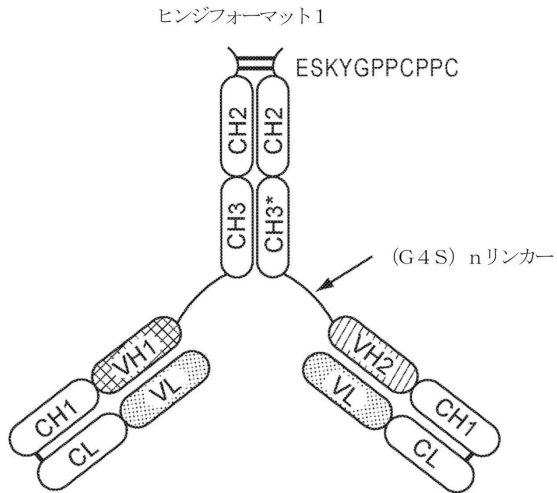
20

30

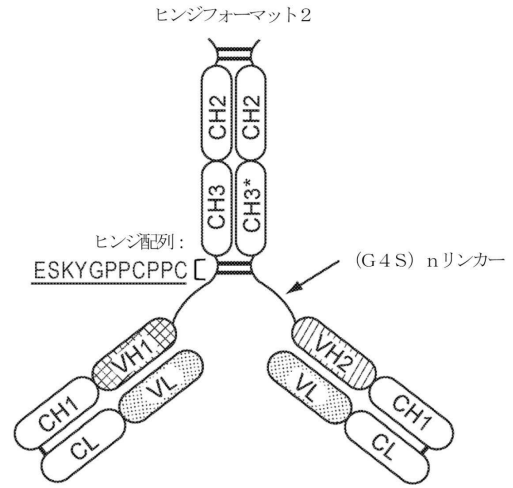
40

50

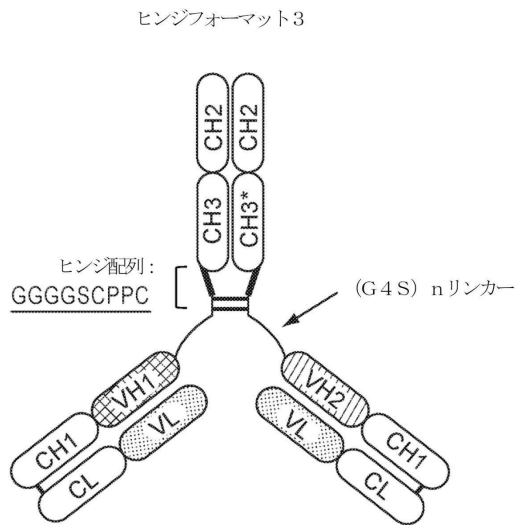
【図 1 3 A】



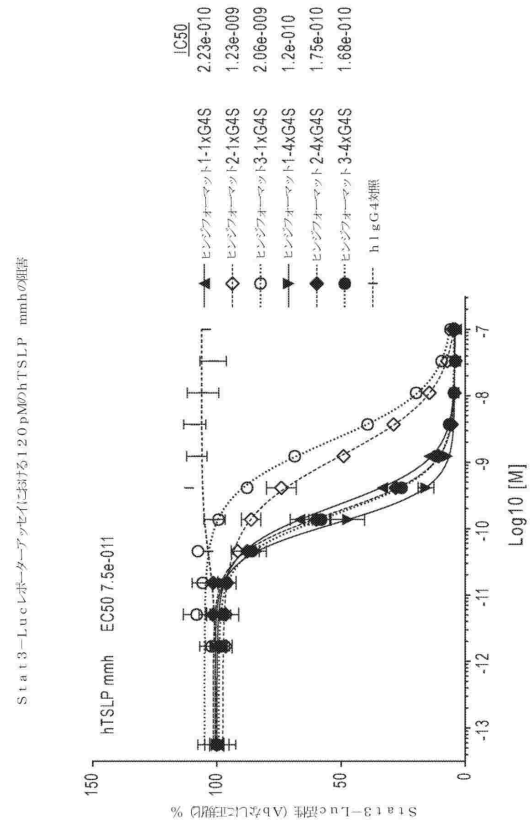
【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



10

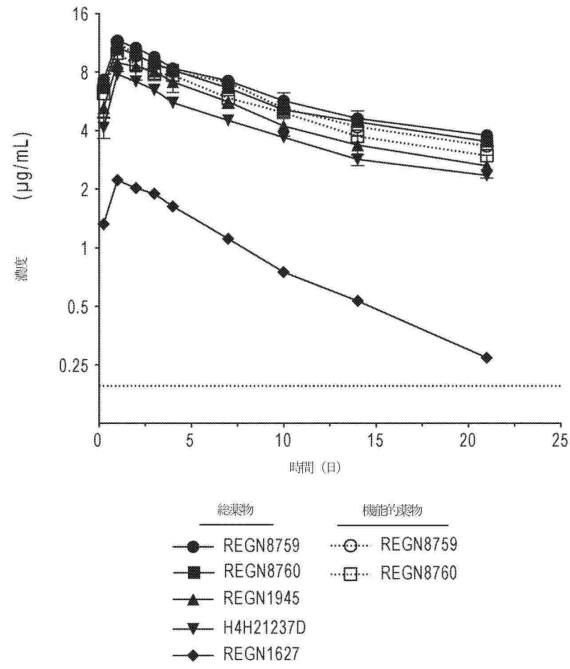
20

30

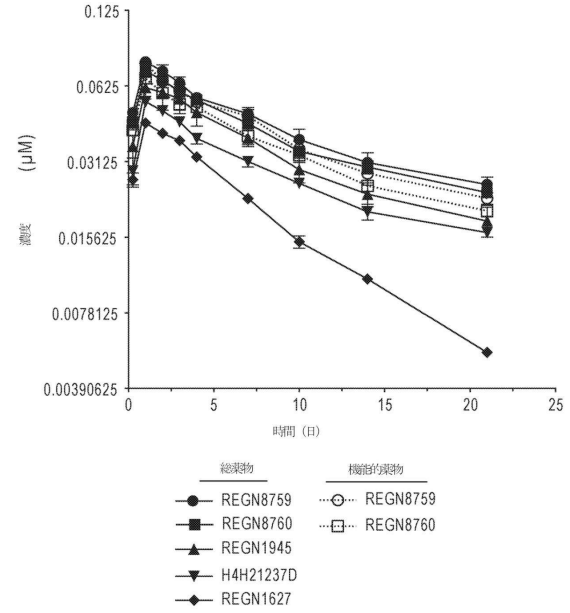
40

50

【図 14】

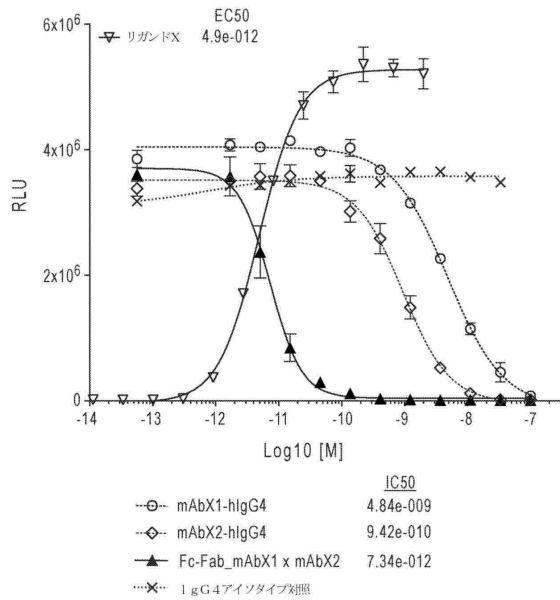


【図 15】



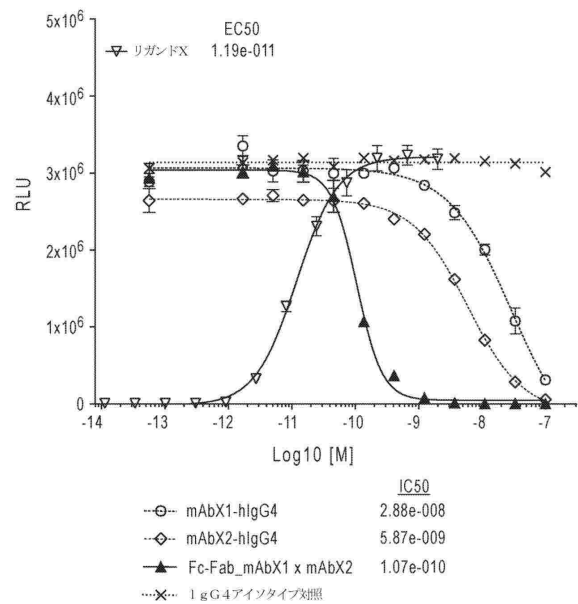
【図 16 A】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける10 pMのリガンドXの阻害



【図 16 B】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける100 pMのリガンドXの阻害



10

20

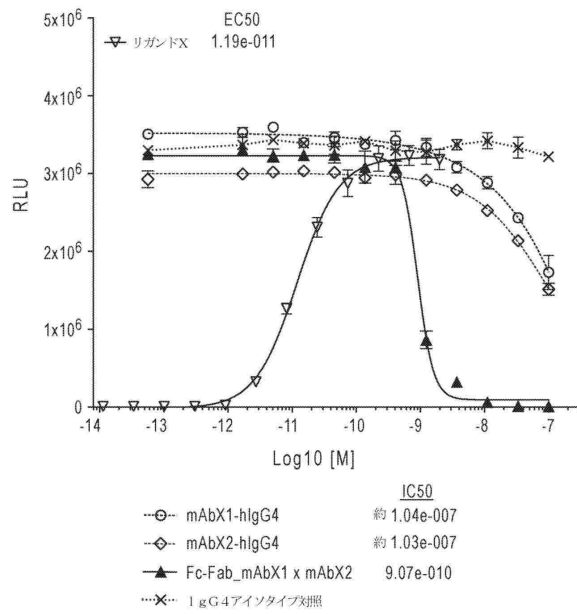
30

40

50

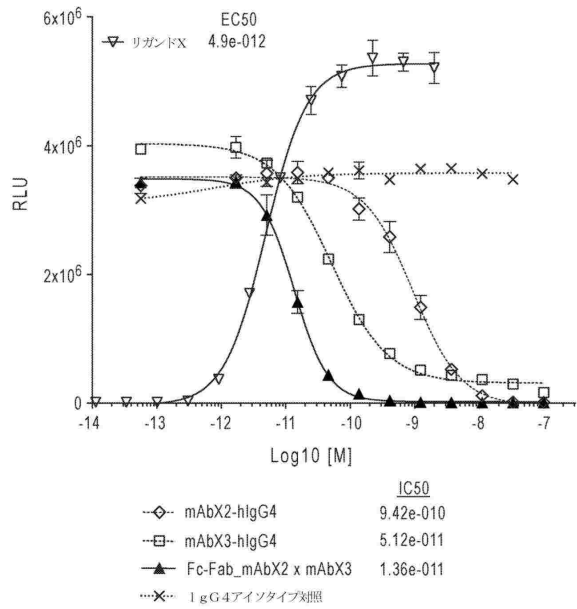
【図 16 C】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける1 nMのリガンドXの阻害



【図 17 A】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける10 pMのリガンドXの阻害

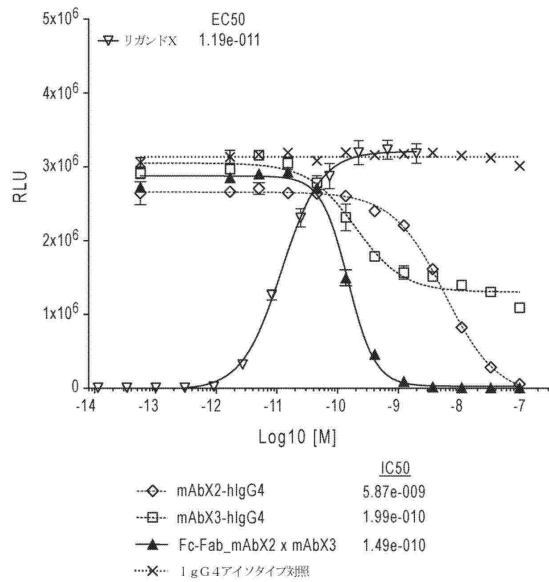


10

20

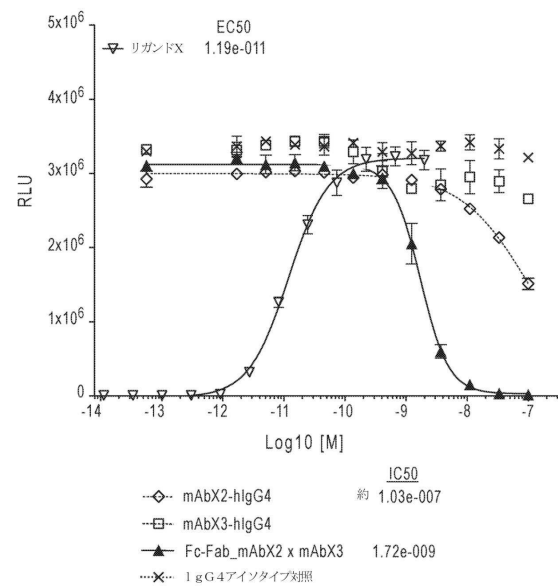
【図 17 B】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける100 pMのリガンドXの阻害



【図 17 C】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける1 nMのリガンドXの阻害



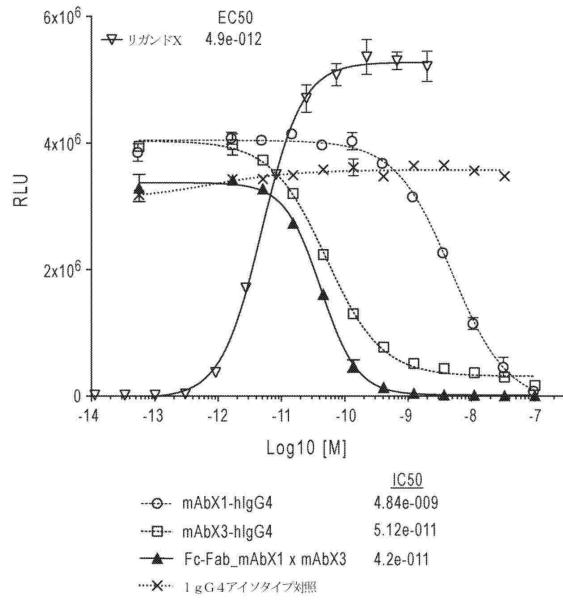
30

40

50

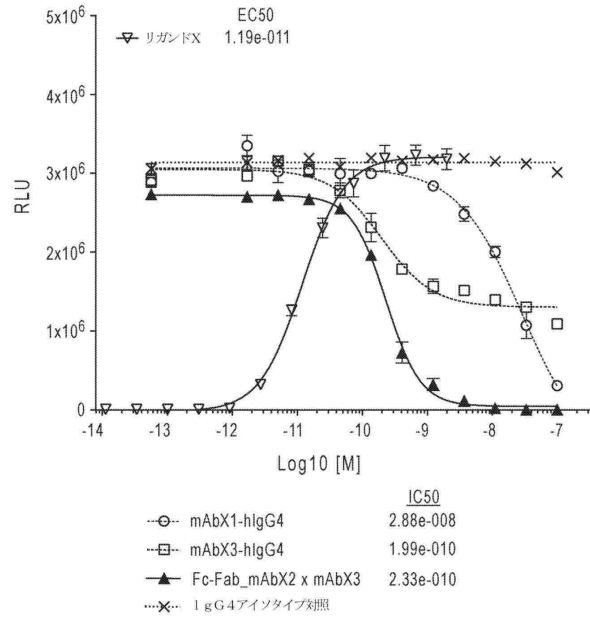
【図 18 A】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける10 pMのリガンドXの阻害



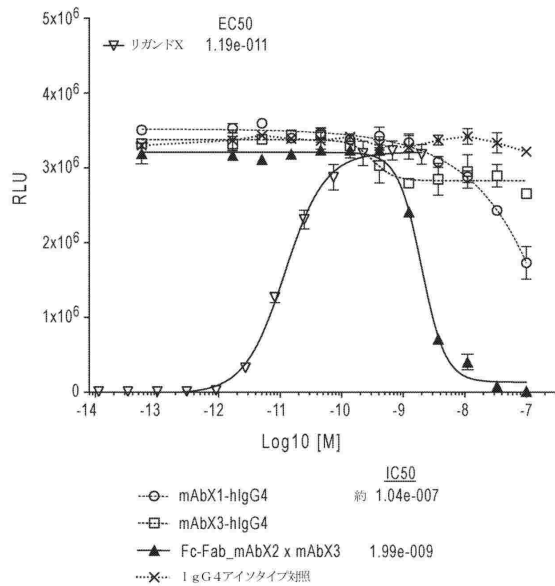
【図 18 B】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける100 pMのリガンドXの阻害

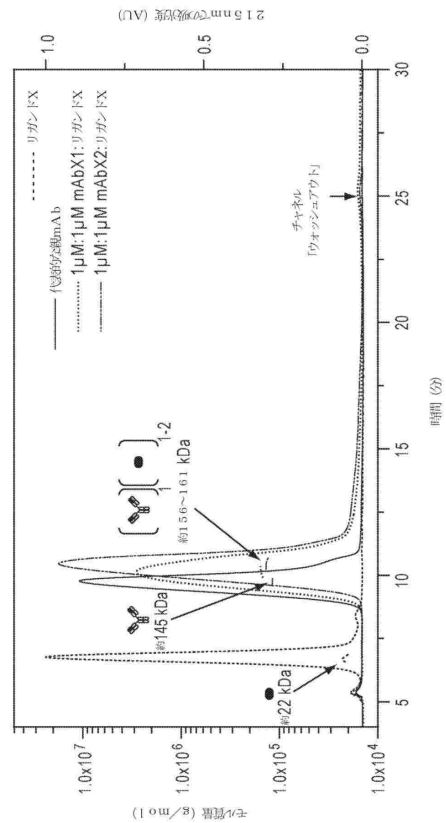


【図 18 C】

受容体Xシグナル伝達アッセイにおける1 nMのリガンドXの阻害



【図 19 A】



10

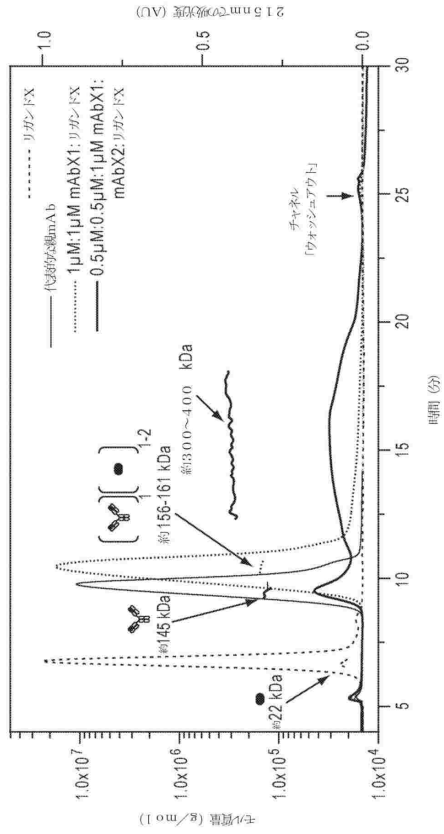
20

30

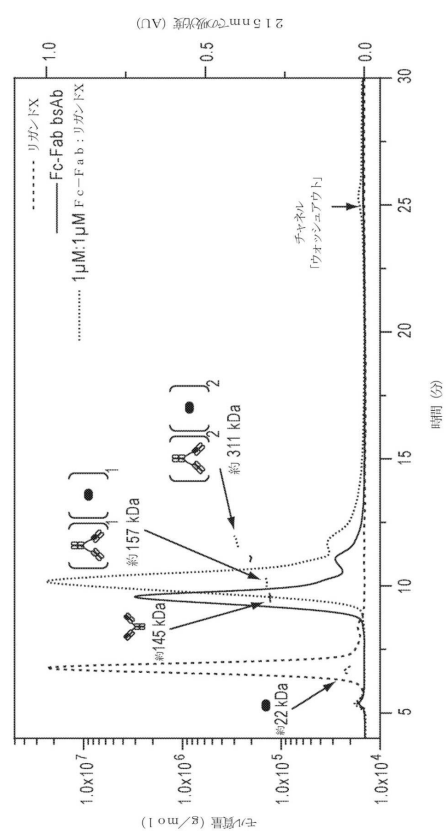
40

50

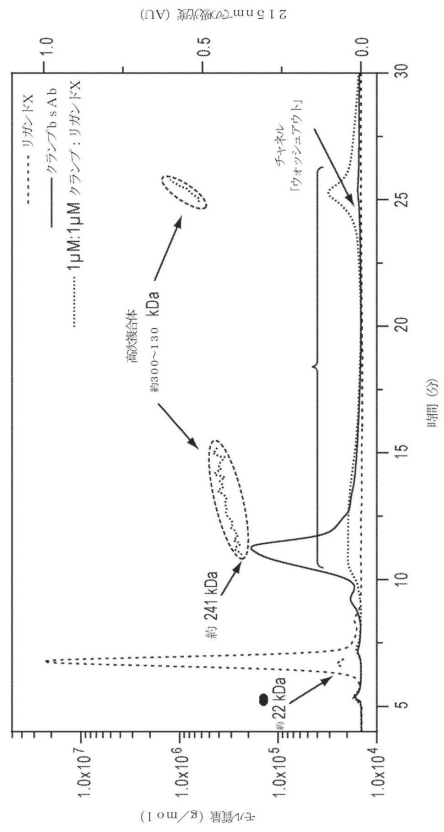
【図 19 B】



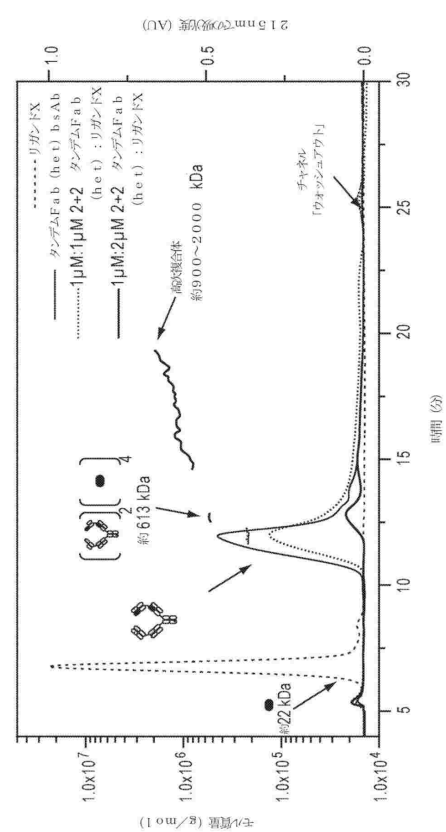
【図 19 C】



【図 19 D】



【図 19 E】



10

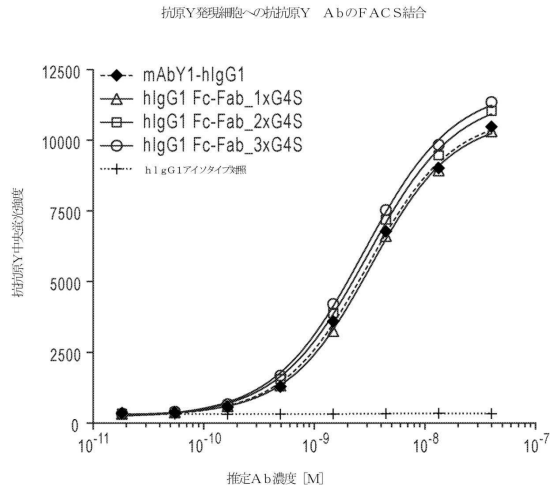
20

30

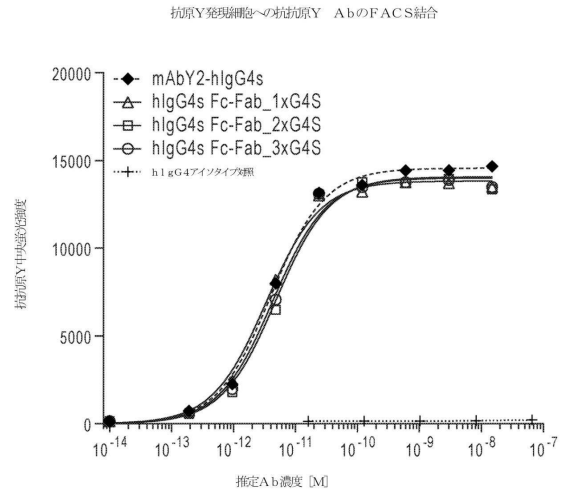
40

50

【図 20 A】

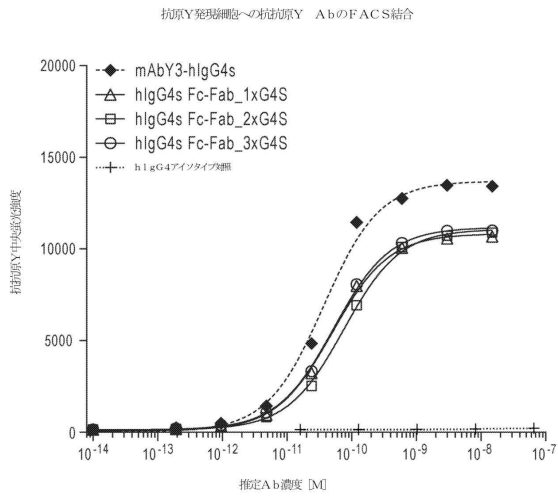


【図 20 B】

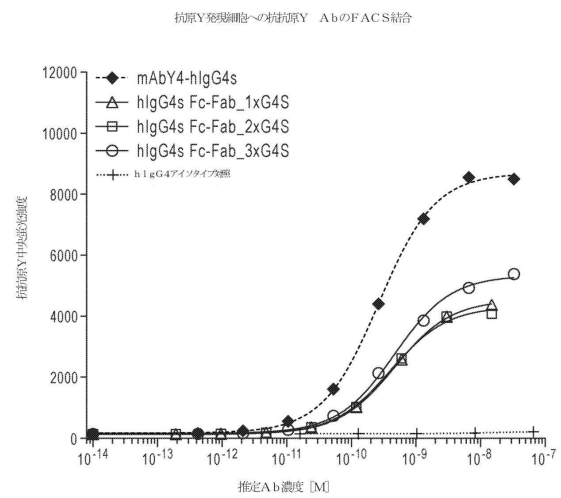


10

【図 20 C】



【図 20 D】



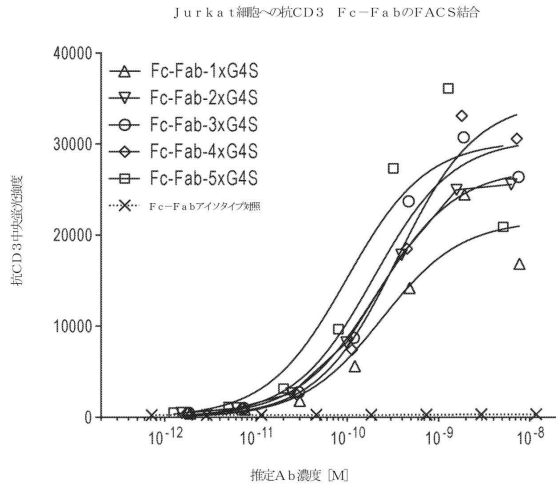
20

30

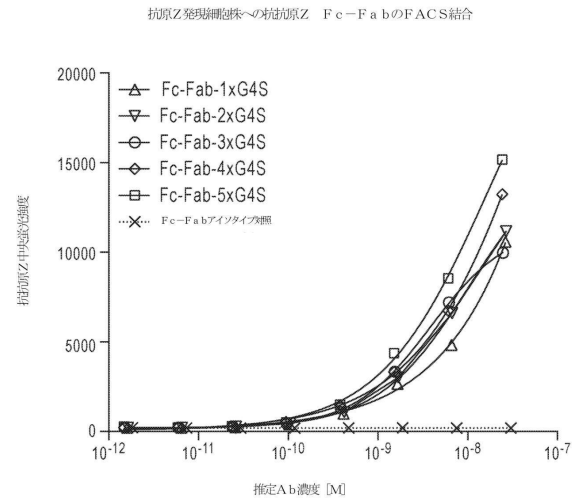
40

50

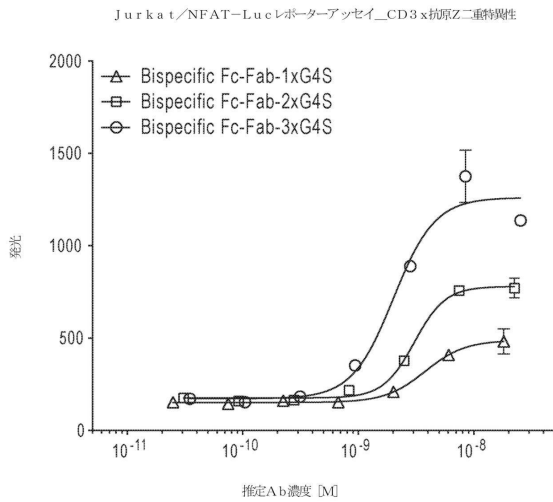
【図 2 1 A】



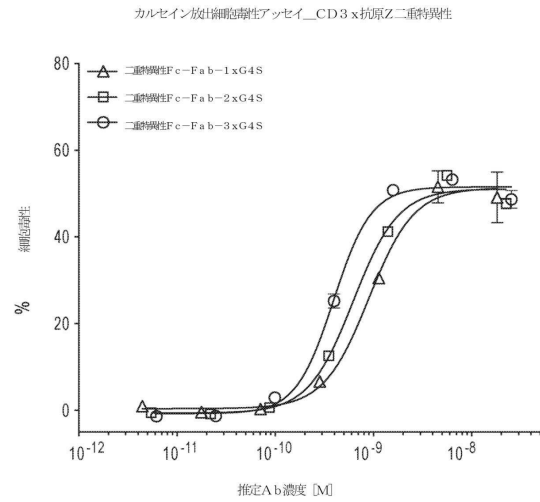
【図 2 1 B】



【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



【配列表】

0007682853000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/13 Z N A
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 P 21/02 C

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 チャン、トン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 パイルズ、エリカ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ロスコニ、マイケル

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 リュー、ニーナ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 パテル、スプリヤ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 スミス、エリック

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 マーフィー、アンドリュー

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 リン、チャーヤン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 デビス、サミュエル

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 特表 2 0 1 8 - 5 2 9 7 6 4 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 8 6 3 6 2 (W O, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 1 4 5 7 9 2 (W O, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 1 3 6 1 7 2 (W O, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 0 7 K

C 1 2 N

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 (S T N)