(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509555
(P2025-509555A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
C07K	*16/46 (2006.01)*	C07K	16/46	ZNA	4C085
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28		4C086
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13		4H045
C07K	*16/30 (2006.01)*	C07K	16/30		
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	31/7088		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全166頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-554764(P2024-554764)
(86)(22)出願日　令和5年3月14日(2023.3.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月12日(2024.11.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/056513
(87)国際公開番号　WO2023/174952
(87)国際公開日　令和5年9月21日(2023.9.21)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2022/056734
(32)優先日　令和4年3月15日(2022.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　517240322
ジェンマブ エー／エス
ＧＥＮＭＡＢ Ａ／Ｓ
デンマーク王国 ２５００ ヴァルビー
カール ヤコブセン ヴェジ ３０
Ｃａｒｌ Ｊａｃｏｂｓｅｎｓ Ｖｅｊ ３０ ２５００ Ｖａｌｂｙ Ｄｅｎｍａｒｋ
(71)出願人　509146023
バイオエヌテック エスエー
ＢＩＯＮＴＥＣＨ ＳＥ
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ
アン デル ゴールドグルーベ １２
Ａｎ ｄｅｒ Ｇｏｌｄｇｒｕｂｅ １２ ５５１３１ Ｍａｉｎｚ Ｇｅｒｍａｎｙ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＥＰＣＡＭおよび／またはＣＤ１３７に結合する結合剤

(57)【要約】
本発明は、腫瘍もしくは癌を治療もしくは予防するため、または腫瘍もしくは癌の進行を予防するために有用な、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤を提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域と、ＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域とを含む結合剤。
【請求項２】
前記ＥｐＣＡＭがヒトＥｐＣＡＭである、請求項１に記載の結合剤。
【請求項３】
前記ＣＤ１３７がヒトＣＤ１３７である、請求項１または２に記載の結合剤。
【請求項４】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、腫瘍細胞上に発現されるＥｐＣＡＭに結合する、請求項１～３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項５】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号４に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号３に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号２に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号８に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１０】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号７に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号６に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１２】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１３】
ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣ

ＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１４】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号１に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１６】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１７】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、配列番号５に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１８】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが配列番号１に示される配列を含み、前記ＶＬが配列番号５に示される配列を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１９】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、ＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または請求項５～１８のいずれか一項に記載の重鎖可変領域（ＶＨ）および／もしくは軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有する、請求項１～１８のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２０】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１４に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２１】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１３に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２２】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１２に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２３】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２４】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１８に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項２５】

ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１７に示される配列を含む

ＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２６】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１６に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２７】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２８】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、請求項１～２７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２９】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３０】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１１に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、請求項１～２９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３１】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～３０のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３２】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、配列番号１５に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１～３１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３３】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが配列番号１１に示される配列を含み、前記ＶＬが配列番号１５に示される配列を含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３４】
ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、ＣＤ１３７結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または請求項２０～３３のいずれか一項に記載の重鎖可変領域および／もしくは軽鎖可変領域を含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する、請求項１～３３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３５】
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、

請求項１～３４のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項３６】

前記結合剤が全長抗体または抗体断片の形式である、請求項１～３５のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項３７】

前記結合剤がＦｃ領域を含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項３８】

前記結合剤が二重特異性結合剤などの多重特異性である、請求項１～３７のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項３９】

前記結合剤が二重特異性二価結合剤である、請求項１～３８のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項４０】

ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域以外のＥｐＣＡＭに結合する抗原結合領域を含まず、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域以外のＣＤ１３７に結合する抗原結合領域を含まない、請求項１～３９のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項４１】

前記結合剤が、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であって、

前記第１の結合アームが、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、

前記第２の結合アームが、

ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含む、

請求項１～４０のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項４２】

前記第１のＶＨが、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＶＬが、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

前記第２のＶＨが、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＶＬが、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、

請求項４１に記載の結合剤。
【請求項４３】
前記第１のＶＨが、配列番号１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第１のＶＬが、配列番号５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、および
前記第２のＶＨが、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第２のＶＬが、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項４１または４２に記載の結合剤。
【請求項４４】
前記第１のＶＨが配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、前記第１のＶＬが配列番号５に示されるアミノ酸配列を含み、および
前記第２のＶＨが配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、前記第２のＶＬが配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項４１～４３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項４５】
前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々が、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む、請求項４１～４４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項４６】
前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々がＣＨ３領域を含み、前記２つのＣＨ３領域が非対称突然変異を含む、請求項４１～４５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項４７】
（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである、請求項４１～４６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項４８】
前記結合剤が、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する、請求項４１～４７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項４９】
前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）が、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、前記抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている、請求項４１～４８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項５０】
前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の少なくとも一方において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３３１

およびＧ２３６に対応する位置の１つ以上のアミノ酸が、それぞれＬ、Ｌ、Ｄ、Ｎ、ＰおよびＧではない、請求項４１～４９のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５１】

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖において、それぞれＦおよびＥである、請求項５０に記載の結合剤。

【請求項５２】

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および／または第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである、請求項５０または５１に記載の結合剤。

【請求項５３】

（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであるか、

（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または

（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲである、

請求項５０～５２のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５４】

前記第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置が、それぞれＦおよびＥであり、（ｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであるか、または（ｉｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬである、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５５】

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、（ｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであるか、または（ｉｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬである、請求項５０～５４のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５６】

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６

に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲである、請求項５０～５５のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５７】

ａ）前記第１の重鎖の前記定常領域が、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含み、および

ｂ）前記第２の重鎖の前記定常領域が、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む、

請求項４１～５６のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５８】

前記結合剤が、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であって、

前記第１の結合アームが、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、前記第１のＶＨが第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＶＬが第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、

前記第２の結合アームが、

ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、前記第２のＶＨが第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＶＬが第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含み、

ここで、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６が、前記第１のＣＨではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５が、前記第２のＣＨではＦ、ＥおよびＡであり、ならびに

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸が、前記第１のＣＨではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸が、前記第２のＣＨではＲである、

請求項１～５７のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５９】

ｉ）配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の重鎖、

ｉｉ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、

ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％

、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む、請求項１～５８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６０】
ｉ）配列番号９に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む、請求項１～５９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６１】
第１の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第１の重鎖定常領域を含む第１の結合アームと、第２の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第２の重鎖定常領域を含む第２の結合アームとを含む結合剤であって、
前記第１および第２の抗原結合領域の少なくとも１つがＥｐＣＡＭに結合し、ならびに
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである、
結合剤。
【請求項６２】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および／または第２の重鎖定常領域において、それぞれＦ、ＥおよびＲである、請求項６１に記載の結合剤。
【請求項６３】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および／または第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである、請求項６１または６２に記載の結合剤。
【請求項６４】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１または第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１または第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡである、請求項６１または６２に記載の結合剤。
【請求項６５】
前記第１および第２の抗原結合領域の両方がＥｐＣＡＭに結合する、請求項６１～６４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６６】
前記第１および第２の抗原結合領域の一方がＥｐＣＡＭに結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方がＥｐＣＡＭ以外の抗原に結合する、請求項６１～６４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６７】
前記第１および第２の抗原結合領域の一方がＥｐＣＡＭに結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方がＣＤ１３７に結合する、請求項６１～６４および６６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６８】
第１の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第１の重鎖定常領域を含む第１の結合アームと、第２の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第２の重鎖定常領域を含む第２の結合アームとを含む結合剤であって、

前記第１および第２の抗原結合領域の少なくとも１つがＣＤ１３７に結合し、ならびにＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである、
結合剤。
【請求項６９】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および／または第２の重鎖定常領域において、それぞれＦ、ＥおよびＲである、請求項６８に記載の結合剤。
【請求項７０】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１および／または第２の重鎖定常領域の両方において、それぞれＦ、ＥおよびＲである、請求項６８または６９に記載の結合剤。
【請求項７１】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１または第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１または第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡである、請求項６８または６９に記載の結合剤。
【請求項７２】
前記第１および第２の抗原結合領域の両方がＣＤ１３７に結合する、請求項６８～７１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７３】
前記第１および第２の抗原結合領域の一方がＣＤ１３７に結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方がＣＤ１３７以外の抗原に結合する、請求項６８～７１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７４】
前記第１および第２の抗原結合領域の一方がＣＤ１３７に結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方がＥｐＣＡＭに結合する、請求項６８～７１および７３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７５】
前記ＥｐＣＡＭがヒトＥｐＣＡＭである、請求項６１～６７および７４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７６】
ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域が、腫瘍細胞上に発現されるＥｐＣＡＭに結合する、請求項６１～６７、７４および７５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７７】
ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む、請求項６１～６７および７４～７６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７８】
ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域が、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、前記ＶＬが、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む、請求項６

１～６７および７４～７７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７９】
ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域が、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが配列番号１に示される配列を含み、前記ＶＬが配列番号５に示される配列を含む、請求項６１～６７および７４～７８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８０】
前記ＣＤ１３７がヒトＣＤ１３７である、請求項６７～７９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８１】
ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、請求項６７～８０のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８２】
ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域が、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが、配列番号１１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、前記ＶＬが、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む、請求項６７～８１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８３】
ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域が重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記ＶＨが配列番号１１に示される配列を含み、前記ＶＬが配列番号１５に示される配列を含む、請求項６７～８２のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８４】
ＥｐＣＡＭに結合する抗原結合領域およびＣＤ１３７に結合する抗原結合領域を含み、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域が、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、前記ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、
請求項６１～６４、６６～７１および７３～８３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８５】
前記結合剤が二価結合剤である、請求項６１～８４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８６】
前記結合剤がＦｃ領域を含む、請求項６１～８５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８７】
前記結合剤が抗体、例えば全長抗体の形式である、請求項６１～８６のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８８】
ＥｐＣＡＭに結合する抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含み
前記第１の結合アームが、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、
前記第２の結合アームが、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含む、
請求項６１～６４、６６～７１および７３～８７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８９】
前記第１のＶＨが、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＶＬが、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、前記第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに
前記第２のＶＨが、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＶＬが、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、前記第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、前記第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列が、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む、
請求項８８に記載の結合剤。
【請求項９０】
前記第１のＶＨが、配列番号１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第１のＶＬが、配列番号５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、および
前記第２のＶＨが、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記第２のＶＬが、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項８８または８９に記載の結合剤。
【請求項９１】
前記第１のＶＨが配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、前記第１のＶＬが配列番号５に示されるアミノ酸配列を含み、および
前記第２のＶＨが配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、前記第２のＶＬが配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含む、
請求項８８～９０のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９２】
前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々がＣＨ３領域を含み、前記２つのＣ

Ｈ３領域が非対称突然変異を含む、請求項６１～９１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９３】
（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである、請求項９２に記載の結合剤。
【請求項９４】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、（ｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであるか、または（ｉｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬである、請求項９２または９３に記載の結合剤。
【請求項９５】
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置が、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置が、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、前記第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置がＬであり、前記第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置がＲである、請求項９２～９４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９６】
請求項１～９５のいずれか一項に記載の結合剤をコードするポリヌクレオチドまたは一組のポリヌクレオチド。
【請求項９７】
請求項１～９５のいずれか一項に記載の結合剤または請求項９６に記載のポリヌクレオチドを含む医薬組成物。
【請求項９８】
対象を治療する方法であって、請求項１～９５のいずれか一項に記載の結合剤、請求項９６に記載のポリヌクレオチドまたは請求項９７に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項９９】
対象における癌を治療または予防する方法である、請求項９８に記載の方法。
【請求項１００】
前記対象がヒトである、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
医薬用途、例えば医薬品として使用するための、請求項１～９５のいずれか一項に記載の結合剤、請求項９６に記載のポリヌクレオチドまたは請求項９７に記載の医薬組成物。
【請求項１０２】
疾患または障害の治療的または予防的処置に使用するための、請求項１０１に記載の結合剤、ポリヌクレオチドまたは医薬組成物。
【請求項１０３】

前記疾患または障害が癌である、請求項１０２に記載の結合剤、ポリヌクレオチドまたは医薬組成物。
【請求項１０４】
対象における癌を治療または予防するための、請求項１～９５のいずれか一項に記載の結合剤、請求項９６に記載のポリヌクレオチドまたは請求項９７に記載の医薬組成物。
【請求項１０５】
前記対象がヒトである、請求項１０４に記載の結合剤、ポリヌクレオチドまたは医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤に関する。そのような結合剤は、腫瘍または癌を治療または予防するのに有用である。
【背景技術】
【０００２】
上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）は、上皮におけるCa^{2+}非依存性同型細胞接着を媒介する膜貫通糖タンパク質である。ＥｐＣＡＭはまた、細胞シグナル伝達、遊走、増殖および分化に関与する。さらに、ＥｐＣＡＭは、ｃ－Ｍｙｃ、Ｅ－ＦＡＢＰならびにサイクリンＡおよびＥを上方制御するその能力によって発癌能を有する。ＥｐＣＡＭは、様々な癌の診断マーカとして使用することができる。また、ＥｐＣＡＭは、癌腫の腫瘍形成および転移において役割を果たすようであり、したがって、ＥｐＣＡＭはまた、潜在的な予後マーカとして、および免疫療法戦略のための潜在的な標的として作用することができる。
【０００３】
ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）は、ＴＮＦＲファミリーのメンバーであり、ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、ナチュラルキラー（Ｔ）細胞（ＮＫ［Ｔ］細胞）、Ｂ細胞および好中球上の共刺激分子である。Ｔ細胞上で、ＣＤ１３７は構成的には発現されないが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）活性化時に誘導される（例えば、腫瘍浸潤リンパ球上で［ＴＩＬ；Ｇｒｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０１４；１２４（５）：２２４６－５９］）。その天然リガンド４－１ＢＢＬまたはアゴニスト抗体による刺激は、ＴＲＡＦ－２およびＴＲＡＦ－１をアダプタとして使用するシグナル伝達をもたらす。ＣＤ１３７による初期シグナル伝達は、最終的に核因子（ＮＦ）－κＢおよびマイトジェン活性化タンパク質（ＭＡＰ）キナーゼ経路の活性化をもたらすＫ６３ポリユビキチン化反応を含む。シグナル伝達は、Ｔ細胞共刺激、増殖、サイトカイン産生、成熟の増加およびＣＤ８＋Ｔ細胞生存の延長をもたらす。ＣＤ１３７に対するアゴニスト抗体は、様々な前臨床モデルにおいてＴ細胞による抗腫瘍制御を促進することが示されている（Ｍｕｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００８；１４（２１）：６８９５－９０６）。ＣＤ１３７を刺激する抗体は、Ｔ細胞の生存および増殖を誘導することができ、それによって抗腫瘍免疫応答を増強する。ＣＤ１３７を刺激する抗体は先行技術に開示されており、ヒトＩｇＧ４抗体であるウレルマブ（ＡＵ ２００４２７９８７７）およびヒトＩｇＧ２抗体であるウトミルマブ（Ｆｉｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．２０１２ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．６１：１７２１－１７３３）が含まれる。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】Ｇｒｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０１４；１２４（５）：２２４６－５９
【非特許文献２】Ｍｕｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００８；１４（２１）：６８９５－９０６
【非特許文献３】Ｆｉｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．２０１２ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ

．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．６１：１７２１－１７３３
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
腫瘍または癌を予防または治療するための薬剤および方法が必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
第１の態様では、本開示は、ＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域と、ＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域とを含む結合剤を提供する。
【０００７】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭはヒトＥｐＣＡＭである。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７はヒトＣＤ１３７である。いくつかの実施形態では、ヒトＥｐＣＡＭは、配列番号５９に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトＣＤ１３７は、配列番号６２に示される配列を含む。
【０００８】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、腫瘍細胞上に発現されるＥｐＣＡＭに結合する。
【０００９】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号４に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号３に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、６５および６６に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、３および６６に示される配列を含む。
【００１０】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号６に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６７、６８および８に示される配列を含む。
【００１１】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＨＣＤＲ３配列は配列番号４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ３配列は配列番号８

に示される配列を含む。
【００１２】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む。
【００１３】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、６５および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６７、６８および８に示される配列を含む。
【００１４】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む。
【００１５】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）ならびに／または配列番号５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００１６】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【００１７】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号１に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【００１８】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００１９】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号５に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００２０】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有す

る配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号５に示される配列を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記の重鎖可変領域（ＶＨ）および／もしくは軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有する。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１３に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１２に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１８に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１７に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１６に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。

【００２５】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＨＣＤＲ３配列は配列番号１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ３配列は配列番号１８に示される配列を含む。
【００２６】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。
【００２７】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。
【００２８】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。
【００２９】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）ならびに／または配列番号１５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００３０】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【００３１】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【００３２】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００３３】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１５に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【００３４】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示される配列

と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【００３６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＣＤ１３７結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記の重鎖可変領域および／もしくは軽鎖可変領域を含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、および

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００３８】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、および

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００３９】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ

２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【００４１】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、６５および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６７、６８および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。

【００４２】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【００４３】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【００４４】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示さ

れるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００４５】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号５に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域のＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、および／または上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有し、ならびにＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域のＣＤ１３７結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、および／または上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する。

【００４７】

いくつかの実施形態では、可変領域は、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）ならびに４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態では、前記相補性決定領域および前記フレームワーク領域は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【００４９】

いくつかの実施形態では、結合剤は、全長抗体または抗体断片の形式である。

【００５０】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性結合剤などの多重特異性である。

【００５１】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性抗体などの多重特異性である。

【００５２】

いくつかの実施形態では、結合剤は、

（ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）、ならびに

（ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合

する前記第２の抗原結合領域を形成する、第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む。
【００５３】
いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、ならびに
ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、
を含む。
【００５４】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含む。
【００５５】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１の重鎖と、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１の軽鎖
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２の重鎖と、
ｉｉ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２の軽鎖
とを含む。
【００５６】
いくつかの実施形態では、第１の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは全長抗体に由来する。いくつか

の実施形態では、第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体などの全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。

【００５７】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む。

【００５８】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。

【００５９】

いくつかの実施形態では、前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第１の重鎖および前記第２の重鎖は同じ位置で置換されていない。

【００６０】

いくつかの実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである。

【００６１】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する。

【００６２】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）は、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。

【００６３】

いくつかの実施形態では、前記非修飾の第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含む。

【００６４】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγ受容体のＦｃ媒介架橋の誘導によって測定される。

【００６５】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｃ１ｑへの結合によって測定される。

【００６６】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域は、前記抗体へのＣ１ｑ

の結合が野生型抗体と比較して減少する、好ましくは少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように改変されており、Ｃ１ｑ結合は、好ましくはＥＬＩＳＡによって決定される。

【００６７】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３３１およびＧ２３６に対応する位置の１つ以上のアミノ酸は、それぞれＬ、Ｌ、Ｄ、Ｎ、ＰおよびＧではない。

【００６８】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥである。

【００６９】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【００７０】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであるか、

（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または

（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【００７１】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、それぞれＦおよびＥであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【００７２】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対

応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲである。

【００７４】

いくつかの実施形態では、前記第１および／または第２の重鎖の定常領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００７５】

いくつかの実施形態では、

ａ）前記第１の重鎖の定常領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含み、および

ｂ）前記第２の重鎖の定常領域は、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。

【００７６】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、カッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。

【００７７】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態では、前記第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【００７９】

いくつかの実施形態では、前記第２の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【００８０】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または

（ｉｖ）前記第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【００８１】

いくつかの実施形態では、カッパ（κ）軽鎖は、配列番号５５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８２】

いくつかの実施形態では、ラムダ（λ）軽鎖は、配列番号５６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８３】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４か

らなる群より選択されるアイソタイプのものである。一実施形態では、アイソタイプは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３およびヒトＩｇＧ４からなる群より選択される。

【００８４】

いくつかの実施形態では、結合剤は全長ＩｇＧ１抗体である。

【００８５】

いくつかの実施形態では、結合剤はＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である。

【００８６】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、

第１の結合アームは、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、第１のＶＨは第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第１のＶＬは第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、

第２の結合アームは、

ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、第２のＶＨは第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第２のＶＬは第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含み、

ここで、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６は、第１のＣＨではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５は、第２のＣＨではＦ、ＥおよびＡであり、ならびに

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は、第１のＣＨではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は、第２のＣＨではＲである。

【００８７】

いくつかの実施形態では、結合剤は、

ｉ）配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の重鎖、

ｉｉ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、

ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および

ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、

少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。

【００８８】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）配列番号９に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号１０に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７８に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７７に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７６に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７６、７７および７８に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８２、８３および８４に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８７、７７および８４に示される配列を含む。

【００９０】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８１に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８０に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７９に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８５、８６および８１に示される配列を含む。

【００９１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＨＣＤＲ３配列は配列番号７８に示される配列を含み、ＬＣＤＲ３配列は配列番号８１に示される配列を含む。

【００９２】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７６、７７および７８に示される配列を

含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含む。

【００９３】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８２、８３および８４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８５、８６および８１に示される配列を含む。

【００９４】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８７、７７および８４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２１、１～１１６位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）ならびに／または配列番号２２、１～１１２位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００９６】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２１、１～１１６位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００９７】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２１、１～１１６位に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００９８】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２２、１～１１２位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００９９】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２２、１～１１２位に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１００】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み

、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列を含む。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記の重鎖可変領域（ＶＨ）および／もしくは軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有する。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記の通りである。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７８に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、および

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８１に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、および

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号７８に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号８１に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７６、７７および７８に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３

配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８２、８３および８４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８５、８６および８１に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８７、７７および８４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含み；ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２１、１～１１６位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２２、１～１１２位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽

鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２１、１～１１６位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２２、１～１１２位に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域のＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有し、ならびにＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域のＤ１３７結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、可変領域は、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）ならびに４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、前記相補性決定領域および前記フレームワーク領域は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、結合剤は、全長抗体または抗体断片の形式である。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性結合剤などの多重特異性である。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性抗体などの多重特異性である。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、結合剤は、

（ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）、ならびに

（ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）

を含む。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、ならびに
ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、
を含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含む。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１の重鎖と、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１の軽鎖
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２の重鎖と、
ｉｉ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２の軽鎖
とを含む。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、第１の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体などの全長抗体に由来する。いく

つかの実施形態では、第１および第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第１の重鎖および前記第２の重鎖は同じ位置で置換されていない。
【０１２７】
いくつかの実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである。
【０１２８】
いくつかの実施形態では、前記結合剤は、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）は、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、前記非修飾の第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含む。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγ受容体のＦｃ媒介架橋の誘導によって測定される。
【０１３２】
いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｃ１ｑへの結合によって測定される。
【０１３３】
いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域は、前記抗体へのＣ１ｑの結合が野生型抗体と比較して減少する、好ましくは少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように改変されており、Ｃ１ｑ結合は、好ましくはＥＬＩＳＡによって決定される。
【０１３４】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３３１およびＧ２３６に対応する位置の１つ以上のアミノ酸は、それぞれＬ、Ｌ、Ｄ、Ｎ、ＰおよびＧではない。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥである。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであるか、

（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または

（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、それぞれＦおよびＥであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、

Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲである。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、前記第１および／または第２の重鎖の定常領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、

ａ）前記第１の重鎖の定常領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含み、および

ｂ）前記第２の重鎖の定常領域は、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、カッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、前記第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、前記第２の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または

（ｉｖ）前記第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、カッパ（κ）軽鎖は、配列番号５５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、ラムダ（λ）軽鎖は、配列番号５６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプのものである。一実施形態では、アイソタイプは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３およびヒトＩｇＧ４からなる群より選択される。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、結合剤は全長ＩｇＧ１抗体である。
【０１５２】
いくつかの実施形態では、結合剤はＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である。
【０１５３】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第１のＶＨは第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第１のＶＬは第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７６、７７および７８に示される配列を含み、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７９、８０および８１に示される配列を含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第２のＶＨは第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第２のＶＬは第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含み、
ここで、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６は、第１のＣＨではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５は、第２のＣＨではＦ、ＥおよびＡであり、ならびに
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は、第１のＣＨではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は、第２のＣＨではＲである。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）配列番号２１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。
【０１５５】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）配列番号２１に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２２に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号９０に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８９に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８８に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９１、９２および９０に示される配列を含む。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＨＣＤＲ３配列は配列番号４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ３配列は配列番号９０に示される配列を含む。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、６５および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９１、９２および９０に示される配列を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含む。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２５、１～１１５位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）ならびに／または配列番号２６、１～１１１位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１６２】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２５、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【０１６３】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２５、１～１１５位に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。
【０１６４】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２６、１～１１１位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【０１６５】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２６、１～１１１位に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。
【０１６６】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。
【０１６７】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列を含む。
【０１６８】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の上記の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記の重鎖可変領域（ＶＨ）および／もしくは軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有する。
【０１６９】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記の通りである。
【０１７０】
いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号９０に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、および
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号９０に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１４に示されるＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）および配列番号１８に示されるＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、６５および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９１、９２および９０に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ

３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２５、１～１１５位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６、１～１１１位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２５、１～１１５位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２６、１～１１１位に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域のＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有し、ならびにＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域のＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、可変領域は、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）ならびに４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ

４）を含む。
【０１８０】
いくつかの実施形態では、前記相補性決定領域および前記フレームワーク領域は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、結合剤は、全長抗体または抗体断片の形式である。
【０１８２】
いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性結合剤などの多重特異性である。
【０１８３】
いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性抗体などの多重特異性である。
【０１８４】
いくつかの実施形態では、結合剤は、
（ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）、ならびに
（ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む。
【０１８５】
いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、ならびに
ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、
を含む。
【０１８６】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含む。
【０１８７】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を

含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１の重鎖と、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１の軽鎖
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２の重鎖と、
ｉｉ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２の軽鎖
とを含む。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、第１の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体などの全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第１の重鎖および前記第２の重鎖は同じ位置で置換されていない。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）は、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、前記非修飾の第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含む。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγ受容体のＦｃ媒介架橋の誘導によって測定される。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｃ１ｑへの結合によって測定される。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域は、前記抗体へのＣ１ｑの結合が野生型抗体と比較して減少する、好ましくは少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように改変されており、Ｃ１ｑ結合は、好ましくはＥＬＩＳＡによって決定される。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３３１およびＧ２３６に対応する位置の１つ以上のアミノ酸は、それぞれＬ、Ｌ、Ｄ、Ｎ、ＰおよびＧではない。

【０２００】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥである。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであるか、

（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または

（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前

記第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲである。
【０２０３】
いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、それぞれＦおよびＥであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０２０４】
いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０２０５】
いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲである。
【０２０６】
いくつかの実施形態では、前記第１および／または第２の重鎖の定常領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０２０７】
いくつかの実施形態では、
ａ）前記第１の重鎖の定常領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含み、および
ｂ）前記第２の重鎖の定常領域は、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。
【０２０８】
いくつかの実施形態では、前記結合剤は、カッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。
【０２０９】
いくつかの実施形態では、前記結合剤は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。
【０２１０】
いくつかの実施形態では、前記第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。
【０２１１】
いくつかの実施形態では、前記第２の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。
【０２１２】

いくつかの実施形態では、
（ｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であるか、
（ｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、
（ｉｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または
（ｉｖ）前記第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【０２１３】
いくつかの実施形態では、カッパ（κ）軽鎖は、配列番号５５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２１４】
いくつかの実施形態では、ラムダ（λ）軽鎖は、配列番号５６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２１５】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプのものである。一実施形態では、アイソタイプは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３およびヒトＩｇＧ４からなる群より選択される。

【０２１６】
いくつかの実施形態では、結合剤は全長ＩｇＧ１抗体である。

【０２１７】
いくつかの実施形態では、結合剤はＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である。

【０２１８】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第１のＶＨは第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第１のＶＬは第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号８８、８９および９０に示される配列を含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第２のＶＨは第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第２のＶＬは第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含み、

ここで、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６は、第１のＣＨではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５は、第２のＣＨではＦ、ＥおよびＡであり、ならびに

ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は、第１のＣＨではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は、第２のＣＨではＲである。

【０２１９】

いくつかの実施形態では、結合剤は、

ｉ）配列番号２５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の重鎖、

ｉｉ）配列番号２６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、

ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および

ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の軽鎖

を含む。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、結合剤は、

ｉ）配列番号２５に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、

ｉｉ）配列番号２６に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、

ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および

ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖

を含む。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号４に示される配列を含むＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号９３に示される配列を含むＨＣＤＲ２配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２に示される配列を含むＨＣＤＲ１配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、９３および４に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、９６および６６に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、９３および６６に示される配列を含む。

【０２２２】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号８に示される配列を含むＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号９５に示される配列を含むＬＣＤＲ２配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態で

は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号９４に示される配列を含むＬＣＤＲ１配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９７、９８および８に示される配列を含む。

【０２２３】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、９３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含む。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、９６および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９７、９８および８に示される配列を含む。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、９３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含む。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２７、１～１１５位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）ならびに／または配列番号２８、１～１０８位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２７、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２７、１～１１５位に示される配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２８、１～１０８位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２８、１～１０８位に示される配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２３１】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列と少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列と少なくとも９５％の同一性を有する配列を含む。

【０２３２】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列を含む。

【０２３３】
いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の上記の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記の重鎖可変領域（ＶＨ）および／もしくは軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有する。

【０２３４】
いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記の通りである。

【０２３５】
いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、９３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０２３６】
いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ

３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６４、９６および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９７、９８および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６９、７０および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７２、７３および１８に示される配列を含む。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７４、９３および６６に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号７５、１３および７１に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、配列番号２７、１～１１５位のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２８、１～１０８位のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、配列番号１１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、
ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号２７、１～１１５位に示される配列を含み、ＶＬは、配列番号２８、１～１０８位に示される配列を含み、ならびに
ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域は、上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域のＥｐＣＡＭ結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＥｐＣＡＭに結合する第１の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＥｐＣＡＭに対する特異性を有し、ならびにＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域は、上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域のＣＤ１３７結合について競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む、ならびに／または上記のＣＤ１３７に結合する第２の抗原結合領域の重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域もしくはそれらの組合せを含む抗体のＣＤ１３７に対する特異性を有する。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、可変領域は、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）ならびに４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含む。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、前記相補性決定領域および前記フレームワーク領域は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、結合剤は、全長抗体または抗体断片の形式である。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性結合剤などの多重特異性である。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、結合剤は、二重特異性抗体などの多重特異性である。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
（ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）、ならびに
（ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド、ここで、前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を形成する、ならびに
ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポ

リペプチド、ここで、前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）と前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）とがＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を形成する、
を含む。
【０２４９】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含む。
【０２５０】
いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、
第１の結合アームは、
ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１の重鎖と、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１の軽鎖
とを含み、
第２の結合アームは、
ｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２の重鎖と、
ｉｉ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２の軽鎖
とを含む。
【０２５１】
いくつかの実施形態では、第１の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームは、全長ＩｇＧ１、λ（ラムダ）またはＩｇＧ１、κ（カッパ）抗体などの全長抗体に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。
【０２５２】
いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む。
【０２５３】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されており、前記第１の重鎖および前記第２の重鎖は同じ位置で置換されていない。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）は、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、前記非修飾の第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含む。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγ受容体のＦｃ媒介架橋の誘導によって測定される。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｃ１ｑへの結合によって測定される。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域は、前記抗体へのＣ１ｑの結合が野生型抗体と比較して減少する、好ましくは少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように改変されており、Ｃ１ｑ結合は、好ましくはＥＬＩＳＡによって決定される。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３３１およびＧ２３６に対応する位置の１つ以上のアミノ酸は、それぞれＬ、Ｌ、Ｄ、Ｎ、ＰおよびＧではない。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥ

である。
【０２６４】
いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。
【０２６５】
いくつかの実施形態では、
（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであるか、
（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または
（ｉｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域および前記第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲである。
【０２６６】
いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、それぞれＦおよびＥであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０２６７】
いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０２６８】
いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲである。
【０２６９】

いくつかの実施形態では、前記第１および／または第２の重鎖の定常領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、

ａ）前記第１の重鎖の定常領域は、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を含み、および

ｂ）前記第２の重鎖の定常領域は、配列番号５２に示されるアミノ酸配列を含む。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、カッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、前記結合剤は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、前記第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、前記第２の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、

（ｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域および前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、

（ｉｉｉ）前記第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または

（ｉｖ）前記第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、カッパ（κ）軽鎖は、配列番号５５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、ラムダ（λ）軽鎖は、配列番号５６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプのものである。一実施形態では、アイソタイプは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３およびヒトＩｇＧ４からなる群より選択される。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、結合剤は全長ＩｇＧ１抗体である。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、結合剤はＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する前記第１の抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する前記第２の抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含む抗体であり、第１の結合アームは、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第１のＶＨは第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第１のＶＬは第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、９３および４に示される配列を含み、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号９４、９５および８に示される配列を含み、
第２の結合アームは、
ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、
ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
とを含み、第２のＶＨは第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第２のＶＬは第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含み、
ここで、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６は、第１のＣＨではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５は、第２のＣＨではＦ、ＥおよびＡであり、ならびに
ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は、第１のＣＨではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は、第２のＣＨではＲである。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）配列番号２７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、結合剤は、
ｉ）配列番号２７に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２８に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、
ｉｉｉ）配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、および
ｉｖ）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖
を含む。

【０２８４】

さらなる態様では、本開示は、第１の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を

含む第１の重鎖定常領域を含む第１の結合アームと、第２の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第２の重鎖定常領域を含む第２の結合アームとを含む結合剤を提供し、ここで、

前記第１および第２の抗原結合領域の少なくとも１つはＥｐＣＡＭに結合し、ならびにＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１または第２の重鎖定常領域の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１または第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡである。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の両方がＥｐＣＡＭに結合する。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の一方はＥｐＣＡＭに結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方はＥｐＣＡＭ以外の抗原に結合する。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の一方はＥｐＣＡＭに結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方はＣＤ１３７に結合する。

【０２９１】

さらなる態様では、本開示は、第１の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第１の重鎖定常領域を含む第１の結合アームと、第２の抗原結合領域および定常重鎖２（ＣＨ２）領域を含む第２の重鎖定常領域を含む第２の結合アームとを含む結合剤を提供し、ここで、

前記第１および第２の抗原結合領域の少なくとも１つはＣＤ１３７に結合し、ならびにＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域の少なくとも１つにおいて、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／または第２の重鎖定常領域の両方においてそれぞれＦ、ＥおよびＲである。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１または第２の重鎖定常領域の一方で

はそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１または第２の重鎖定常領域の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡである。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の両方がＣＤ１３７に結合する。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の一方はＣＤ１３７に結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方はＣＤ１３７以外の抗原に結合する。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、前記第１および第２の抗原結合領域の一方はＣＤ１３７に結合し、前記第１および第２の抗原結合領域の他方はＥｐＣＡＭに結合する。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域および／またはＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域は、本明細書に記載される通りである。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭはヒトＥｐＣＡＭである。

【０３００】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域は、腫瘍細胞上に発現されるＥｐＣＡＭに結合する。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含む。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号５に示される配列を含む。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７はヒトＣＤ１３７である。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域は、重鎖可変領域（

ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、配列番号１１に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含み、ＶＬは、配列番号１５に示される配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。

【０３０７】

一実施形態では、ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは配列番号１１に示される配列を含み、ＶＬは配列番号１５に示される配列を含む。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する抗原結合領域およびＣＤ１３７に結合する抗原結合領域を含み、ここで、

ａ）ＥｐＣＡＭに結合する前記抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

ｂ）ＣＤ１３７に結合する前記抗原結合領域は、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、結合剤は二価結合剤である。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、結合剤はＦｃ領域を含む。

【０３１１】

いくつかの実施形態では、結合剤は、抗体、例えば全長抗体の形式である。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、結合剤は、ＥｐＣＡＭに結合する抗原結合領域を含む第１の結合アームと、ＣＤ１３７に結合する抗原結合領域を含む第２の結合アームとを含み、ここで、

第１の結合アームは、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み、

第２の結合アームは、

ｉｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと

ｉｖ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含む。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、

第１のＶＨは、第１のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第１のＶＬは、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第１のＨＣＤＲ１、

ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号２、３および４に示される配列を含み、第１のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号６、７および８に示される配列を含み、ならびに

第２のＶＨは、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含み、第２のＶＬは、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含み、第２のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示される配列を含み、第２のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列は、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示される配列を含む。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、

第１のＶＨは、配列番号１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第１のＶＬは、配列番号５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、および

第２のＶＨは、配列番号１１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第２のＶＬは、配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３１５】

いくつかの実施形態では、

第１のＶＨは配列番号１に示されるアミノ酸配列を含み、第１のＶＬは配列番号５に示されるアミノ酸配列を含み、および

第２のＶＨは配列番号１１に示されるアミノ酸配列を含み、第２のＶＬは配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含む。

【０３１６】

いくつかの実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）ではＬである。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、

Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲである。

【０３２０】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の結合剤をコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを提供する。

【０３２１】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の結合剤または本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む医薬組成物を提供する。

【０３２２】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の結合剤、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、対象を治療する方法を提供する。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象の癌を治療または予防する方法である。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【０３２５】

さらなる態様では、本開示は、医薬用途、例えば医薬品として使用するための、本明細書に記載の結合剤、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【０３２６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の結合剤、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載の医薬組成物は、疾患または障害の治療的または予防的処置に使用するためのものである。

【０３２７】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は癌である。

【０３２８】

さらなる態様では、本開示は、対象の癌を治療または予防するための、本明細書に記載の結合剤、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【０３２９】

いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【０３３０】

【図１】腫瘍細胞上の相対的なＥｐＣＡＭ発現　図１は、フローサイトメトリによって決定されるＴ８４、ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩ、ＮＣＩ－Ｎ８７、Ｃａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｈ７４７およびＡ５４９腫瘍細胞株上の相対的なＥｐＣＡＭ発現を示す。示されているデータは、ＥｐＣＡＭ抗体の幾何平均蛍光強度（ＡＰＣ）－非結合対照抗体の幾何平均蛍光（ＡＰＣ）として計算される各腫瘍細胞株についてのΔ幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）である。

【図２Ａ】ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞への二価ＥｐＣＡＭ抗体およびその一価対応物の結合。　ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞株へのＥｐＣＡＭ抗体の一価および二価結合をフローサイトメトリによって決定した。ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを全ての実験において陰性対照として含めた（白い四角）。示されているデータは、１つの代表的な実験の二重測定の平均蛍光強度（ＭＦＩ；Ｒ－フィコエリトリン［ＰＥ］）±標準偏差（ＳＤ）である。Ａ。ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞

へのｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（黒い丸）およびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（白い三角）抗体の結合。

【図２Ｂ】ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞への二価ＥｐＣＡＭ抗体およびその一価対応物の結合。　ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞株へのＥｐＣＡＭ抗体の一価および二価結合をフローサイトメトリによって決定した。ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを全ての実験において陰性対照として含めた（白い四角）。示されているデータは、１つの代表的な実験の二重測定の平均蛍光強度（ＭＦＩ；Ｒ－フィコエリトリン［ＰＥ］）±標準偏差（ＳＤ）である。Ｂ。ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞へのｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（黒い丸）およびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（白い三角）抗体の結合。

【図２Ｃ】ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞への二価ＥｐＣＡＭ抗体およびその一価対応物の結合。　ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞株へのＥｐＣＡＭ抗体の一価および二価結合をフローサイトメトリによって決定した。ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを全ての実験において陰性対照として含めた（白い四角）。示されているデータは、１つの代表的な実験の二重測定の平均蛍光強度（ＭＦＩ；Ｒ－フィコエリトリン［ＰＥ］）±標準偏差（ＳＤ）である。Ｃ。ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞へのｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ（黒い丸）およびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ（白い三角）抗体の結合。

【図２Ｄ】ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞への二価ＥｐＣＡＭ抗体およびその一価対応物の結合。　ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞株へのＥｐＣＡＭ抗体の一価および二価結合をフローサイトメトリによって決定した。ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを全ての実験において陰性対照として含めた（白い四角）。示されているデータは、１つの代表的な実験の二重測定の平均蛍光強度（ＭＦＩ；Ｒ－フィコエリトリン［ＰＥ］）±標準偏差（ＳＤ）である。Ｄ。ＤｉＦｉまたはＨＰＡＦ－ＩＩ細胞へのＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ（白い三角）抗体の結合。

【図２Ｅ】ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞への二価ＥｐＣＡＭ抗体およびその一価対応物の結合。　ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩまたはＡ５４９細胞株へのＥｐＣＡＭ抗体の一価および二価結合をフローサイトメトリによって決定した。ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを全ての実験において陰性対照として含めた（白い四角）。示されているデータは、１つの代表的な実験の二重測定の平均蛍光強度（ＭＦＩ；Ｒ－フィコエリトリン［ＰＥ］）±標準偏差（ＳＤ）である。Ｅ。ＤｉＦｉ細胞へのｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ抗体ならびに非結合対照二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲの結合。

【図３Ａ】ＣＨＯ－Ｓ細胞にトランスフェクトした全長ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭへのＥｐＣＡＭ抗体の結合。　全長ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭで一過性にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｓ細胞を使用して、一価および二価ＥｐＣＡＭ抗体の結合を分析した。陰性対照として、非トランスフェクトＣＨＯ－ＷＴ細胞への結合を評価した。データを、２つの技術的複製物の幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）Ｒ－ＰＥ値±ＳＤとして示す。Ａ。ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲおよびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３４３－Ａ３の結合。

【図３Ｂ】ＣＨＯ－Ｓ細胞にトランスフェクトした全長ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭへのＥｐＣＡＭ抗体の結合。　全長ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭで一過性にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｓ細胞を使用して、一価および二価ＥｐＣＡＭ抗体の結合を分析した。陰性対照として、非トランスフェクトＣＨＯ－ＷＴ細胞への結合を評価した。データを、２つの技術的複製物の幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）Ｒ－ＰＥ値±ＳＤとして示す。Ｂ。ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲ、ｂｓＩ

ｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲの結合。

【図４】細胞ベースのレポータアッセイにおけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による４－１ＢＢ依存性ルシフェラーゼ活性の誘導。　ＨＥＫ２９３＿ＮＫＦ＿ｈ４－１ＢＢ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃレポータ細胞を、ＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００５－ＦＥＡＲ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＬの段階希釈物の存在下で一晩、ＥｐＣＡＭを発現するＯＶ－９０－ＳＣ１２細胞と共培養するか、または単独で培養した（培地）。ルシフェラーゼ活性を発光測定によって定量化した。抗体を含まない培養物（点線）と比較したルシフェラーゼ活性の倍率誘導を示す。エラーバーは、二重ウェルのＳＤを示す。３つのうちの１つの代表的な実験からのデータを示す。

【図５ＡＢ】ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるインビトロでのＰＢＭＣ増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイで試験した。細胞を、示されている濃度のＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢもしくはＥｐＣＡＭｘｂ１２二重特異性抗体または非結合対照ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを添加してまたは添加せずに、抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）の存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性細胞の数を抽出し、分裂指数を計算するために使用した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂指数±ＳＤである。Ａ。ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ（黒い三角）およびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ（黒い四角）抗体によって誘導されるＰＢＭＣ増殖の分裂指数。Ｂ。ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（黒い三角）およびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（黒い四角）抗体によって誘導されるＰＢＭＣ増殖の分裂指数。

【図５ＣＤ】ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるインビトロでのＰＢＭＣ増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイで試験した。細胞を、示されている濃度のＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢもしくはＥｐＣＡＭｘｂ１２二重特異性抗体または非結合対照ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬを添加してまたは添加せずに、抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）の存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性細胞の数を抽出し、分裂指数を計算するために使用した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂指数±ＳＤである。Ｃ。ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（黒い三角）およびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（黒い四角）抗体によって誘導されるＰＢＭＣ増殖の分裂指数。Ｄ。ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ（黒い三角）およびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ（黒い）抗体によって誘導されるＰＢＭＣ増殖の分裂指数。

【図６】ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるインビトロでのＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ細胞を使用したインビトロＴ細胞増殖アッセイで試験した。細胞を、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ（灰色の棒）またはＥｐＣＡＭｘｂ１２（縞模様の棒）二重特異性抗体（１０μｇ／ｍＬ）または非結合対照ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ（１０μｇ／ｍＬ；白い棒）を添加してまたは添加せずに、抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）の存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性細胞の数を、フローサイトメトリによる絶対ＣＤ４＋（Ａ）またはＣＤ８＋（Ｂ）Ｔ細胞数の尺度として評価し、分裂指数を計算した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂指数±ＳＤである。

【図７ＡＢＣ】様々な腫瘍細胞株を使用したＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるインビトロでのＰＢＭＣ増殖の増強。　ＥｐＣＡ

Ｍｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現Ｔ８４、ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩ、ＮＣＩ－Ｎ８７、Ｃａｌｕ－３またはＮＣＩ－Ｈ７４７腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイで試験した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）およびＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢもしくはＥｐＣＡＭｘｂ１２二重特異性抗体または非結合対照ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬの存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性細胞の数を、フローサイトメトリによる絶対ＰＢＭＣ数の尺度として評価し、分裂指数を計算した。示されているデータは、（Ａ）ＰＢＭＣ－Ｔ８４共培養物、（Ｂ）ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ共培養物、（Ｃ）ＰＢＭＣ－ＨＰＡＦ－ＩＩ共培養物である。

【図７ＤＥＦ】様々な腫瘍細胞株を使用したＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるインビトロでのＰＢＭＣ増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現Ｔ８４、ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩ、ＮＣＩ－Ｎ８７、Ｃａｌｕ－３またはＮＣＩ－Ｈ７４７腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイで試験した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）およびＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢもしくはＥｐＣＡＭｘｂ１２二重特異性抗体または非結合対照ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬの存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性細胞の数を、フローサイトメトリによる絶対ＰＢＭＣ数の尺度として評価し、分裂指数を計算した。示されているデータは、（Ｄ）ＰＢＭＣ－ＮＣＩ－Ｎ８７共培養物、（Ｅ）ＰＢＭＣ－Ｃａｌｕ－３共培養物、（Ｆ）ＰＢＭＣ－ＮＣＩ－Ｈ７４７共培養物、を使用した１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂指数±ＳＤである。

【図８】不活性変異を含むＦｃドメインを有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による、ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞のインビトロ増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体を、ＣＦＳＥ標識ヒトＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイで試験した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ）およびＥｐＣＡＭ－ＦＥＲＬｘ４－１ＢＢ－ＦＥＡＲ（黒い菱形）、ＥｐＣＡＭ－ＦＥＡＲｘ４－１ＢＢ－ＦＥＡＬ（黒い四角）、ｂ１２－ＦＥＲＬｘ４－１ＢＢ－ＦＥＡＲ（左半分が黒い三角）、ＥｐＣＡＭ－ＦＥＲＬｘｂ１２－ＦＥＡＲ（右半分が黒い三角）二重特異性抗体または非結合対照ｂ１２－ＦＥＲＬｘｂ１２－ＦＥＡＲ（白い三角）の存在下で９６時間培養した。ＣＦＳＥ陽性の（Ａ）ＣＤ４＋および（Ｂ）ＣＤ８＋Ｔ細胞の数を、フローサイトメトリによる絶対Ｔ細胞数の尺度として評価し、分裂指数を計算した。示されているデータは、ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ共培養物を使用した１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂指数±ＳＤの非線形４パラメータ可変勾配適合である。

【図９】エクスビボでの患者由来腫瘍標本におけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による腫瘍浸潤リンパ球増殖の増強。　非小細胞肺癌患者から切除した腫瘍組織を１～２ｍｍ^{3}片に切断し、ＩＬ－２（５０Ｕ／ｍＬ）および０．２～５μｇ／ｍＬのＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲもしくはＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲの存在下で、またはＩＬ－２のみ（Ａｂなし）と共に１４日間培養した。ＩＬ－２濃度を、７および１０日目にそれぞれ３３Ｕ／ｍＬおよび１５Ｕ／ｍＬに段階的に減少させた。培養後の絶対細胞数をフローサイトメトリによって決定した。分析した２人の患者のうちの１人の例示的な患者に由来する培養物について、総ＴＩＬ、ＮＫ細胞、ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞数を示す。３～４の個々の複製物および複製物の平均からのデータを示す。エラーバーはＳＤを示す。

【図１０】ｈＥｐＣＡＭを過剰発現するＭＣ３８腫瘍を担持するｈＥｐＣＡＭマウスにおけるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の抗腫瘍活性。　ヒトＥｐＣＡＭタンパク質を遺伝子導入したマウス（ｈＥｐＣＡＭマウス）に、ヒトＥｐＣＡＭタンパク質を過剰発現する５×１０^{5}個のＭＣ３８腫瘍細胞（ＭＣ３８＿ｈＥｐＣＡＭ）を接種した。腫瘍が約３０ｍｍ^{3}の平均サイズに達したときに処置を開始した。腫瘍接種後１２、１７、２１

、２４、２８および３１日目に、マウスを１００μｇのＢｓＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＬＴ／ｍ４－１ＢＢ－３Ｈ３－ＡＡＫＲまたは陰性対照抗体ＩｇＧ２ａｍｍ－ｂ１２－ＡＡＫＲで腹腔内処置した（垂直な点線）。（Ａ）群あたりの平均腫瘍体積を示し、エラーバーはＳＥＭを示す。成長曲線は、　殺したマウスの最後に測定した腫瘍体積を含む（最後の観察を繰り越した）。＊＊、Ｐ＜０．０１；二元配置反復測定ＡＮＯＶＡ。（Ｂ）生存率パーセント。＊、Ｐ＜０．０５；ログランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定。

【図１１】二価ＥｐＣＡＭおよび４－１ＢＢ特異的モノクローナル抗体の組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の増強。　ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ）標識ヒトＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイにおいて、二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、二価ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ（単独または組合せのいずれか）と比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよび／またはＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で９６時間培養した。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ増殖を、ＣＴＶ標識希釈物のフローサイトメトリ分析によって評価した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均増殖指数±ＳＤである。

【図１２】ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の増強。　ＣＴＶ標識ヒトＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイにおいて、二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で、またはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと共に、９６時間培養した。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ増殖を、ＣＴＶ標識希釈物のフローサイトメトリ分析によって評価した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均分裂細胞パーセンテージ±ＳＤである。

【図１３】ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の増強。　ヒトＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロＰＢＭＣ増殖アッセイにおいて、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で、またはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと共に、９６時間培養した。ＣＤ２５（Ａ）または４－１ＢＢ（Ｂ）を発現するＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージ、ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団における幾何平均蛍光強度（ＦＩ）をフローサイトメトリによ

って決定した。示されているデータは、１つの代表的な実験から得られた二重反復測定値の平均±ＳＤである。

【図１４】ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による癌患者由来ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、ＣＴＶ標識癌患者由来ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロ増殖アッセイにおいて、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で、またはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと共に、９６時間培養した。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を、ＣＴＶ標識希釈物のフローサイトメトリ分析によって評価した。示されているデータは、１つの実験から得られた二重反復測定値の平均分裂細胞パーセンテージ±ＳＤである。

【図１５Ａ】ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による癌患者由来ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、癌患者由来ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロ増殖アッセイにおいて、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で、またはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと共に、９６時間培養した。ＣＤ２５（Ａ）を発現するＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージ、ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団における幾何平均蛍光強度（ＦＩ）をフローサイトメトリによって決定した。示されているデータは、１つの実験から得られた二重反復測定値の平均±ＳＤである。

【図１５Ｂ】ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による癌患者由来ＰＢＭＣ－ＤｉＦｉ腫瘍細胞共培養物におけるヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の増強。　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを、癌患者由来ＰＢＭＣと共培養したＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞を使用したインビトロ増殖アッセイにおいて、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した。細胞を、示されている濃度の抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍＬ；点線）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの存在下で、またはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと共に、９６時間培養した。４－１ＢＢ（Ｂ）を発現するＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージ、ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団における幾何平均蛍光強度（ＦＩ）をフローサ

イトメトリによって決定した。示されているデータは、１つの実験から得られた二重反復測定値の平均±ＳＤである。
【図１６】ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体は、ＣＤ８＋Ｔ細胞によるＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢの発現を増強する　ＣＬＤＮ６特異的ＴＣＲを発現するＰＢＭＣ由来のＣＤ８＋Ｔ細胞を、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲまたは対照抗体の存在下でＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ腫瘍細胞と２日間共培養した。ＣＤ８＋Ｔ細胞によるＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢの発現をフローサイトメトリによって分析した。（Ａ）代表的なフローサイトメトリプロット。（Ｂ～Ｃ）ＣＤ１０７ａ（Ｃ）およびＧｚｍＢ（Ｄ）発現レベルの用量反応曲線。示されているデータは、試験した６人のドナーのうちの１人からの二重反復測定値の平均およびＳＤである。（Ｄ）正規化したＣＤ１０７ａおよび（Ｅ）ＧｚｍＢ発現レベル（各ドナーについてｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲの発現レベルを１に設定した）。２つの独立した実験で評価した６人のドナーからのプールデータを示す。エラーバーはＳＤを示す。＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１；＊＊＊、Ｐ＜０．０００１；＊＊、Ｐ＜０．０１；＊、Ｐ＜０．０５；Ｄｕｎｎの多重比較検定によるＦｒｉｅｄｍａｎ検定。ＧＭＦＩ＝幾何平均蛍光強度；ＧｚｍＢ＝グランザイムＢ；ＰＢＭＣ＝末梢血単核細胞；ＳＤ＝標準偏差。
【図１７】ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体は、腫瘍細胞に対するＣＤ８＋Ｔ細胞媒介性細胞傷害を増強する　ＣＬＤＮ６特異的ＴＣＲを発現するＰＢＭＣ由来のＣＤ８＋Ｔ細胞を、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲまたは対照抗体の存在下でＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ腫瘍細胞と５～６日間共培養した。細胞指数値は、２～３時間間隔で実施したインピーダンス測定から導き出した。（Ａ）１人の代表的なドナーからの共培養物における細胞指数曲線を示す。記号は、二連ウェルの平均細胞指数値を表す。より良好な視認性のために、２回目のインピーダンス測定ごと（すなわち、４～６時間ごと）のデータが示されている。（Ｂ）共培養の全期間にわたって、細胞指数データを使用してＡＵＣ分析を行った。各処置条件のＡＵＣを、同じドナー由来のｂｓＩｇＧ１－ｃｔｒｌ－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲ処置培養物に対して正規化した。２つの独立した実験で評価した６人全てのドナーからのプールデータを示す。エラーバーはＳＤを示す。＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊、Ｐ＜０．０１；＊、Ｐ＜０．０５；Ｄｕｎｎの多重比較検定によるＦｒｉｅｄｍａｎ検定。　ＡＵＣ＝曲線下面積；ＰＢＭＣ＝末梢血単核細胞；ＳＤ＝標準偏差。
【図１８】異なるＦｃ不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡ、ＦＥＲ／ＦＥＲ）を有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体のＦｃγＲへの結合　固定化されたヒト組換えＦｃγＲタンパク質へのＦｃ不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡ、ＦＥＲ／ＦＥＲ）の様々な組合せを有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の結合、およびモノクローナル抗体ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの結合を、ＳＰＲによって分析した：ＦｃγＲＩａ、ＦｃγＲＩＩａ－Ｈ１３１、ＦｃγＲＩＩａ－Ｒ１３１、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩＩａ－Ｆ１５８およびＦｃγＲＩＩＩａ－Ｖ１５８。抗体ＩｇＧ１－ｂ１２（野生型Ｆｃ）を、ＦｃγＲ結合の陽性対照として含めた。ＲＵ（応答単位）での相対結合応答を、ＳＰＲ分析物注入の瞬間にセンサグラムを０ＲＵに設定することによって測定する。活性表面上で分析した各試料を、バックグラウンド補正に使用される平行基準表面上でも分析した。１つの実験の単回測定のデータを示す。
【発明を実施するための形態】
【０３３１】
　配列の説明
【０３３２】

【表１】

表１－配列

配列番号	参照	ドメイン	配列
1	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSS
2	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	GGTFSSYA
3	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR2	IIPIFGTA
4	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR3	ARDPFLHY
5	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTISNNYLAWYQQKRGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGTGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLEIK
6	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR1	QTISNNY
7	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR2	AAS
8	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR3	AQGELYPRQ
9	IgG1-EpCAM-A37-FERL	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	IgG1-EpCAM-A37-FEAR / IgG1-EpCAM-A37-FERL	完全軽鎖	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTISNNYLAWYQQKRGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGTGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS
12	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	GFSLNDYW

13	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR2	IDVGGSL
14	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR3	ARGGLTYGFDL
15	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKP GKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPED IATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK
16	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR1	EDISSY
17	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR2	GAS
18	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR3	HYYATISGLGVA
19	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	完全重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVR QAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIA YLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
20	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR / IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL	完全軽鎖	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKP GKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPED IATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
21	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAL	完全重鎖	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

22	IgG1-EpCAM-323-A3/ IgG1-EpCAM-323-A3-FEAL / IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITYLYWY LQKPGQSPHLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISR VEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	完全重鎖	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
24	IgG1-EpCAM-323-A3	完全重鎖	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
25	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
26	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	完全軽鎖	EIELTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQALQTFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

27	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIVPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	完全重鎖	EIELTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCAQGELYPRQFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-EpCAM-A37-FEAR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFLHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL	完全重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

31	IgG1-CD137-009-FEAR	完全重鎖	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVRQA PGKGLEWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKM TSLTTEDTATYFCARGGLTYGFDLWGPGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
32	IgG1-CD137-009-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQKP GQRPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISDLESAD AATYYCHYYATISGLGVAFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD137-005-FEAR	完全重鎖	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTISDFHVTWVRQAP GKGLEWIGTIITSASTTAYATWARGRFTISKSSTTVNLKIVS PTTEDTATYFCARSTYTDTSGYYFDFWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
34	IgG1-CD137-005-FEAR	完全軽鎖	AQVLTQTASPVSAAVGGTVIINCQSSQSIYNGNRLSWYQ QKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLAISDV QSDDAATYYCLGSYDCDSADCFAFGGGTEVVVERTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-b12-FEAR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

36	IgG1-b12-FEAL	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	IgG1-b12-FEAL / IgG1-b12-FEAR / IgG1-b12-FERL	完全軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKP GQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPE DFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12-FERL	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	IgG2amm- EpCAM-323-A3- AAKR	完全重鎖	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
40	IgG2amm- EpCAM-323-A3- AAKR / IgG2amm- EpCAM-323-A3- AALT	完全軽鎖	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITYLYWY LQKPGQSPHLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISR VEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRNEC

41	IgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT	完全重鎖	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQ ASGEGLKWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLKNEDTATYFCARFGNYVDYWGQGTTLTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYLMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
42	IgG2amm-m4-1BB-3H3-AAKR	完全重鎖	EMQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAGSGFTLSDYGVAWVR QAPKKGLEWVAYISYAGGTTYYRESVKGRFTISRDNAKSTL YLQMDSLRSEDTATYYCTIDGYGGYSGSHWYFDFWGPGT MVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPG
43	IgG2amm-m4-1BB-3H3-AAKR	完全軽鎖	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCRTSQNVYKNLAWYQQK LGEAPKLLIYNANSLQAGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DVATYFCQQYYSGNTFGAGTNLELKRADAAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRNEC
44	IgG2amm-b12-AALT	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYLMYSKLTVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
45	IgG2amm-b12-AALT / IgG2amm-b12-AAKR	完全軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKP GQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPE DFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC

46	IgG2amm-b12-AAKR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTS ANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYY MDVWGKGTTVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSRLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
47	IgG1 定常領域		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
48	IgG1-FEA 定常領域	FEA 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
49	IgG1-FER 定常領域	FER 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

50	IgG1-F405L 定常領域	F405L 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
51	IgG1-K409R 定常領域	K409R 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
52	IgG1-FEAR 定常領域	FEA 置換および K409R 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
53	IgG1-FEAL 定常領域	FEA 置換および F405L 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
54	IgG1-FERL 定常領域	FER 置換および F405L 置換あり （太字）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

55	カッパ軽鎖定常領域	ヒトカッパ軽鎖の定常領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	ラムダ軽鎖定常領域	ヒトラムダ軽鎖の定常領域	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
57	IgG2amm-AAKR	AAKR 置換置換あり（太字）	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN**AA**GGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMV**K**DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYS**R**LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
58	IgG2amm-AALT	AALT 置換置換あり（太字）	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN**AA**GGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSY**L**MYSKL**T**VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPG
59	ヒト EpCAM	シグナルペプチド（太字）を含む全長タンパク質配列	**MAPPQVLAFGLLLAAATATFAAA**QEECVCENYKLAVNCF VNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSK LGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSM CWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKP YDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLVQNS SQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSKKMDLTVNGE QLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAV VAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
60	カニクイザル EpCAM	シグナルペプチド（太字）を含む全長タンパク質配列	**MAPPQVLAFGLLLAAATASFAAA**QKECVCENYKLAVNCF LNDNGQCQCTSIGAQNTVLCSKLAAKCLVMKAEMNGSK LGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTC WCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKPY DVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNILYEDNVITIDLVQNSS QKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSKKMDLRVNGEQ LDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAIV AGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEIHRELNA

61	マウスEpCAM	シグナルペプチド（太字）を含む全長タンパク質配列	**MAGPQALAFGLLLAVVTATLAAA**QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLASKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQGLFKAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKERESPYDHQSLQTALQEAFTSRYKLNQKFIKNIMYENNVITIDLMQNSSQKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKSMDLRVNGEPLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLTAGIIAVIVVVSLAVIAGIVVLVISTRKKSAKYEKAEIKEMGEIIHRELNA
62	ヒト4-1BB	シグナルペプチド（太字）を含む全長タンパク質配列	**MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS**LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
63	カニクイザル4-1BB	シグナルペプチド（太字）を含む全長タンパク質配列	**MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS**LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFLALTSTVVLFLLFFLVLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
64	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	SYAIS
65	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
66	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR3	DPFLHY
67	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR1	RASQTISNNYLA
68	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VL_CDR2	AASSRAT
69	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	DYWMS
70	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR2	YIDVGGSLYYAASVKG
71	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR3	GGLTYGFDL
72	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR1	QASEDISSYLA
73	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VL_CDR2	GASDLAS
74	IgG1-EpCAM-A37-FERL	VH_CDR1	SYA
75	IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	VH_CDR1	DYW
76		VH_CDR1	GYTFTNYG
77		VH_CDR2	INTYTGEP

78		VH_CDR3	ARFGNYVDY
79		VL_CDR1	KNLLHSNGITY
80		VL_CDR2	QM
81		VL_CDR3	AQNLEIPRT
82		VH_CDR1	NYGMN
83		VH_CDR2	WINTYTGEPTYGEDFKG
84		VH_CDR3	FGNYVDY
85		VL_CDR1	RSSKNLLHSNGITYLY
86		VL_CDR2	QMSNLAS
87		VH_CDR1	NYG
88		VL_CDR1	QSLLHSNGYNY
89		VL_CDR2	LG
90		VL_CDR3	MQALQTFT
91		VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD
92		VL_CDR2	LGSNRAS
93		VH_CDR2	IVPIFGTA
94		VL_CDR1	QSVSSSY
95		VL_CDR2	GA
96		VH_CDR2	GIVPIFGTANYAQKFQG
97		VL_CDR1	RASQSVSSSYLA
98		VL_CDR2	GASSRAT

【０３３３】

発明の詳細な説明

本開示を以下でより詳細にさらに説明するが、この開示は本明細書に記載される特定の方法、プロトコルおよび試薬に限定されず、これらは異なり得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本開示の範囲を限定することを意図するものではなく、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【０３３４】

以下において、本開示の要素をより詳細に説明する。これらの要素を特定の実施形態と共に列挙するが、さらなる実施形態を創出するためにそれらを任意の方法および任意の数で組み合わせてもよいことが理解されるべきである。様々に説明される例および好ましい実施形態は、本開示を明示的に記載される実施形態のみに限定すると解釈されるべきではない。この説明は、明示的に記載される実施形態を任意の数の開示される要素および／または好ましい要素と組み合わせた実施形態を支持し、包含すると理解されるべきである。さらに、本出願に記載されている全ての要素の任意の並び替えおよび組合せは、文脈上特に指示されない限り、本出願の説明によって開示されていると見なされるべきである。

【０３３５】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、“Ａ ｍｕｌｔｉｌｉｎｇｕａｌ ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｔｅｒｍｓ：（ＩＵＰＡＣ Ｒｅｃｏｍｍｅｎｄａｔｉｏｎｓ）”，Ｈ．Ｇ．Ｗ．Ｌｅｕｅｎｂｅｒｇｅｒ，Ｂ．Ｎａｇｅｌ，ａｎｄ Ｈ．Ｋｏｌｂｌ，Ｅｄｓ．，Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ，ＣＨ－４０１０ Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，（１９９５）に記載されているように定義される。

【０３３６】

本開示の実施は、特に明記されない限り、当分野の文献で説明されている従来の化学、生化学、細胞生物学、免疫学、および組換えＤＮＡ技術を使用する（例えば、Ｏｒｇａｎｉｋｕｍ，Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ Ｖｅｒｌａｇ ｄｅｒ Ｗｉｓｓｅｎｓｃｈａｆｔｅｎ，Ｂｅｒｌｉｎ １９９０；Ｓｔｒｅｉｔｗｉｅｓｅｒ／Ｈｅａｔｈｃｏｏｋ，“Ｏｒｇａｎｉｓｃｈｅ Ｃｈｅｍｉｅ”，ＶＣＨ，１９９０；Ｂｅｙｅｒ／Ｗａｌｔｅｒ，“Ｌｅｈｒｂｕｃｈ ｄｅｒ Ｏｒｇａｎｉｓｃｈｅｎ Ｃｈｅｍｉｅ”，Ｓ．Ｈｉｒｚｅｌ Ｖｅｒｌａｇ Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，１９８８；Ｃａｒｅｙ／Ｓｕｎｄｂｅｒｇ，“Ｏｒｇａｎｉｓｃｈｅ Ｃｈｅｍｉｅ”，ＶＣＨ，１９９５；Ｍａｒｃｈ，“Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９８５；Ｒｏｍｐｐ Ｃｈｅｍｉｅ Ｌｅｘｉｋｏｎ，Ｆａｌｂｅ／Ｒｅｇｉｔｚ（Ｈｒｓｇ．），Ｇｅｏｒｇ Ｔｈｉｅｍｅ Ｖｅｒｌａｇ Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ １９８９参照）。

【０３３７】

本明細書に記載される全ての方法は、本明細書で特に指示されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的な言語（例えば「など」）の使用は、単に本開示をよりよく説明することを意図しており、特許請求される本開示の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、本開示の実施に不可欠な特許請求されていない要素を指示すると解釈されるべきではない。

【０３３８】

本明細書における値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入る各別個の値を個別に言及することの簡略方法として機能することが意図されている。本明細書で特に指示されない限り、各個別の値は、本明細書に個別に列挙されているかのごとくに本明細書に組み込まれる。

【０３３９】

本明細書の本文全体を通していくつかの資料が引用される。本明細書で引用される資料（全ての特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、説明書などを含む）の各々は、上記または下記のいずれでも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明のためにそのような開示に先行する権利を有しないことの承認と解釈されるべきではない。

【０３４０】

定義

以下において、本開示の全ての態様に適用される定義を提供する。以下の用語は、特に指示されない限り、以下の意味を有する。定義されていない用語は、それらの技術分野で広く認められている意味を有する。

【０３４１】

本明細書および以下の特許請求の範囲全体を通して、文脈上特に必要とされない限り、「含む」という語および「含むこと」などの変形は、記述されるメンバー、整数もしくは工程またはメンバー、整数もしくは工程の群の包含を意味するが、いかなる他のメンバー、整数もしくは工程またはメンバー、整数もしくは工程の群の除外も意味しないと理解される。「から本質的になる」という用語は、本質的に重要な他のメンバー、整数、または工程を除外することを意味する。「含む」という用語は、「から本質的になる」という用語を包含し、これは次に、「からなる」という用語を包含する。したがって、本出願における各出現において、「含む」という用語は、「から本質的になる」または「からなる」という用語で置き換えられてもよい。同様に、本出願における各出現において、「から本質的になる」という用語は、「からなる」という用語に置き換えられてもよい。

【０３４２】

本開示を説明する文脈において（特に特許請求の範囲の文脈において）使用される「１つの」および「その」という用語および同様の言及は、本明細書で特に指示されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるべきである。

【０３４３】

本明細書で使用される場合、「および／または」は、他のものを含むまたは含まない、２つの指定された特徴または構成要素のそれぞれの具体的な開示として解釈されるべきである。例えば、「Ｘおよび／またはＹ」は、（ｉ）Ｘ、（ｉｉ）Ｙ、ならびに（ｉｉｉ）ＸおよびＹの各々の具体的な開示として、あたかも各々が本明細書に個別に記載されているかのごとくに解釈されるべきである。

【０３４４】

本開示の文脈において、「約」という用語は、当業者が問題の特徴の技術的効果を依然として保証すると理解する精度の区間を示す。この用語は、典型的には、示された数値からの±５％、±４％、±３％、±２％、±１％、±０．９％、±０．８％、±０．７％、±０．６％、±０．５％、±０．４％、±０．３％、±０．２％、±０．１％、±０．０５％、例えば±０．０１％の偏差を示す。当業者には理解されるように、所与の技術的効果の数値に対するそのような具体的な偏差は、技術的効果の性質に依存する。例えば、天然または生物学的な技術的効果は、一般に、人工的または工学的な技術的効果のものよりも大きいそのような偏差を有し得る。

【０３４５】

本発明の文脈における「結合剤」という用語は、所望の抗原に結合することができる任意の薬剤を指す。本発明の特定の実施形態では、結合剤は、抗体、抗体断片、またはそれらの構築物である。結合剤はまた、合成部分、修飾部分または天然には存在しない部分、特に非ペプチド部分を含み得る。そのような部分は、例えば、抗体または抗体断片などの所望の抗原結合官能基または領域を連結し得る。一実施形態では、結合剤は、抗原結合ＣＤＲまたは可変領域を含む合成構築物である。

【０３４６】

「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質、好ましくは抗体またはＢ細胞受容体（ＢＣＲ）などの抗原受容体に関する。免疫グロブリンは、特徴的な免疫グロブリン（Ｉｇ）フォールドを有する構造ドメイン、すなわち免疫グロブリンドメインを特徴とする。この用語は、膜結合免疫グロブリンおよび可溶性免疫グロブリンを包含する。膜結合免疫グロブリンは、一般にＢＣＲの一部である表面免疫グロブリンまたは膜免疫グロブリンとも呼ばれる。可溶性免疫グロブリンは、一般に抗体と呼ばれる。

【０３４７】

免疫グロ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））参照。簡潔には、免疫グロブリンは一般に、いくつかの鎖、典型的にはジスルフィド結合を介して連結された２本の同一の重鎖および２本の同一の軽鎖を含む。これらの鎖は、主に、V_LまたはＶＬ（可変軽鎖）ドメイン／領域、C_LまたはＣＬ（定常軽鎖）ドメイン／領域、V_HまたはＶＨ（可変重鎖）ドメイン／領域、ならびにC_HまたはＣＨ（定常重鎖）ドメイン／領域C_H1（ＣＨ１）、C_H2（ＣＨ２）、C_H3（ＣＨ３）およびC_H4（ＣＨ４）などの免疫グロブリンドメインまたは領域から構成される。重鎖定常領域は、典型的にはＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３の３つのドメインから構成される。ヒンジ領域は、重鎖のＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインとの間の領域であり、非常に柔軟である。ヒンジ領域内のジスルフィド結合は、ＩｇＧ分子内の２つの重鎖間の相互作用の一部である。各軽鎖は、典型的には、ＶＬおよびＣＬからなる。軽鎖定常領域は、典型的には１つのドメイン、ＣＬで構成される。ＶＨおよびＶＬ領域は、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散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）とも呼ばれる超可変性の領域（または配列および／もしくは構造的に定

義されたループの形態が超可変であり得る超可変領域）にさらに細分され得る。各ＶＨおよびＶＬは、典型的には、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６，９０１－９１７（１９８７）も参照のこと）。特に明記されない限り、または文脈と矛盾しない限り、本明細書のＣＤＲ配列は、ＤｏｍａｉｎＧａｐＡｌｉｇｎを使用してＩＭＧＴ規則に従って同定される（Ｌｅｆｒａｎｃ ＭＰ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９９９；２７：２０９－２１２およびＥｈｒｅｎｍａｎｎ Ｆ．，Ｋａａｓ Ｑ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ．Ｐ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，３８，Ｄ３０１－３０７（２０１０）；インターネットｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇも参照のこと。しかしながら、本開示は、ＩＭＧＴ規則に従って決定されるＣＤＲ配列のみに限定されないことが理解されるべきである。したがって、重鎖可変領域（ＶＨ）のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列、例えば配列番号１もしくは配列番号１１、または軽鎖可変領域（ＶＬ）のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列、例えば配列番号５もしくは配列番号１５は、ＣＤＲ配列を決定するための任意の方法によって、例えばＩＭＧＴ規則またはＫａｂａｔ規則に従って決定されるＣＤＲ配列を包含する。さらに、ＣＤＲ配列を決定するための異なる方法によって、例えばＩＭＧＴ規則およびＫａｂａｔ規則に従って決定されるＣＤＲ配列の重複を表す配列も含まれる。

【０３４８】

以下の表は、配列番号１および配列番号５または配列番号１１および配列番号１５に関連してＩＭＧＴ規則およびＫａｂａｔ規則に従ってＣＤＲ配列を決定した結果を示し、決定されたＣＤＲ配列の重複も示す。

【０３４９】

【表２】

配列番号 1 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
	IMGT	Kabat	重複
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IIPIFGTA [3]	GIIPIFGTANYAQKFQG [65]	IIPIFGTA [3]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
配列番号 5 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
LCDR1	QTISNNY [6]	RASQTISNNYLA [67]	QTISNNY [6]
LCDR2	AAS [7]	AASSRAT [68]	AAS [7]
LCDR3	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]

【０３５０】

【表３】

配列番号 11 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
	IMGT	Kabat	重複
HCDR1	GFSLNDYW [12]	DYWMS [69]	DYW [75]
HCDR2	IDVGGSL [13]	YIDVGGSLYYAASVKG [70]	IDVGGSL [13]
HCDR3	ARGGLTYGFDL [14]	GGLTYGFDL [71]	GGLTYGFDL [71]
配列番号 15 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
LCDR1	EDISSY [16]	QASEDISSYLA [72]	EDISSY [16]
LCDR2	GAS [17]	GASDLAS [73]	GAS [17]
LCDR3	HYYATISGLGVA [18]	HYYATISGLGVA [18]	HYYATISGLGVA [18]

【０３５１】

以下の表は、配列番号２１および配列番号２２に関連してＩＭＧＴ規則およびＫａｂａｔ規則に従ってＣＤＲ配列を決定した結果を示し、決定されたＣＤＲ配列の重複も示す。

【０３５２】

【表４】

配列番号 21 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
	IMGT	Kabat	重複
HCDR1	GYTFTNYG [76]	NYGMN [82]	NYG [87]
HCDR2	INTYTGEP [77]	WINTYTGEPTYGEDFKG [83]	INTYTGEP [77]
HCDR3	ARFGNYVDY [78]	FGNYVDY [84]	FGNYVDY [84]
配列番号 22 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
LCDR1	KNLLHSNGITY [79]	RSSKNLLHSNGITYLY [85]	KNLLHSNGITY [79]
LCDR2	QM [80]	QMSNLAS [86]	QM [80]
LCDR3	AQNLEIPRT [81]	AQNLEIPRT [81]	AQNLEIPRT [81]

【０３５３】

以下の表は、配列番号２５および配列番号２６に関連してＩＭＧＴ規則およびＫａｂａｔ規則に従ってＣＤＲ配列を決定した結果を示し、決定されたＣＤＲ配列の重複も示す。

【０３５４】

【表５】

配列番号 25 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
	IMGT	Kabat	重複
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IIPIFGTA [3]	GIIPIFGTANYAQKFQG [65]	IIPIFGTA [3]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
配列番号 26 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
LCDR1	QSLLHSNGYNY [88]	RSSQSLLHSNGYNYLD [91]	QSLLHSNGYNY [88]
LCDR2	LG [89]	LGSNRAS [92]	LG [89]
LCDR3	MQALQTFT [90]	MQALQTFT [90]	MQALQTFT [90]

【０３５５】

以下の表は、配列番号２７および配列番号２８に関連してＩＭＧＴ規則およびＫａｂａｔ規則に従ってＣＤＲ配列を決定した結果を示し、決定されたＣＤＲ配列の重複も示す。

【０３５６】

【表６】

配列番号 27 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
	IMGT	Kabat	重複
HCDR1	GGTFSSYA [2]	SYAIS [64]	SYA [74]
HCDR2	IVPIFGTA [93]	GIVPIFGTANYAQKFQG [96]	IVPIFGTA [93]
HCDR3	ARDPFLHY [4]	DPFLHY [66]	DPFLHY [66]
配列番号 28 の CDR 配列 [括弧内の配列番号]			
LCDR1	QSVSSSY [94]	RASQSVSSSYLA [97]	QSVSSSY [94]
LCDR2	GA [95]	GASSRAT [98]	GA [95]
LCDR3	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]	AQGELYPRQ [8]

【０３５７】

特に明記されない限り、または文脈と矛盾しない限り、本開示における定常領域のアミノ酸位置への言及は、ＥＵナンバリングに従う（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１９６９ Ｍａｙ；６３（１）：７８－８５；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ．１９９１ ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）。

【０３５８】

異なるクラスの抗体、すなわちＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭを構成する５種類の哺乳動物免疫グロブリン重鎖、すなわちα、δ、ε、γおよびμが存在する。可溶性免疫グロブリンの重鎖とは対照的に、膜または表面免疫グロブリンの重鎖は、そのカルボキシ末端に膜貫通ドメインおよび短い細胞質ドメインを含む。哺乳動物では、２種類の軽鎖、すなわちラムダおよびカッパが存在する。免疫グロブリン鎖は、可変領域および定常領域を含む。定常領域は、免疫グロブリンの異なるアイソタイプ内で本質的に保存されており、可変部分は高度に多様であり、抗原認識を担う。

【０３５９】
「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という用語は、本明細書では互換的に使用され得、限定的に理解されるべきではない。アミノ酸は、各アミノ酸に特異的な側鎖（Ｒ基）と共にアミン（－ＮＨ$_2$）およびカルボキシル（－ＣＯＯＨ）官能基を含有する有機化合物である。本開示の文脈において、アミノ酸は、構造および化学的特性に基づいて分類され得る。したがって、アミノ酸のクラスは、以下の表の一方または両方に反映され得る：
【０３６０】
【表７】

表2 :R基の構造および一般的な化学的性質に基づく主な分類

クラス	アミノ酸
酸性残基	D および E
塩基性残基	K、R、および H
親水性非荷電残基	S、T、N、および Q
脂肪族非荷電残基	G、A、V、L、および I
非極性非荷電残基	C、M、および P
芳香族残基	F、Y、および W

【０３６１】
【表８】

表3：アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的分類

クラス	アミノ酸
ヒドロキシル基含有残基	S および T
脂肪族残基	I、L、V、および M
シクロアルケニル関連残基	F、H、W、および Y
疎水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、および Y
負に帯電した残基	D および E
極性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S、および T
正に帯電した残基	H、K、および R
小さい残基	A、C、D、G、N、P、S、T、および V
非常に小さい残基	A、G、および S
ターン形成に関与する残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P、および T
柔軟な残基	Q、T、K、S、G、P、D、E、および R

【０３６２】
本開示の目的のために、アミノ酸配列（ペプチド、タンパク質またはポリペプチド）の「変異体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体および／またはアミノ酸置換変異体を含む。「変異体」という用語は、全ての突然変異体、スプライス変異体、翻訳後修飾変異体、立体配座変異体、アイソフォーム変異体、対立遺伝子変異体、種変異体、および種ホモログ、特に天然に存在するものを含む。「変異体」という用語は、特にアミノ酸配列の断片を含む。
【０３６３】
アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列における単一または２つ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合、１つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列の特定の部位に挿入されるが、得られた産物の適切なスクリーニングを伴うランダムな挿入も可能である。
【０３６４】
アミノ酸付加変異体は、１個以上のアミノ酸、例えば１、２、３、５、１０、２０、３０、５０個、またはそれ以上のアミノ酸のアミノ末端および／またはカルボキシ末端融合物を含む。
【０３６５】
アミノ酸欠失変異体は、配列からの１個以上のアミノ酸の除去、例えば１、２、３、５、１０、２０、３０、５０個、またはそれ以上のアミノ酸の除去を特徴とする。欠失は、

タンパク質の任意の位置にあり得る。タンパク質のＮ末端および／またはＣ末端に欠失を含むアミノ酸欠失変異体は、Ｎ末端および／またはＣ末端切断変異体とも呼ばれる。

【０３６６】

アミノ酸置換変異体は、配列中の少なくとも１つの残基が除去され、別の残基がその位置に挿入されていることを特徴とする。あるアミノ酸の別のアミノ酸への置換は、保存的置換または非保存的置換として分類され得る。相同なタンパク質もしくはペプチド間で保存されていないアミノ酸配列内の位置にある修飾、および／またはアミノ酸を類似の特性を有する他のアミノ酸で置き換えることが好ましい。好ましくは、ペプチドおよびタンパク質変異体におけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電したアミノ酸または非荷電アミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、それらの側鎖が関連するアミノ酸のファミリーのうちの１つの置換を含む。本開示の文脈において、「保存的置換」は、１つのアミノ酸の、類似の構造的および／または化学的特性を有する別のアミノ酸による置換であり、そのような１つのアミノ酸残基の、上記の２つの表のいずれかで定義されるのと同じクラスの別のアミノ酸残基による置換である：例えば、ロイシンは、両方とも脂肪族分岐疎水性であるので、イソロイシンで置換され得る。同様に、アスパラギン酸は、両方とも小さい負に帯電した残基であるので、グルタミン酸で置換され得る。天然に存在するアミノ酸はまた、一般に４つのファミリー：酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン）アミノ酸に分けられ得る。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時に芳香族アミノ酸として一緒に分類されることがある。一実施形態では、保存的アミノ酸置換は、以下の群内の置換を含む：

－グリシン、アラニン；
－バリン、イソロイシン、ロイシン；
－アスパラギン酸、グルタミン酸；
－アスパラギン、グルタミン；
－セリン、トレオニン；
－リジン、アルギニン；および
－フェニルアラニン、チロシン。

【０３６７】

本明細書で使用される「．．．位に対応するアミノ酸」という用語および同様の表現は、ヒトＩｇＧ１重鎖におけるアミノ酸位置番号を指す。他の免疫グロブリン中の対応するアミノ酸位置は、ヒトＩｇＧ１とのアラインメントによって見出され得る。したがって、別の配列中のアミノ酸またはセグメントに「対応する」１つの配列中のアミノ酸またはセグメントは、典型的にはデフォルト設定で、ＡＬＩＧＮ、ＣｌｕｓｔａｌＷまたは同様のものなどの標準的な配列アラインメントプログラムを使用して他のアミノ酸またはセグメントと整列するものであり、ヒトＩｇＧ１重鎖と少なくとも５０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の同一性を有する。配列または配列中のセグメントを整列させ、それによって本開示によるアミノ酸位置に対応する配列中の位置を決定する方法は、当技術分野で周知であると考えられる。

【０３６８】

本開示の文脈における「抗体」（Ａｂ）という用語は、典型的には生理学的条件下で、好ましくは少なくとも約３０分、少なくとも約４５分、少なくとも約１時間、少なくとも約２時間、少なくとも約４時間、少なくとも約８時間、少なくとも約１２時間、約２４時間以上、約４８時間以上、約３、４、５、６、７日間以上など、または任意の他の関連する機能的に定義された期間（例えば、抗原への抗体結合に関連する生理学的応答を誘導、促進、増強および／もしくは調節するのに十分な時間ならびに／または抗体がエフェクタ活性を動員するのに十分な時間）などの有意な期間の半減期で、抗原（特に抗原上のエピトープ）に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断

片、またはそれらのいずれかの誘導体を指す。特に、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも２本の重（Ｈ）鎖および２本の軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質を指す。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および前記のいずれかの組合せを含む。各重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域（ＣＨ）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）からなる。可変領域および定常領域は、本明細書ではそれぞれ可変ドメインおよび定常ドメインとも呼ばれる。ＶＨおよびＶＬ領域は、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散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができる。各ＶＨおよびＶＬは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。ＶＨのＣＤＲは、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３（またはＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２およびＣＤＲ－Ｈ３）と呼ばれ、ＶＬのＣＤＲは、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３（またはＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２およびＣＤＲ－Ｌ３）と呼ばれる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は重鎖定常領域（ＣＨ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を含み、ＣＨは、定常ドメインＣＨ１、ヒンジ領域、ならびに定常ドメインＣＨ２およびＣＨ３（以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置されている：ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３）にさらに細分することができる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクタ細胞）およびＣ１ｑなどの補体系の成分を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。抗体は、天然源または組換え源に由来する無傷の免疫グロブリンであり得、無傷の免疫グロブリンの免疫活性部分であり得る。抗体は、典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Ｆｖ、ＦａｂおよびＦ（ａｂ）$_2$、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む様々な形態で存在し得る。

【０３６９】

免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。「結合領域」および「抗原結合領域」という用語は、本明細書では互換的に使用され、抗原と相互作用し、ＶＨ領域およびＶＬ領域の両方を含む領域を指す。本明細書で使用される抗体は、単一特異性抗体だけでなく、複数、例えば２つ以上、例えば３つ以上の異なる抗原結合領域を含む多重特異性抗体も含む。

【０３７０】

上記のように、本明細書における抗体という用語は、特に明記されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、抗原結合断片である、すなわち抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実行され得ることが示されている。「抗体」という用語に包含される抗原結合断片の例としては、（ｉ）Ｆａｂ’もしくはＦａｂ断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価断片、または国際公開第２００７／０５９７８２号（Ｇｅｎｍａｂ）に記載されている一価抗体；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインから本質的になるＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬドメインおよびＶＨドメインから本質的になるＦｖ断片、（ｖ）ＶＨドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる（Ｈｏｌｔ ｅｔ ａｌ；Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００３ Ｎｏｖ；２１（１１）：４８４－９０）ｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１，５４４－５４６（１９８９））；（ｖｉ）ラクダ科動物またはナノボディ分子（Ｒｅｖｅｔｓ ｅｔ ａｌ；Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２００５ Ｊａｎ；５（１）：１１１－２４）ならびに（ｖｉｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメイン、ＶＬおよびＶＨは別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を用いて、ＶＬ領域とＶＨ領域とが対合して一価分子を形成する単一のタンパク質鎖（一本鎖抗体または一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知であり、例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２，４２

３－４２６（１９８８）およびＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８５，５８７９－５８８３（１９８８）参照）としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって連結され得る。そのような一本鎖抗体は、特に明記されない限り、または文脈によって明確に指示されない限り、抗体という用語に包含される。そのような断片は一般に抗体の意味の範囲内に含まれるが、それらは、集合的におよびそれぞれ独立して本開示の固有の特徴であり、異なる生物学的特性および有用性を示す。本開示の文脈におけるこれらおよび他の有用な抗体断片、ならびにそのような断片の二重特異性形式を本明細書でさらに論じる。抗体という用語は、特に明記されない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、キメラ抗体およびヒト化抗体などの抗体様ポリペプチド、ならびに酵素的切断、ペプチド合成、および組換え技術などの任意の公知の技術によって提供される抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片（抗原結合断片）も含むことも理解されるべきである。

【０３７１】

生成された抗体は、任意のアイソタイプを有することができる。本明細書で使用される場合、「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（例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４など）、ＩｇＤ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１、ＩｇＡ２など）、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＹ）を指す。特定のアイソタイプ、例えばＩｇＧ１が本明細書で言及される場合、この用語は、特定のアイソタイプ配列、例えば特定のＩｇＧ１配列に限定されないが、抗体が他のアイソタイプよりもそのアイソタイプ、例えばＩｇＧ１に配列が近いことを示すために使用される。したがって、例えば本明細書に開示されるＩｇＧ１抗体は、定常領域における変異を含む、天然に存在するＩｇＧ１抗体の配列変異体であり得る。

【０３７２】

ＩｇＧ１抗体は、アロタイプと呼ばれる複数の多型変異体で存在することができ（Ｊｅｆｆｅｒｉｓ　ａｎｄ　Ｌｅｆｒａｎｃ　２００９．ｍＡｂｓ　Ｖｏｌ　１　Ｉｓｓｕｅ　４　１－７に総説されている）、そのいずれもが本明細書の実施形態の一部における使用に適している。ヒト集団における一般的なアロタイプ変異体は、文字ａ、ｆ、ｎ、ｚまたはそれらの組合せによって指定されるものである。本明細書の実施形態のいずれにおいても、抗体は、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む重鎖Ｆｃ領域を含み得る。さらなる実施形態では、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域はヒトＩｇＧ１を含む。

【０３７３】

本開示の文脈における「多重特異性抗体」という用語は、異なる抗体配列によって定義される少なくとも２つの異なる抗原結合領域を有する抗体を指す。いくつかの実施形態では、前記異なる抗原結合領域は、同じ抗原上の異なるエピトープに結合する。しかしながら、好ましい実施形態では、前記異なる抗原結合領域は、異なる標的抗原に結合する。一実施形態では、多重特異性抗体は、「二重特異性抗体」または「ｂｓ」である。二重特異性抗体などの多重特異性抗体は、本明細書で以下に記載される二重特異性または多重特異性抗体形式のいずれかを含む任意の形式であり得る。

【０３７４】

接頭辞ＢｉｓＧ１およびｂｓＩｇＧ１は、二重特異性抗体について本明細書では交換可能に使用される。

【０３７５】

抗体に関連して使用される場合の「全長」という用語は、抗体が断片ではないが、自然界でそのアイソタイプについて通常見出される特定のアイソタイプのドメイン、例えばＩｇＧ１抗体のＶＨ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジ、ＶＬおよびＣＬドメインの全てを含むことを示す。

【０３７６】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列およびヒト免疫グロブリン定常ドメインに由来する可変領域およびフレームワーク領域を有する抗体を含むことが意図されている。本明細書に開示されるヒト抗体は、ヒト生殖細

胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異、挿入または欠失）を含み得る。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の非ヒト種の生殖細胞系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図しない。

【０３７７】

本明細書で使用される「キメラ抗体」という用語は、可変領域が非ヒト種に由来し（例えばげっ歯動物に由来）、定常領域がヒトなどの異なる種に由来する抗体を指す。キメラ抗体は、抗体工学によって作製され得る。「抗体工学」は、抗体の様々な種類の修飾に総称的に使用される用語であり、抗体工学のためのプロセスは当業者に周知である。特に、キメラ抗体は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｈ．１５に記載されているような標準的なＤＮＡ技術を使用することによって作製され得る。キメラ抗体は、遺伝子操作された、または酵素的に操作された組換え抗体であり得る。キメラ抗体を作製することは当業者の知識の範囲内であり、したがって、キメラ抗体の作製は、本明細書に記載される方法以外の方法によって行われ得る。ヒトにおける治療適用のためのキメラモノクローナル抗体は、非ヒト抗体、例えばげっ歯動物抗体の予想される抗体免疫原性を低下させるために開発されている。それらは、典型的には、目的の抗原に特異的な非ヒト（例えばマウスまたはウサギ）可変領域、ならびにヒト定常抗体重鎖ドメインおよび軽鎖ドメインを含み得る。キメラ抗体の文脈で使用される「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、以下に記載されるように、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の両方のＣＤＲおよびフレームワーク領域を含む領域を指す。

【０３７８】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体定常ドメインおよびヒト可変ドメインに対して高レベルの配列相同性を含むように改変された非ヒト可変ドメインを含む、遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、一緒になって抗原結合部位を形成する６つの非ヒト抗体相補性決定領域（ＣＤＲ）を相同なヒトアクセプタフレームワーク領域（ＦＲ）に移植することによって達成され得る（国際公開第９２／２２６５３号および欧州特許第０　６２９　２４０号参照）。親抗体の結合親和性および特異性を完全に再構成するために、親抗体（すなわち非ヒト抗体）からヒトフレームワーク領域へのフレームワーク残基の置換（復帰突然変異）が必要とされ得る。構造相同性モデリングは、抗体の結合特性に重要なフレームワーク領域内のアミノ酸残基を同定するのに役立ち得る。したがって、ヒト化抗体は、非ヒトＣＤＲ配列、主に、任意で非ヒトアミノ酸配列への１つ以上のアミノ酸復帰突然変異を含むヒトフレームワーク領域、および完全ヒト定常領域を含み得る。任意で、必ずしも復帰突然変異ではないさらなるアミノ酸修飾を適用して、親和性および生化学的特性などの好ましい特徴を有するヒト化抗体が得られ得る。

【０３７９】

本明細書で使用される場合、別のタンパク質、例えば親タンパク質に「由来する」タンパク質は、タンパク質の１つ以上のアミノ酸配列が他のタンパク質または親タンパク質の１つ以上のアミノ酸配列と同一であるかまたは類似していることを意味する。例えば、別の抗体もしくは親抗体、結合アーム、抗原結合領域、または定常領域に由来する抗体、結合アーム、抗原結合領域、定常領域などにおいて、１つ以上のアミノ酸配列は、他の抗体もしくは親抗体、結合アーム、抗原結合領域、または定常領域のものと同一であるかまたは類似している。そのような１つ以上のアミノ酸配列の例としては、ＶＨおよびＶＬ　ＣＤＲならびに／またはフレームワーク領域、ＶＨ、ＶＬ、ＣＬ、ヒンジもしくはＣＨ領域の１つ以上もしくは全部のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ヒト化抗体は、本明細書では非ヒト親抗体に「由来する」と表すことができ、少なくともＶＬおよびＶＨ　ＣＤＲ配列が前記非ヒト親抗体のＶＨおよびＶＬ　ＣＤＲ配列と同一

であるかまたは類似していることを意味する。キメラ抗体は、本明細書では非ヒト親抗体に「由来する」と表すことができ、典型的には、ＶＨおよびＶＬ配列が非ヒト親抗体のものと同一または類似であり得ることを意味する。別の例は、本明細書では特定の親抗体に「由来する」と表し得る結合アームまたは抗原結合領域であり、前記結合アームまたは抗原結合領域が、典型的には、前記親抗体の結合アームまたは抗原結合領域と同一または類似のＶＨおよび／もしくはＶＬ　ＣＤＲ、またはＶＨおよび／もしくはＶＬ配列を含むことを意味する。しかしながら、本明細書の他の箇所に記載されるように、所望の特性を導入するために、ＣＤＲ、定常領域または抗体の他の箇所、結合アーム、抗原結合領域などで変異などのアミノ酸修飾を行うことができる。第１のタンパク質または親タンパク質に由来する１つ以上の配列に関連して使用される場合、「類似」アミノ酸配列は、好ましくは、少なくとも約５０％、例えば少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する。

【０３８０】

非ヒト抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、モルモット、ラマおよびヤギなどの多くの異なる種で作製することができる。

【０３８１】

モノクローナル抗体は、従来のモノクローナル抗体法、例えばＫｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５（１９７５）の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、様々な技術によって作製することができる。モノクローナル抗体を作製するための他の技術、例えば、Ｂリンパ球のウイルス形質転換もしくは発癌性形質転換または抗体遺伝子のライブラリを使用するファージディスプレイ技術を使用することができ、そのような方法は当業者に周知である。

【０３８２】

そのような非ヒト種におけるハイブリドーマ作製は、非常によく確立された手順である。融合のために免疫化動物／非ヒト種の脾細胞を単離するための免疫化プロトコルおよび技術は、当技術分野で公知である。融合パートナー（例えばマウス骨髄腫細胞）および融合手順も公知である。

【０３８３】

本明細書で使用される場合、文脈と矛盾しない限り、「Ｆａｂアーム」または「アーム」という用語は、１つの重鎖－軽鎖対を指し、本明細書では「半分子」と互換的に使用される。

【０３８４】

「抗原結合領域を含む結合アーム」という用語は、抗原結合領域を含む抗体分子または断片を意味する。したがって、結合アームは、例えば、６つのＶＨおよびＶＬ　ＣＤＲ配列、ＶＨおよびＶＬ配列、ＦａｂもしくはＦａｂ’断片、またはＦａｂアームを含むことができる。

【０３８５】

本明細書で使用される場合、文脈と矛盾しない限り、「Ｆｃ領域」という用語は、免疫グロブリンの重鎖の２つのＦｃ配列からなる抗体領域を指し、前記Ｆｃ配列は、少なくともヒンジ領域、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む。一実施形態では、本明細書で使用される「Ｆｃ領域」という用語は、抗体のＮ末端からＣ末端に向かう方向に、少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含む領域を指す。抗体のＦｃ領域は、免疫系の様々な細胞（エフェクタ細胞など）および補体系の成分を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【０３８６】

本開示の文脈において、多重特異性抗体を含む抗体に関して使用される「より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する」という用語は、抗体が、特にＩｇＧ　Ｆｃ受容体（ＦｃガンマＲ、ＦｃγＲ）結合、Ｃ１ｑ結合、ＡＤＣＣまたはＣＤＣのリストから選択されるＦｃ媒介エフェクタ機能を、（ｉ）特に前記抗体と同じ第１および第２の抗原結

合領域を含む同じＣＤＲ配列と、（ｉｉ）ヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖とを含むヒトＩｇＧ１抗体と比較して、より少ない程度で誘導することを意味する。

【０３８７】

Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、ＦｃγＲへの結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγＲを介したＦｃ媒介架橋の誘導によって測定され得る。

【０３８８】

本明細書で使用される「ヒンジ領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。したがって、例えば、ヒトＩｇＧ１抗体のヒンジ領域は、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ－ＵＳ Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，ｐｐ６６２，６８０，６８９（１９９１）に示されるようなＥＵナンバリングによるアミノ酸２１６～２３０に対応する。しかしながら、ヒンジ領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【０３８９】

本明細書で使用される「ＣＨ１領域」または「ＣＨ１ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のＣＨ１領域を指す。したがって、例えば、ヒトＩｇＧ１抗体のＣＨ１領域は、Ｋａｂａｔ（同上）に示されるようなＥＵナンバリングによるアミノ酸１１８～２１５に対応する。しかしながら、ＣＨ１領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【０３９０】

本明細書で使用される「ＣＨ２領域」または「ＣＨ２ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のＣＨ２領域を指す。したがって、例えば、ヒトＩｇＧ１抗体のＣＨ２領域は、Ｋａｂａｔ（同上）に示されるようなＥＵナンバリングによるアミノ酸２３１～３４０に対応する。しかしながら、ＣＨ２領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【０３９１】

本明細書で使用される「ＣＨ３領域」または「ＣＨ３ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のＣＨ３領域を指す。したがって、例えば、ヒトＩｇＧ１抗体のＣＨ３領域は、Ｋａｂａｔ（同上）に示されるようなＥＵナンバリングによるアミノ酸３４１～４４７に対応する。しかしながら、ＣＨ３領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【０３９２】

「一価抗体」という用語は、本開示の文脈において、抗体分子が抗原の単一分子に結合することができ、したがって抗原架橋ができないことを意味する。

【０３９３】

「ＥｐＣＡＭ抗体」または「抗ＥｐＣＡＭ抗体」は、抗原ＥｐＣＡＭに特異的に結合する上記の抗体である。

【０３９４】

「ＣＤ１３７抗体」または「抗ＣＤ１３７抗体」は、抗原ＣＤ１３７に特異的に結合する上記の抗体である。

【０３９５】

「ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体」または「抗ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体」は、２つの異なる抗原結合領域を含む二重特異性抗体であり、その１つは抗原ＥｐＣＡＭに特異的に結合し、もう１つは抗原ＣＤ１３７に特異的に結合する。

【０３９６】

本明細書で使用される（例えば、承認された参照製品／生物学的薬物の）「バイオシミラー」という用語は、（ａ）臨床的に不活性な成分のわずかな違いにもかかわらず、生物

学的製品が参照製品と非常に類似していることを示す分析試験；（ｂ）動物試験（毒性の評価を含む）；ならびに／または（ｃ）参照製品が承認され、使用が意図されており、承認が求められている１つ以上の適切な使用条件における安全性、純度および効力を実証するのに十分である（例えば、生物学的製品と参照製品との間に製品の安全性、純度および効力の点で臨床的に有意な差がない）１つ以上の臨床試験（免疫原性および薬物動態または薬力学の評価を含む）からのデータに基づいて、参照製品と類似している生物学的製品を指す。いくつかの実施形態では、バイオシミラー生物学的製品および参照製品は、提案されたラベル付けにおいて処方される、推奨される、または示唆される１つ以上の使用条件について同じ１つ以上の作用機序を利用するが、１つ以上の作用機序が参照製品について公知である範囲のみに限られる。いくつかの実施形態では、生物学的製品について提案されるラベル表示において処方される、推奨される、または示唆される１つ以上の使用条件は、参照製品について以前に承認されている。いくつかの実施形態では、生物学的製品の投与経路、剤形および／または強さは、参照製品のものと同じである。バイオシミラーは、例えば、市販の抗体と同じ一次アミノ酸配列を有する現在公知の抗体であり得るが、異なる細胞型において、または異なる生産、精製もしくは製剤方法によって作製され得る。

【０３９７】

本明細書で使用される場合、所定の抗原またはエピトープへの抗体の結合に関連して「結合する」または「結合することができる」という用語は、典型的には、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）を使用して決定した場合、または、例えば、抗原をリガンドとし、抗体を分析物として使用するＢＩＡｃｏｒｅ　３０００装置での表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）技術を使用して決定した場合、約10^{-7}Ｍ以下、例えば約10^{-8}Ｍ以下、例えば約10^{-9}Ｍ以下、約10^{-10}Ｍ以下、または約10^{-11}Ｍもしくはさらにそれ以下のK_Dに対応する親和性での結合である。抗体は、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、ＢＳＡ、カゼイン）への結合についてそのK_Dよりも少なくとも１０倍低い、例えば少なくとも１００倍低い、例えば少なくとも１，０００倍低い、例えば少なくとも１０，０００倍低い、例えば少なくとも１００，０００倍低いK_Dに対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性がより高い量は抗体のK_Dに依存するので、抗体のK_Dが非常に低い（すなわち、抗体が高度に特異的である）場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低い程度は、少なくとも１０，０００倍であり得る。

【０３９８】

本明細書で使用される「k_d」（秒$^{-1}$）という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指す。前記値は、k_{off}値とも呼ばれる。

【０３９９】

本明細書で使用される「K_D」（Ｍ）という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

【０４００】

２つの抗体は、それらが同じ抗原および同じエピトープに結合する場合、「同じ特異性」を有する。試験される抗体が特定の抗原結合抗体と同じエピトープを認識するかどうか、すなわち抗体が同じエピトープに結合するかどうかは、当業者に周知の様々な方法によって試験し得る。

【０４０１】

抗体間の競合は、クロスブロッキングアッセイによって検出することができる。例えば、競合ＥＬＩＳＡアッセイをクロスブロッキングアッセイとして使用し得る。例えば、標的抗原をマイクロタイタプレートのウェルに被覆し、抗原結合抗体および候補競合試験抗体を添加し得る。ウェル中の抗原に結合した抗原結合抗体の量は、同じエピトープへの結合について競合する候補競合試験抗体の結合能力と間接的に相関する。具体的には、同じエピトープに対する候補競合試験抗体の親和性が大きいほど、抗原被覆ウェルに結合する抗原結合抗体の量は少なくなる。ウェルに結合した抗原結合抗体の量は、抗体を検出可能

または測定可能な標識物質で標識することによって測定することができる。

【０４０２】

抗原への結合について別の抗体、例えば本明細書に記載の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体と競合する抗体、または別の抗体、例えば本明細書に記載の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体の抗原に対する特異性を有する抗体は、本明細書に記載の前記重鎖および／または軽鎖可変領域の変異体、例えば本明細書に記載のＣＤＲの修飾および／またはある程度の同一性を含む抗体であり得る。

【０４０３】

本明細書で使用される「単離された多重特異性抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない多重特異性抗体を指すことを意図する（例えば、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に特異的に結合する単離された二重特異性抗体は、ＥｐＣＡＭまたはＣＤ１３７に特異的に結合する単一特異性抗体を実質的に含まない）。

【０４０４】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【０４０５】

本明細書で使用される場合、「第１のＣＨ３領域と第２のＣＨ３領域との間のヘテロ二量体相互作用」という用語は、第１のＣＨ３／第２のＣＨ３ヘテロ二量体抗体における第１のＣＨ３領域と第２のＣＨ３領域との間の相互作用を指す。

【０４０６】

本明細書で使用される場合、「第１のＣＨ３領域および第２のＣＨ３領域のホモ二量体相互作用」という用語は、第１のＣＨ３／第１のＣＨ３ホモ二量体抗体中の第１のＣＨ３領域と別の第１のＣＨ３領域との間の相互作用、および第２のＣＨ３／第２のＣＨ３ホモ二量体抗体中の第２のＣＨ３領域と別の第２のＣＨ３領域との間の相互作用を指す。

【０４０７】

本明細書で使用される場合、「ホモ二量体抗体」という用語は、２つの第１のＦａｂアームまたは半分子を含む抗体を指し、前記Ｆａｂアームまたは半分子のアミノ酸配列は同じである。

【０４０８】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ二量体抗体」という用語は、第１および第２のＦａｂアームまたは半分子を含む抗体を指し、前記第１および第２のＦａｂアームまたは半分子のアミノ酸配列は異なる。特に、前記第１および第２のＦａｂアーム／半分子のＣＨ３領域、または抗原結合領域、またはＣＨ３領域および抗原結合領域は異なる。

【０４０９】

「還元条件」または「還元環境」という用語は、抗体のヒンジ領域内のシステイン残基などの基質が、酸化されるよりも還元される可能性がより高い状態または環境を指す。

【０４１０】

本開示はまた、実施例の二重特異性抗体のＶＬ領域、ＶＨ領域または１つ以上のＣＤＲの機能的変異体を含む多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体を記載する。二重特異性抗体に関連して使用されるＶＬ、ＶＨまたはＣＤＲの機能的変異体は、依然として、二重特異性抗体の各抗原結合領域が、親二重特異性抗体の親和性および／または特異性／選択性の少なくともかなりの割合（少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％以上）を保持することを可能にし、場合によっては、そのような二重特異性抗体は、親二重特異性抗体よりも大きな親和性、選択性および／または特異性に関連し得る。

【０４１１】

そのような機能的変異体は、典型的には、親二重特異性抗体に対して有意な配列同一性を保持する。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、相同性％＝同一位置の数／位置の

総数×１００）。２つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、例えば、ＰＡＭ１２０重み付け残基表、ギャップ長ペナルティ１２およびギャップペナルティ４を使用して、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれたＥ．Ｍｅｙｅｒｓ ａｎｄ Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ ４，１１－１７（１９８８）のアルゴリズムを用いて決定し得る。さらに、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４４－４５３（１９７０）アルゴリズムを用いて決定し得る。

【０４１２】

本開示の文脈では、特に指示されない限り、以下の表記を使用して突然変異を記載する：ｉ）所与の位置におけるアミノ酸の置換は、例えばＫ４０９Ｒと記載され、これは、タンパク質の４０９位のリジンのアルギニンによる置換を意味する；ならびにｉｉ）特定の変異体については、任意のアミノ酸残基を示すためのコードＸａａおよびＸを含む、特定の３文字または１文字コードが使用される。したがって、４０９位のリジンのアルギニンによる置換はＫ４０９Ｒと指定され、４０９位のリジンの任意のアミノ酸残基による置換はＫ４０９Ｘと指定される。４０９位におけるリジンの欠失の場合、これはＫ４０９＊によって示される。

【０４１３】

例示的な変異体には、主に保存的置換によって親配列のＶＨおよび／またはＶＬおよび／またはＣＤＲとは異なるものが含まれる；変異体中の例えば１２個、例えば１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個の置換は保存的アミノ酸残基置換である。

【０４１４】

本開示の文脈において、保存的置換は、表２および３に定義されるアミノ酸のクラス内の置換によって定義され得る。

【０４１５】

ＶＬ領域もしくはＶＨ領域などの本明細書に記載の抗体配列、またはＶＬ領域もしくはＶＨ領域などの本明細書に記載の抗体配列とある程度の相同性もしくは同一性を有する抗体配列の機能的変異体は、好ましくは非ＣＤＲ配列の修飾または変異を含むが、ＣＤＲ配列は、好ましくは不変のままである。

【０４１６】

本明細書で使用される「ＥｐＣＡＭ」という用語は、ＤＩＡＲ５、ＥＧＰ－２、ＥＧＰ３１４、ＥＧＰ４０、ＥＳＡ、ＨＮＰＣＣ８、ＫＳ１／４、ＫＳＡ、Ｍ４Ｓ１、ＭＩＣ１８、ＭＫ－１、ＴＡＣＳＴＤ１、ＴＲＯＰ１、ＢｅｒＥｐ４、ＭＯＣ－３１、Ｂｅｒ－Ｅｐ４とも呼ばれる上皮細胞接着分子を指す。ＥｐＣＡＭは、多くの異なる役割を有すると考えられており、細胞接着および癌において役割を果たすようである。一実施形態では、ＥｐＣＡＭは、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ１６４２２を有するヒトＥｐＣＡＭである。ヒトＥｐＣＡＭの配列も配列番号５９に示されている。配列番号５９のアミノ酸１～２３はヒトＥｐＣＡＭのシグナルペプチドに対応する；一方、配列番号５９のアミノ酸２４～２６５はヒトＥｐＣＡＭの細胞外ドメインに対応する；タンパク質の残りの部分、すなわち配列番号５９のアミノ酸２６６～２８８および２８９～３１４は、それぞれ膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインである。

【０４１７】

本明細書で使用される「ＣＤ１３７」という用語は、リガンドＴＮＦＳＦ９／４－１ＢＢＬの受容体である、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＲＳＦ９）とも呼ばれるＣＤ１３７（４－１ＢＢ）を指す。ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）は、Ｔ細胞活性化に関与すると考えられている。ＣＤ１３７の他の同義語には、４－１ＢＢリガンド受容体、ＣＤｗ１３７、Ｔ細胞抗原４－１ＢＢホモログおよびＴ細胞抗原ＩＬＡが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ０７０１１を有するヒトＣＤ１３７（４－１ＢＢ）である。ヒトＣＤ１３７の配列も配列番号３７に示されている。配列番号３７のアミノ酸１～２３はヒトＣＤ１３７のシグナルペプチドに対応する；一方、配列番号３７のアミノ酸２４

～１８６はヒトＣＤ１３７の細胞外ドメインに対応する；タンパク質の残りの部分、すなわち配列番号３７のアミノ酸１８７～２１３および２１４～２５５は、それぞれ膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインである。

【０４１８】

「治療サイクル」は、本明細書では、結合剤の薬力学に起因する結合剤の別個の投与量追加の効果の範囲内の期間、または言い換えれば、対象の身体が投与された結合剤から本質的に清浄化された後の期間として定義される。短い時間枠、例えば２～１２時間または同日などの２～２４数時間以内での複数回の少投与量は、より大きな単回投与量に等しい場合がある。

【０４１９】

本文脈において、「治療」、「治療する」または「治療介入」という用語は、疾患または障害などの状態と闘うことを目的とした対象の管理およびケアに関する。この用語は、対象が罹患している所与の状態に対するあらゆる範囲の治療、例えば、症状もしくは合併症を緩和するため、疾患、障害もしくは状態の進行を遅らせるため、症状および合併症を緩和もしくは軽減するため、ならびに／または疾患、障害もしくは状態を治癒もしくは排除するため、ならびに状態を予防するための、治療上有効な化合物の投与を含むことが意図されており、ここで、予防は、疾患、状態または障害と闘うことを目的とした個体の管理およびケアとして理解されるべきであり、症状または合併症の発症を防止するための活性化合物の投与を含む。一実施形態では、「治療」は、症状または疾患状態を緩和、改善、停止または根絶（治癒）することを目的とした本開示の治療活性抗体などの治療活性結合剤の有効量の投与を指す。

【０４２０】

本開示の結合剤による治療に対する応答ならびに治療に対する抵抗性、治療に対する不応答および／または治療からの再発は、固形腫瘍の効果判定基準；バージョン１．１（ＲＥＣＩＳＴ基準ｖ１．１）に従って決定され得る。

【０４２１】

「最良総合効果」は、治療開始から疾患の進行／再発までに記録された最良効果である（治療開始後に記録された最小測定値をＰＤの基準として使用する）。ＣＲまたはＰＲを有する対象は、客観的奏効であると考えられる。ＣＲ、ＰＲまたはＳＤを有する対象は、疾患制御状態にあると考えられる。ＮＥを有する対象は不応答者と見なされる。最良総合効果は、治療開始から疾患の進行／再発までに記録された最良効果である（治療開始後に記録された最小測定値をＰＤの基準として使用する）。ＣＲ、ＰＲまたはＳＤを有する対象は、疾患制御状態にあると考えられる。ＮＥを有する対象は不応答者と見なされる。

【０４２２】

「奏効持続期間（ＤＯＲ）」は、確認された最良総合効果がＣＲまたはＰＲである対象にのみ適用され、客観的腫瘍縮小効果（ＣＲまたはＰＲ）の最初の記録から最初のＰＤまたは根底にある癌による死亡の日付までの時間として定義される。

【０４２３】

「無増悪生存期間（ＰＦＳ）」は、サイクル１の１日目から、何らかの原因による最初に記録された進行または死亡までの日数として定義される。

【０４２４】

「全生存期間（ＯＳ）」は、サイクル１の１日目から何らかの原因による死亡までの日数として定義される。対象が死亡したことが知られていない場合、ＯＳは、対象が生存していることが知られている最新の日（カットオフ日またはその前）で打ち切られる。

【０４２５】

本開示の文脈において、「治療レジメン」という用語は、健康を改善および維持するように設計された構造化された治療計画を指す。

【０４２６】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、所望の治療結果を達成するのに必要な投与量および期間で有効な量を指す。多重特異性抗体またはモノクローナル抗体のような

抗体などの結合剤の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する結合剤の能力などの因子によって異なり得る。治療有効量はまた、結合剤またはその断片の何らかの毒性または有害作用を治療的に有益な作用が上回る量である。患者における反応が初期用量では不十分である場合、より高い用量（または異なる、より局所的な投与経路によって達成される効果的により高い用量）を使用し得る。ある用量で患者において望ましくない副作用が生じる場合、より低い用量（または異なるより局所的な投与経路によって達成される効果的により低い用量）が使用され得る。

【０４２７】

本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、異常に制御された細胞成長、増殖、分化、接着、および／または遊走を特徴とする疾患を含む。「癌細胞」とは、急速で制御されない細胞増殖によって成長し、新たな成長を開始させた刺激が停止した後も成長し続ける異常細胞を意味する。

【０４２８】

本開示による「癌」という用語は、癌転移も含む。「転移」とは、癌細胞がその元の部位から身体の別の部分に広がることを意味する。転移の形成は非常に複雑なプロセスであり、原発性腫瘍からの悪性細胞の分離、細胞外マトリックスの侵襲、体腔および脈管に進入するための内皮基底膜の貫通、次いで血液によって輸送された後、標的器官の浸潤に依存する。最後に、標的部位における新しい腫瘍、すなわち二次性腫瘍または転移性腫瘍の成長は、血管新生に依存する。腫瘍転移は、腫瘍細胞または成分が残存し、転移能を発現し得るので、原発性腫瘍の除去後でさえもしばしば起こる。一実施形態では、本開示による「転移」という用語は、原発性腫瘍および所属リンパ節系から離れた転移に関する「遠隔転移」に関する。

【０４２９】

本明細書で使用される「低減する」、「阻害する」、「干渉する」または「負に調節する」などの用語は、例えば、約５％以上、約１０％以上、約１５％以上、約２０％以上、約２５％以上、約３０％以上、約４０％以上、約５０％以上、または約７５％以上のレベルの全体的な減少を生じさせる能力を意味する。「阻害する」という用語または同様の語句は、完全なまたは本質的に完全な阻害、すなわちゼロへの減少または本質的にゼロへの減少を含む。

【０４３０】

一実施形態における「増加する」または「増強する」などの用語は、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約８０％、または少なくとも約１００％の増加または増強に関する。

【０４３１】

本明細書で使用される「生理学的ｐＨ」は、７．５または約７．５のｐＨを指す。

【０４３２】

本開示で使用される場合、「重量％」は、グラム（ｇ）での全組成物の総重量のパーセントとして表されるグラム（ｇ）での物質の量を測定する濃度の単位である、重量パーセントを指す。

【０４３３】

「凍結」という用語は、通常は熱の除去を伴う液体の凝固に関する。

【０４３４】

「凍結乾燥する」または「凍結乾燥」という用語は、物質を凍結し、次いで周囲の圧力を低下させて（例えば、１５Ｐａ未満、例えば１０Ｐａ未満、５Ｐａ未満、または１Ｐａ以下）、物質中の凍結媒体を固相から気相に直接昇華させることによる物質の凍結乾燥を指す。したがって、「凍結乾燥する」および「フリーズドライする」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【０４３５】

本開示の文脈における「組換え」という用語は、「遺伝子操作を介して作製された」こ

とを意味する。一実施形態では、本開示の文脈における「組換え物」は、天然には存在しない。

【０４３６】

本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、物体が自然界で見出され得るという事実を指す。例えば、生物（ウイルスを含む）中に存在し、自然界の供給源から単離することができ、実験室で人によって意図的に改変されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在する。「自然界で見出される」という用語は、「自然界に存在する」ことを意味し、公知の物体ならびに自然からまだ発見および／または単離されていないが、将来天然源から発見および／または単離される可能性がある物体を含む。

【０４３７】

本開示によれば、「ペプチド」という用語は、オリゴペプチドおよびポリペプチドを含み、ペプチド結合によって互いに連結された約２個以上、約３個以上、約４個以上、約６個以上、約８個以上、約１０個以上、約１３個以上、約１６個以上、約２０個以上、および最大約５０個、約１００個または約１５０個までの連続するアミノ酸を含む物質を指す。「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、特に少なくとも約１５１個のアミノ酸を有するペプチドを指すが、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では通常同義語として使用される。

【０４３８】

「治療用タンパク質」は、治療有効量で対象に提供された場合、対象の状態または病態に対してプラスのまたは有利な効果を及ぼす。一実施形態では、治療用タンパク質は、治癒特性または緩和特性を有し、疾患または障害の１つ以上の症状を改善する、緩和する、軽減する、逆転させる、発症を遅延させる、または重症度を軽減するために投与され得る。治療用タンパク質は、予防特性を有し得、疾患の発症を遅延させるために、またはそのような疾患もしくは病的状態の重症度を軽減するために使用され得る。「治療用タンパク質」という用語は、タンパク質またはペプチド全体を含み、それらの治療的に活性な断片も指すことができる。それはまた、タンパク質の治療的に活性な変異体を含み得る。治療的に活性なタンパク質の例としては、ワクチン接種のための抗原およびサイトカインなどの免疫賦活剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３９】

「部分」という用語は画分を指す。アミノ酸配列またはタンパク質などの特定の構造に関して、その「部分」という用語は、前記構造の連続または不連続な画分を指し得る。

【０４４０】

「部分」および「断片」という用語は、本明細書では互換的に使用され、連続する要素を指す。例えば、アミノ酸配列またはタンパク質などの構造の一部は、前記構造の連続する要素を指す。組成物に関連して使用される場合、「部分」という用語は、組成物の一部を意味する。例えば、組成物の一部は、前記組成物の０．１％～９９．９％（例えば０．１％、０．５％、１％、５％、１０％、５０％、９０％、または９９％）の任意の部分であり得る。

【０４４１】

アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）に関して、「断片」は、アミノ酸配列の一部、すなわちＮ末端および／またはＣ末端で短縮されたアミノ酸配列を表す配列に関する。Ｃ末端で短縮された断片（Ｎ末端断片）は、例えば、オープンリーディングフレームの３’末端を欠くトランケートされたオープンリーディングフレームの翻訳によって得ることができる。Ｎ末端で短縮された断片（Ｃ末端断片）は、例えば、トランケートされたオープンリーディングフレームが翻訳を開始するように働く開始コドンを含む限り、オープンリーディングフレームの５’末端を欠くトランケートされたオープンリーディングフレームの翻訳によって得ることができる。アミノ酸配列の断片は、例えば、アミノ酸配列からのアミノ酸残基の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％を含む。アミノ酸配列の断片は、好ましくは、アミノ酸配列からの少なくとも６個、特に少なくとも８個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少

なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも５０個、または少なくとも１００個の連続するアミノ酸を含む。

【０４４２】

本開示によれば、ペプチドまたはタンパク質の一部または断片は、好ましくは、それが由来するペプチドまたはタンパク質の少なくとも１つの機能的特性を有する。そのような機能的特性は、薬理学的活性、他のペプチドまたはタンパク質との相互作用、酵素活性、抗体との相互作用、および核酸の選択的結合を含む。例えば、ペプチドまたはタンパク質の薬理学的に活性な断片は、その断片が由来するペプチドまたはタンパク質の薬理学的活性の少なくとも１つを有する。ペプチドまたはタンパク質の一部または断片は、好ましくは、ペプチドまたはタンパク質の少なくとも６個、特に少なくとも８個、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも３０個または少なくとも５０個の連続するアミノ酸の配列を含む。ペプチドまたはタンパク質の一部または断片は、好ましくは、ペプチドまたはタンパク質の最大８個、特に最大１０個、最大１２個、最大１５個、最大２０個、最大３０個または最大５５個までの連続するアミノ酸の配列を含む。

【０４４３】

本明細書における「変異体」とは、少なくとも１つのアミノ酸修飾によって親アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を意味する。親アミノ酸配列は、天然もしくは野生型（ＷＴ）アミノ酸配列であり得るか、または野生型アミノ酸配列の改変形態であり得る。好ましくは、変異体アミノ酸配列は、親アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸修飾、例えば、親と比較して１～約２０個のアミノ酸修飾、好ましくは１～約１０個または１～約５個のアミノ酸修飾を有する。

【０４４４】

本明細書における「野生型」または「ＷＴ」または「天然」とは、対立遺伝子変異を含む、自然界で見出されるアミノ酸配列を意味する。野生型アミノ酸配列、ペプチドまたはタンパク質は、意図的に改変されていないアミノ酸配列を有する。

【０４４５】

好ましくは、所与のアミノ酸配列と前記所与のアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列との間の類似性、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約６０％、７０％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％である。類似性または同一性の程度は、好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または約１００％であるアミノ酸領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が２００個のアミノ酸からなる場合、類似性または同一性の程度は、好ましくは少なくとも約２０個、少なくとも約４０個、少なくとも約６０個、少なくとも約８０個、少なくとも約１００個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１８０個、または約２００個のアミノ酸、いくつかの実施形態では連続するアミノ酸について与えられる。いくつかの実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長について与えられる。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野で公知のツールを用いて、好ましくは最良の配列アラインメントを使用して、例えばＡｌｉｇｎを使用して、標準的な設定、好ましくはＥＭＢＯＳＳ：：ニードル、マトリックス：Ｂｌｏｓｕｍ６２、ギャップオープン１０．０、ギャップ伸長０．５を使用して行うことができる。

【０４４６】

「配列類似性」は、同一であるか、または保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸のパーセンテージを示す。２つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。２つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。

【０４４７】
「％同一」および「同一性％」という用語または同様の用語は、特に、比較される配列間の最適なアラインメントにおいて同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージを指すことが意図されている。前記パーセンテージは純粋に統計的であり、２つの配列間の差は、比較される配列の全長にわたってランダムに分布し得るが、必ずしもそうではない。２つの配列の比較は、通常、対応する配列の局所領域を同定するために、最適なアラインメント後に、セグメントまたは「比較ウィンドウ」に関して配列を比較することによって行われる。比較のための最適なアラインメントは、手動で、またはＳｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ａｄｓ Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２，４８２による局所相同性アルゴリズムを用いて、Ｎｅｄｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３による局所相同性アルゴリズムを用いて、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８，２４４４の類似性検索アルゴリズムを用いて、もしくは前記アルゴリズムを使用したコンピュータプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ Ｐ、ＢＬＡＳＴ ＮおよびＴＦＡＳＴＡ）を援用して行い得る。いくつかの実施形態では、２つの配列の同一性パーセントは、米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）（ＮＣＢＩ）のウェブサイト（例えば、ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）で入手可能なＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムを使用して決定される。いくつかの実施形態では、ＮＣＢＩウェブサイトのＢＬＡＳＴＮアルゴリズムに使用されるアルゴリズムパラメータは、以下を含む：（ｉ）１０に設定された期待閾値；（ｉｉ）２８に設定されたワードサイズ；（ｉｉｉ）０に設定されたクエリ範囲内の最大一致；（ｉｖ）１、－２に設定された一致／不一致スコア；（ｖ）線形に設定されたギャップコスト；および（ｖｉ）使用されている低複雑度領域のフィルタ。いくつかの実施形態では、ＮＣＢＩウェブサイトのＢＬＡＳＴＰアルゴリズムに使用されるアルゴリズムパラメータは、以下を含む：（ｉ）１０に設定された期待閾値；（ｉｉ）３に設定されたワードサイズ；（ｉｉｉ）０に設定されたクエリ範囲内の最大一致；（ｉｖ）ＢＬＯＳＵＭ６２に設定されたマトリックス；（ｖ）存在：１１、拡張：１に設定されたギャップコスト；および（ｖｉ）条件付き組成スコアマトリックス調整。

【０４４８】
同一性パーセントは、比較する配列が一致する同一の位置の数を決定し、この数を比較する位置の数（例えば、参照配列中の位置の数）で除して、この結果に１００を乗じることによって得られる。

【０４４９】
いくつかの実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または約１００％である領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が２００個のアミノ酸残基からなる場合、同一性の程度は、少なくとも約１００個、少なくとも約１２０個、少なくとも約１４０個、少なくとも約１６０個、少なくとも約１８０個、または約２００個のアミノ酸残基、いくつかの実施形態では連続するアミノ酸残基について与えられる。いくつかの実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照配列の全長について与えられる。

【０４５０】
相同なアミノ酸配列は、本開示によれば、アミノ酸残基の少なくとも４０％、特に少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、好ましくは少なくとも９５％、少なくとも９８または少なくとも９９％の同一性を示す。

【０４５１】
本明細書に記載のアミノ酸配列変異体は、例えば組換えＤＮＡ操作により、当業者によって容易に調製され得る。置換、付加、挿入または欠失を有するペプチドまたはタンパク質を調製するためのＤＮＡ配列の操作は、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）に詳細に記載されている。さらに、本明細書に記載のペプチドおよびアミノ酸変異体は、例えば固相合成および類似の方法などによる公知のペプチド合成技術を用いて容易に調製され得る。
【０４５２】
一実施形態では、アミノ酸配列（ペプチドまたはタンパク質）の断片または変異体は、好ましくは「機能的断片」または「機能的変異体」である。アミノ酸配列の「機能的断片」または「機能的変異体」という用語は、それが由来するアミノ酸配列のものと同一または類似の１つ以上の機能的特性を示す、すなわち機能的に等価である任意の断片または変異体に関する。結合剤に関して、１つの特定の機能は、断片または変異体が由来するアミノ酸配列によって示される１つ以上の結合活性である。本明細書で使用される「機能的断片」または「機能的変異体」という用語は、特に、親分子または配列のアミノ酸配列と比較して１つ以上のアミノ酸によって変化しており、かつ親分子または配列の機能の１つ以上を依然として果たす、例えば標的抗原に結合することができるアミノ酸配列を含む変異体分子または配列を指す。一実施形態では、親分子または配列のアミノ酸配列の改変は、分子または配列の特徴に有意に影響を及ぼさないかまたは変化させない。異なる実施形態では、機能的断片または機能的変異体の機能は低減され得るが、依然として有意に存在し得、例えば、機能的変異体の結合は、親分子または配列の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％であり得る。しかしながら、他の実施形態では、機能的断片または機能的変異体の機能は、親分子または配列と比較して増強され得る。
【０４５３】
指定されたアミノ酸配列（ペプチド、タンパク質またはポリペプチド）に「由来する」アミノ酸配列（ペプチド、タンパク質またはポリペプチド）は、最初のアミノ酸配列の起源を指す。好ましくは、特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、その特定の配列またはその断片と同一、本質的に同一または相同であるアミノ酸配列を有する。特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、その特定の配列の変異体またはその断片であり得る。例えば、本明細書で使用するための結合剤は、天然配列の望ましい活性を保持しながら、それらが由来する天然に存在する配列または天然配列と配列が異なるように改変され得ることが当業者に理解されるであろう。
【０４５４】
「単離された」は、天然状態から改変されたまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、または例えば宿主細胞などの非天然環境に存在し得る。一実施形態では、本明細書に記載の結合剤、例えば抗体は単離されている。本明細書で使用される「単離された結合剤」は、異なる抗原特異性を有する他の結合剤を実質的に含まない結合剤を指すことが意図されている。一実施形態では、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に特異的に結合する単離された二重特異性結合剤は、ＥｐＣＡＭまたはＣＤ１３７に特異的に結合する単一特異性抗体を実質的に含まない。好ましい実施形態では、本開示において使用される結合剤は、実質的に精製された形態である。
【０４５５】
「遺伝子改変」または単に「改変」という用語は、核酸による細胞のトランスフェクションを含む。「トランスフェクション」という用語は、細胞への核酸、特にＲＮＡの導入に関する。本開示の目的のために、「トランスフェクション」という用語はまた、細胞への核酸の導入またはそのような細胞による核酸の取り込みを含み、細胞は、対象、例えば

患者に存在し得る。したがって、本開示によれば、本明細書に記載の核酸のトランスフェクションのための細胞は、インビトロまたはインビボで存在することができ、例えば、細胞は患者の器官、組織および／または生物の一部を形成することができる。本開示によれば、トランスフェクションは一過性または安定であり得る。トランスフェクションのいくつかの用途では、トランスフェクトされた遺伝物質が一過性にのみ発現されれば十分である。ＲＮＡを細胞にトランスフェクトして、そのコードされたタンパク質を一過性に発現させることができる。トランスフェクションプロセスで導入された核酸は、通常、核ゲノムに組み込まれないので、外来核酸は有糸分裂によって希釈されるかまたは分解される。核酸のエピソーム増幅を可能にする細胞は、希釈率を大幅に低下させる。トランスフェクトされた核酸が実際に細胞およびその娘細胞のゲノムに残ることが望ましい場合は、安定なトランスフェクションが起こらなければならない。そのような安定なトランスフェクションは、トランスフェクションのためにウイルスベースのシステムまたはトランスポゾンベースのシステムを使用することによって達成することができる。一般に、抗原をコードする核酸は、細胞に一過性にトランスフェクトされる。ＲＮＡを細胞にトランスフェクトして、そのコードされたタンパク質を一過性に発現させることができる。

【０４５６】

本開示によれば、ペプチドまたはタンパク質の類似体は、それが由来する前記ペプチドまたはタンパク質の修飾形態であり、前記ペプチドまたはタンパク質の少なくとも１つの機能的特性を有する。例えば、ペプチドまたはタンパク質の薬理学的に活性な類似体は、その類似体が由来するペプチドまたはタンパク質の薬理学的活性の少なくとも１つを有する。そのような修飾には、任意の化学修飾が含まれ、炭水化物、脂質および／またはタンパク質もしくはペプチドなどのタンパク質またはペプチドに関連する任意の分子の単一または複数の置換、欠失および／または付加が含まれる。一実施形態では、タンパク質またはペプチドの「類似体」には、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、パルミトイル化、ミリストイル化、イソプレニル化、脂質化、アルキル化、誘導体化、保護基／ブロッキング基の導入、タンパク質分解切断、または抗体もしくは別の細胞リガンドへの結合から生じる修飾形態が含まれる。「類似体」という用語はまた、前記タンパク質およびペプチドの全ての機能的な化学的等価物に及ぶ。

【０４５７】

本明細書で使用される「活性化」または「刺激」は、検出可能な細胞増殖を誘導するのに十分に刺激されたＴ細胞などの免疫エフェクタ細胞の状態を指す。活性化はまた、シグナル伝達経路の開始、サイトカイン産生の誘導、および検出可能なエフェクタ機能に関連し得る。「活性化免疫エフェクタ細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂を受けている免疫エフェクタ細胞を指す。

【０４５８】

「プライミング」という用語は、Ｔ細胞などの免疫エフェクタ細胞がその特異的抗原と最初に接触し、エフェクタＴ細胞などのエフェクタ細胞への分化を引き起こすプロセスを指す。

【０４５９】

「クローン増殖」または「増殖」という用語は、特定の実体が増加するプロセスを指す。本開示の文脈において、この用語は、好ましくは、免疫エフェクタ細胞が抗原によって刺激され、増殖し、前記抗原を認識する特異的免疫エフェクタ細胞が増幅される免疫学的応答に関連して使用される。好ましくは、クローン増殖は免疫エフェクタ細胞の分化をもたらす。

【０４６０】

本開示による「抗原」は、抗体またはＴ細胞受容体に結合することができる任意の物質または分子構造を包含する。体内の抗原の存在は、免疫応答を誘発し得る。したがって、「抗原」は、免疫応答または免疫機構が向けられる任意の物質を包含する。これはまた、抗原が抗原ペプチドにプロセシングされ、特にＭＨＣ分子に関連して提示される場合、免疫応答または免疫機構が１つ以上の抗原ペプチドに向けられる状況を含む。特に、「抗原

」は、抗体またはＴリンパ球（Ｔ細胞）と特異的に反応する任意の物質、好ましくはペプチドまたはタンパク質に関する。本開示によれば、「抗原」という用語は、Ｔ細胞エピトープなどの少なくとも１つのエピトープを含有する任意の分子を含む。好ましくは、本開示の文脈における抗原は、任意でプロセシング後に、好ましくは抗原（抗原を発現する細胞を含む）に特異的な免疫反応を誘導する分子である。一実施形態では、抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、もしくは細菌抗原などの疾患関連抗原、またはそのような抗原に由来するエピトープである。

【０４６１】

「エピトープ」という用語は、抗原などの分子中の抗原決定基、すなわち免疫系によって認識される、例えば、特にＭＨＣ分子に関連して提示された場合に抗体、Ｔ細胞またはＢ細胞によって認識される分子の一部または断片を指す。一実施形態では、「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面グループからなり、通常、特定の三次元構造特性および特定の電荷特性を有する。立体配座エピトープおよび非立体配座エピトープは、変性溶媒の存在下では前者への結合が失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば特異的抗原結合ペプチドによって効果的にブロックされるまたは覆われるアミノ酸残基（言い換えれば、アミノ酸残基は特異的抗原結合ペプチドのフットプリント内にある）を含み得る。

【０４６２】

タンパク質のエピトープは、好ましくは前記タンパク質の連続部分または不連続部分を含み、好ましくは約５～約１００、好ましくは約５～約５０、より好ましくは約８～約３０、最も好ましくは約１０～約２５アミノ酸長であり、例えば、エピトープは、好ましくは９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５アミノ酸長であり得る。一実施形態では、本開示の文脈におけるエピトープは、Ｔ細胞エピトープである。

【０４６３】

本明細書で使用される「任意の」または「任意で」という用語は、続いて記載される事象、状況または状態が発生しても発生しなくてもよいこと、およびその記載が、前記事象、状況または状態が発生する場合と発生しない場合とを含むことを意味する。

【０４６４】

本明細書で使用される場合、「連結された」、「融合された」、または「融合」という用語は、互換的に使用される。これらの用語は、２つ以上の要素または成分またはドメインの結合を指す。

【０４６５】

「疾患」（本明細書では「障害」とも呼ばれる）という用語は、個体の身体に影響を及ぼす異常な状態を指す。疾患はしばしば、特定の症状および徴候に関連する医学的状態として解釈される。疾患は、感染症などの外部源に由来する因子によって引き起こされ得るか、または自己免疫疾患などの内部機能不全によって引き起こされ得る。ヒトでは、「疾患」はしばしば、罹患した個体に疼痛、機能不全、窮迫、社会的問題、もしくは死亡を引き起こす、または個体と接触するものに対して同様の問題を引き起こす状態を指すためにより広く使用される。このより広い意味では、疾患は時に、損傷、身体障害、障害、症候群、感染、孤立した症状、逸脱した挙動、ならびに構造および機能の非定型の変化を含む場合があるが、他の状況および他の目的では、これらは区別可能なカテゴリと見なされ得る。多くの疾患を患い、それらと共に生活することは、人生観および人格を変える可能性があるため、疾患は通常、身体的だけでなく感情的にも個体に影響を及ぼす。

【０４６６】

「治療的処置」という用語は、個体の健康状態を改善するおよび／または寿命を延長する（増加させる）任意の治療に関する。前記処置は、個体における疾患を排除し得る、個体における疾患の発症を停止もしくは遅延させ得る、個体における疾患の発症を阻害もし

くは遅延させ得る、個体における症状の頻度もしくは重症度を低下させ得る、および／または現在疾患を有しているかもしくは以前に有していたことがある個体における再発を減少させ得る。

【０４６７】

「予防的処置」または「予防処置」という用語は、個体において疾患が発生するのを予防することを意図した任意の治療に関する。「予防的処置」または「予防処置」という用語は、本明細書では互換的に使用される。同様に、腫瘍または癌の進行などの疾患の進行の文脈における「予防方法」という用語は、個体において疾患が進行するのを防ぐことを意図した任意の方法に関する。

【０４６８】

「個体」および「対象」という用語は、本明細書では互換的に使用される。それらは、ヒトもしくは別の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマもしくは霊長動物）、または鳥（ニワトリ）、魚もしくは疾患もしくは障害（例えば癌）に罹患し得るもしくは罹患しやすい任意の他の動物種を含む任意の他の非哺乳動物を指す。特に明記されない限り、「個体」および「対象」という用語は特定の年齢を示すものではなく、したがって成人、高齢者、小児、および新生児を包含する。本開示の実施形態では、「個体」または「対象」は「患者」である。

【０４６９】

「患者」という用語は、治療のための個体または対象、特に罹患個体または対象を意味する。

【０４７０】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、組換え生産された分子および化学合成された分子などのＤＮＡおよびＲＮＡを含むことが意図されている。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。ＲＮＡは、インビトロ転写されたＲＮＡ（ＩＶＴ　ＲＮＡ）または合成ＲＮＡを含む。

【０４７１】

核酸は、ベクターに含まれ得る。本明細書で使用される「ベクター」という用語は、プラスミドベクター、コスミドベクター、ラムダファージなどのファージベクター、レトロウイルス、アデノウイルスもしくはバキュロウイルスベクターなどのウイルスベクター、または細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）もしくはＰ１人工染色体（ＰＡＣ）などの人工染色体ベクターを含む、当業者に公知の任意のベクターを含む。前記ベクターは、発現ベクターおよびクローニングベクターを含む。発現ベクターは、プラスミドおよびウイルスベクターを含み、一般に、所望のコード配列および特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫もしくは哺乳動物）またはインビトロ発現系における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切なＤＮＡ配列を含む。クローニングベクターは、一般に、特定の所望のＤＮＡ断片を操作および増幅するために使用され、所望のＤＮＡ断片の発現に必要な機能的配列を欠いていてもよい。

【０４７２】

本開示の一実施形態では、核酸は、コードされたペプチドまたはタンパク質を提供するように処理された対象の細胞で発現される。一実施形態では、核酸は、対象の細胞において一過性に発現される。したがって、一実施形態では、核酸は細胞のゲノムに組み込まれない。一実施形態では、核酸はＲＮＡ、好ましくはインビトロ転写ＲＮＡである。

【０４７３】

本明細書に記載の核酸は、組換えおよび／または単離された分子であり得る。

【０４７４】

本開示では、「ＲＮＡ」という用語は、リボヌクレオチド残基を含む核酸分子に関する。好ましい実施形態では、ＲＮＡは、リボヌクレオチド残基の全部または大部分を含む。本明細書で使用される場合、「リボヌクレオチド」は、β－Ｄ－リボフラノシル基の２’位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを指す。ＲＮＡは、限定されないが、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、本質的に純粋

なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え生産されたＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変によって天然に存在するＲＮＡとは異なる修飾ＲＮＡを包含する。そのような改変は、内部ＲＮＡヌクレオチドへの、またはＲＮＡの末端（一方もしくは両方）への非ヌクレオチド物質の付加を指し得る。本明細書では、ＲＮＡ中のヌクレオチドが、化学合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドであり得ることも企図される。本開示では、これらの改変されたＲＮＡは、天然に存在するＲＮＡの類似体と見なされる。

【０４７５】

本開示の特定の実施形態では、ＲＮＡは、ペプチドまたはタンパク質をコードするＲＮＡ転写物に関連するメッセンジャＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。当技術分野で確立されているように、ｍＲＮＡは、一般に、５’非翻訳領域（５’－ＵＴＲ）、ペプチドコード領域および３’非翻訳領域（３’－ＵＴＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、インビトロ転写または化学合成によって生成される。一実施形態では、ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型を使用するインビトロ転写によって生成され、ＤＮＡは、デオキシリボヌクレオチドを含む核酸を指す。

【０４７６】

一実施形態では、ＲＮＡはインビトロ転写ＲＮＡ（ＩＶＴ－ＲＮＡ）であり、適切なＤＮＡ鋳型のインビトロ転写によって得られ得る。転写を制御するためのプロモータは、任意のＲＮＡポリメラーゼのための任意のプロモータであり得る。インビトロ転写のためのＤＮＡ鋳型は、核酸、特にｃＤＮＡをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクターに導入することによって得られ得る。ｃＤＮＡは、ＲＮＡの逆転写によって得られ得る。

【０４７７】

一実施形態では、本明細書に記載のＲＮＡは修飾ヌクレオシドを有し得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、少なくとも１つの（例えば全ての）ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ψ）、Ｎ１－メチル－プソイドウリジン（ｍ１ψ）、および５－メチル－ウリジン（ｍ５Ｕ）から独立して選択される。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ中の１つ以上のウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、３－メチル－ウリジン（m^3U）、５－メトキシ－ウリジン（mo^5U）、５－アザ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ウリジン（s^2U）、４－チオ－ウリジン（s^4U）、４－チオ－プソイドウリジン、２－チオ－プソイドウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン（ho^5U）、５－アミノアリル－ウリジン、５－ハロ－ウリジン（例えば５－ヨード－ウリジンまたは５－ブロモ－ウリジン）、ウリジン５－オキシ酢酸（cmo^5U）、ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル（$mcmo^5U$）、５－カルボキシメチル－ウリジン（cm^5U）、１－カルボキシメチル－プソイドウリジン、５－カルボキシヒドロキシメチル－ウリジン（chm^5U）、５－カルボキシヒドロキシメチル－ウリジンメチルエステル（$mchm^5U$）、５－メトキシカルボニルメチル－ウリジン（mcm^5U）、５－メトキシカルボニルメチル－２－チオ－ウリジン（mcm^5s^2U）、５－アミノメチル－２－チオ－ウリジン（nm^5s^2U）、５－メチルアミノメチル－ウリジン（mnm^5U）、１－エチル－プソイドウリジン、５－メチルアミノメチル－２－チオ－ウリジン（mnm^5s^2U）、５－メチルアミノメチル－２－セレノ－ウリジン（mnm^5se^2U）、５－カルバモイルメチル－ウリジン（ncm^5U）、５－カルボキシメチルアミノメチル－ウリジン（$cmnm^5U$）、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオ－ウリジン（$cmnm^5s^2U$）、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－プソイドウリジン、５－タウリノメチル－ウリジン（τm^5U）、１－タウリノメチルプソイドウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリ

ジン（τｍ５ｓ２Ｕ）、１－タウリノメチル－４－チオ－プソイドウリジン、５－メチル－２－チオ－ウリジン（ｍ^{5}ｓ^{2}Ｕ）、１－メチル－４－チオ－プソイドウリジン（ｍ^{1}ｓ^{4}ψ）、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、３－メチル－プソイドウリジン（ｍ^{3}ψ）、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、１－メチル－１－デアザプソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、ジヒドロウリジン（Ｄ）、ジヒドロプソイドウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、５－メチル－ジヒドロウリジン（ｍ^{5}Ｄ）、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－メトキシ－ウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン、４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジン、Ｎ１－メチル－プソイドウリジン、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン（ａｃｐ^{3}Ｕ）、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）プソイドウリジン（ａｃｐ^{3}ψ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）ウリジン（ｉｎｍ^{5}Ｕ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）－２－チオ－ウリジン（ｉｎｍ^{5}ｓ^{2}Ｕ）、α－チオ－ウリジン、２’－Ｏ－メチル－ウリジン（Ｕｍ）、５，２’－Ｏ－ジメチル－ウリジン（ｍ^{5}Ｕｍ）、２’－Ｏ－メチル－プソイドウリジン（Ψｍ）、２－チオ－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｓ^{2}Ｕｍ）、５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｍｃｍ^{5}Ｕｍ）、５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｎｃｍ^{5}Ｕｍ）、５－カルボキシメチルアミノメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｃｍｎｍ^{5}Ｕｍ）、３，２’－Ｏ－ジメチル－ウリジン（ｍ^{3}Ｕｍ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｉｎｍ^{5}Ｕｍ）、１－チオ－ウリジン、デオキシチミジン、２’－Ｆ－アラ－ウリジン、２’－Ｆ－ウリジン、２’－ＯＨ－アラ－ウリジン、５－（２－カルボメトキシビニル）ウリジン、５－［３－（１－Ｅ－プロペニルアミノ）ウリジン、または当技術分野で公知の任意の他の修飾ウリジンのいずれか１つ以上であり得る。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、本開示によるＲＮＡは５’キャップを含む。一実施形態では、本開示のＲＮＡは、キャップされていない５’－三リン酸を有しない。一実施形態では、ＲＮＡは、５’キャップ類似体によって修飾され得る。「５’キャップ」という用語は、ｍＲＮＡ分子の５’末端に見出される構造を指し、一般に、５’－５’三リン酸結合を介してｍＲＮＡに接続されたグアノシンヌクレオチドからなる。一実施形態では、このグアノシンは７位でメチル化されている。ＲＮＡに５’キャップまたは５’キャップ類似体を提供することは、５’キャップがＲＮＡ鎖に共転写的に発現されるインビトロ転写によって達成され得るか、またはキャッピング酵素を使用して転写後にＲＮＡに結合され得る。

【０４８１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、キャップ０、キャップ１、またはキャップ２を含む。本開示によれば、「キャップ０」という用語は、構造「ｍ^{7}ＧｐｐｐＮ」を意味し、Ｎは、２’位にＯＨ部分を有する任意のヌクレオシドである。本開示によれば、「キャップ１」という用語は、構造「ｍ^{7}ＧｐｐｐＮｍ」を意味し、Ｎｍは、２’位にOCH_3部分を有する任意のヌクレオシドである。本開示によれば、「キャップ２」という用語は、構造「ｍ^{7}ＧｐｐｐＮｍＮｍ」を意味し、各Ｎｍは、独立して、２’位にOCH_3部分を有する任意のヌクレオシドである。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、$m_2^{7,2'-O}$Ｇ（５’）ｐｐＳｐ（５’）Ｇ（特にそのＤ１ジアステレオマ）、$m_2^{7,3'-O}$Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、および$m_2^{7,3'-O}$Ｇｐｐｐ（$m_1^{2'-O}$ＡｐＧからなる群より選択される５’キャップ構造を含む。

【０４８３】

いくつかの実施形態では、本開示によるＲＮＡは、５’－ＵＴＲおよび／または３’－ＵＴＲを含む。「非翻訳領域」または「ＵＴＲ」という用語は、転写されるがアミノ酸配列に翻訳されないＤＮＡ分子内の領域、またはｍＲＮＡ分子などのＲＮＡ分子内の対応する領域に関する。非翻訳領域（ＵＴＲ）は、オープンリーディングフレームの５’側（上流）（５’－ＵＴＲ）および／またはオープンリーディングフレームの３’側（下流）（３’

－ＵＴＲ）に存在し得る。５’－ＵＴＲは、存在する場合、タンパク質コード領域の開始コドンの上流の５’末端に位置する。５’－ＵＴＲは５’キャップ（存在する場合）の下流にあり、例えば５’キャップに直接隣接している。３’－ＵＴＲは、存在する場合、タンパク質コード領域の終止コドンの下流の３’末端に位置するが、「３’－ＵＴＲ」という用語は、好ましくはポリ（Ａ）配列を含まない。したがって、３’－ＵＴＲはポリ（Ａ）配列（存在する場合）の上流にあり、例えばポリ（Ａ）配列に直接隣接している。

【０４８４】

いくつかの実施形態では、本開示によるＲＮＡは、３’－ポリ（Ａ）配列を含む。本明細書で使用される場合、「ポリ（Ａ）配列」または「ポリＡ尾部」という用語は、典型的にはＲＮＡ分子の３’末端に位置するアデニル酸残基の連続的または断続的な配列を指す。ポリ（Ａ）配列は当業者に公知であり、本明細書に記載のＲＮＡの３’ＵＴＲに後続し得る。ポリ（Ａ）配列は、任意の長さであり得る。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）配列は、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも４０個、少なくとも８０個、または少なくとも１００個、および最大５００個、最大４００個、最大３００個、最大２００個、または最大１５０個までのヌクレオチド、特に約１１０個のヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）配列はＡヌクレオチドのみからなる。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）配列は、本質的にＡヌクレオチドからなるが、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１６／００５３２４　Ａ１号に開示されているように、４つのヌクレオチド（Ａ、Ｃ、Ｇ、およびＵ）のランダムな配列によって中断されている。そのようなランダムな配列は、５～５０、１０～３０、または１０～２０ヌクレオチド長であり得る。本質的にｄＡヌクレオチドからなるが、４つのヌクレオチド（ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ、ｄＴ）が等しい分布を有し、例えば５～５０ヌクレオチドの長さを有するランダムな配列によって中断されているＤＮＡのコード鎖に存在するポリ（Ａ）カセットは、ＤＮＡレベルでは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）におけるプラスミドＤＮＡの一定な増殖を示し、ＲＮＡレベルでは、ＲＮＡの安定性と翻訳効率の支持に関して有益な特性と依然として関連している。いくつかの実施形態では、Ａヌクレオチド以外のヌクレオチドは、その３’末端でポリ（Ａ）配列に隣接していない、すなわち、ポリ（Ａ）配列は、その３’末端でマスクされていないか、またはＡ以外のヌクレオチドが後続していない。

【０４８５】

本開示の文脈において、「転写」という用語は、ＤＮＡ配列中の遺伝暗号がＲＮＡに転写されるプロセスに関する。その後、ＲＮＡはペプチドまたはタンパク質に翻訳され得る。

【０４８６】

「コードする」は、定義されたヌクレオチドの配列（すなわち、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡおよびｍＲＮＡ）または定義されたアミノ酸の配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、ｃＤＮＡ、またはｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性、およびそれから生じる生物学的特性を指す。したがって、ある遺伝子に対応するｍＲＮＡの転写および翻訳が細胞または他の生物系においてタンパク質を産生する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がｍＲＮＡ配列と同一であり、通常は配列表に提供されるコード鎖と、遺伝子またはｃＤＮＡの転写のための鋳型として使用される非コード鎖の両方が、その遺伝子またはｃＤＮＡのタンパク質または他の産物をコードすると呼ばれ得る。同様に、ＲＮＡの翻訳が細胞または他の生物系においてタンパク質を産生する場合、ｍＲＮＡなどのＲＮＡはタンパク質をコードする。

【０４８７】

ＲＮＡは、裸であってもよく、またはパッケージングされていてもよく、例えば、タンパク質および／または脂質粒子、例えば脂質ナノ粒子などの粒子に製剤化されていてもよい。

【０４８８】

本明細書で使用される場合、「内因性」は、生物、細胞、組織または系からの、またはそれらの内部で産生される任意の物質を指す。

【０４８９】

本明細書で使用される場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織または系から導入されるか、またはそれらの外部で産生される任意の物質を指す。

【０４９０】

本明細書で使用される「発現」という用語は、特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳として定義される。

【０４９１】

Ｆｃ領域は、そのＣ末端にリジンを有し得る。このリジンの起源は、これらのＦｃ領域が由来するヒトに見出される天然に存在する配列である。組換え抗体の細胞培養生産中、この末端リジンは、１つ以上の内因性カルボキシペプチダーゼによるタンパク質分解によって切断され、同じ配列を有するがＣ末端リジンを欠く定常領域をもたらすことができる。抗体の製造目的のために、この末端リジンをコードするＤＮＡは、抗体がリジンなしで産生されるように配列から省くことができる。例えば、ＣＨＯベースの産生系で産生された抗体を使用する場合、末端リジンのプロセシングの程度が典型的には高いため（Ｄｉｃｋ，Ｌ．Ｗ．ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．２００８；１００：１１３２－１１４３）、末端リジンをコードするか、またはコードしない核酸配列から産生された抗体は、配列および機能が実質的に同一である。したがって、抗体などの本発明によるタンパク質は、末端リジンをコードするまたは有するかどうかにかかわらず生成され得ることが理解される。

【０４９２】

本開示の態様および実施形態

ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤

第１の態様では、本開示は、ＥｐＣＡＭに結合する第１の結合領域と、ＣＤ１３７に結合する第２の結合領域とを含む結合剤を提供する。

【０４９３】

本発明の結合剤は、原則として、任意のアイソタイプの抗体であり得る。アイソタイプの選択は、典型的には、所望のＦｃ媒介エフェクタ機能、例えばＡＤＣＣ誘導、またはＦｃ媒介エフェクタ機能を欠く抗体（「不活性」抗体）の必要性によって導かれる。例示的なアイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４である。ヒト軽鎖定常領域カッパまたはラムダのいずれかを使用し得る。本明細書に記載の抗体のエフェクタ機能は、様々な治療用途のために、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ抗体へのアイソタイプスイッチングによって変化し得る。一実施形態では、本明細書に記載の両方の重鎖は、ＩｇＧ１アイソタイプ、例えばＩｇＧ１、κである。任意で、重鎖は、本明細書の他の箇所に記載されるように、ヒンジおよび／またはＣＨ３領域で修飾されていてもよい。

【０４９４】

好ましくは、抗原結合領域の各々は、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記可変領域は各々、３つのＣＤＲ配列、それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３、ならびに４つのフレームワーク配列、それぞれＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４を含む。さらに、好ましくは、抗体は、２つの重鎖定常領域（ＣＨ）および２つの軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。

【０４９５】

一実施形態では、結合剤は、全長ＩｇＧ１抗体などの全長抗体である。例えば、一実施形態では、結合剤、例えば二重特異性抗体は、それぞれが抗原結合領域を含む２つの半分子を含む。

【０４９６】

二重特異性抗体の多くの異なる形式および使用が当技術分野で公知であり、Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ；Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ　Ｔｏｄａｙ，２０１５　Ｊｕｌ；２０（７）：８

３８－４７および；ＭＡｂｓ，２０１２　Ｍａｒ－Ａｐｒ；４（２）：１８２－９７によって総説された。これらの形式は全て、本明細書に包含される。本開示による二重特異性抗体は、特定の二重特異性形式またはその作製方法に限定されない。

【０４９７】

本開示において使用され得る二重特異性抗体分子の例としては、（ｉ）異なる抗原結合領域を含む２つのアームを有する単一の抗体；（ｉｉ）例えば、余分なペプチドリンカーによってタンデムに連結された２つのｓｃＦｖを介して、２つの異なるエピトープに特異性を有する一本鎖抗体；（ｉｉｉ）各軽鎖および重鎖が短いペプチド結合を介してタンデムに２つの可変ドメインを含む二重可変ドメイン抗体（ＤＶＤ－Ｉｇ）（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　Ｄｕａｌ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｄｏｍａｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ（ＤＶＤ－Ｉｇ（商標））Ｍｏｌｅｃｕｌｅ，Ｉｎ：Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｂｅｒｌｉｎ　Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ（２０１０））；（ｉｖ）化学的に結合された二重特異性（Ｆａｂ’）２断片；（ｖ）標的抗原の各々に対して２つの結合部位を有する四価二重特異性抗体をもたらす２つの一本鎖ダイアボディの融合物であるＴａｎｄａｂ；（ｖｉ）多価分子をもたらすｓｃＦｖとダイアボディとの組合せであるフレキシボディ；（ｖｉｉ）Ｆａｂに適用されると、異なるＦａｂ断片に連結された２つの同一のＦａｂ断片からなる三価二重特異性結合タンパク質を生じ得る、プロテインキナーゼＡの「二量体化およびドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドックアンドロック」分子；（ｖｉｉｉ）例えば、ヒトＦａｂアームの両末端に融合した２つのｓｃＦｖを含む、いわゆるＳｃｏｒｐｉｏｎ分子；ならびに（ｉｘ）ダイアボディが挙げられる。

【０４９８】

一実施形態では、本明細書に記載の結合剤は、ダイアボディまたはクロスボディである。一実施形態では、結合剤は、制御されたＦａｂアーム交換を介して得られる二重特異性抗体である（例えば国際公開第２０１１１３１７４６号（Ｇｅｎｍａｂ）に記載されている）。

【０４９９】

異なるクラスの結合剤の例としては、（ｉ）ヘテロ二量体化を強いる相補的ＣＨ３ドメインを有するＩｇＧ様分子；（ｉｉ）組換えＩｇＧ様二重標的化分子であって、分子の両側がそれぞれ、少なくとも２つの異なる抗体のＦａｂ断片またはＦａｂ断片の一部を含む、組換えＩｇＧ様二重標的化分子；（ｉｉｉ）全長ＩｇＧ抗体が余分なＦａｂ断片またはＦａｂ断片の一部に融合しているＩｇＧ融合分子；（ｉｖ）一本鎖Ｆｖ分子または安定化ダイアボディが重鎖定常ドメイン、Ｆｃ領域またはその一部に融合しているＦｃ融合分子；（ｖ）異なるＦａｂ断片が一緒に融合し、重鎖定常ドメイン、Ｆｃ領域またはその一部に融合したＦａｂ融合分子；ならびに（ｖｉ）異なる一本鎖Ｆｖ分子または異なるダイアボディまたは異なる重鎖抗体（例えばドメイン抗体、ナノボディ）が、互いに融合しているかまたは重鎖定常ドメイン、Ｆｃ領域もしくはその一部に融合した別のタンパク質もしくは担体分子に融合しているＳｃＦｖベースおよびダイアボディベースの抗体ならびに重鎖抗体（例えばドメイン抗体、ナノボディ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５００】

相補的ＣＨ３ドメイン分子を有するＩｇＧ様分子の例としては、Ｔｒｉｏｍａｂ／Ｑｕａｄｒｏｍａ分子（Ｔｒｉｏｎ　Ｐｈａｒｍａ／Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ；Ｒｏｃｈｅ、国際公開第２０１１０６９１０４号）、いわゆるノブ・イントゥ・ホール分子（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、国際公開第９８５０４３１号）、Ｃｒｏｓｓ　ＭＡｂ（Ｒｏｃｈｅ、国際公開第２０１１１１７３２９号）および静電気的適合分子（Ａｍｇｅｎ、欧州特許第１８７０４５９号および国際公開第２００９０８９００４号；Ｃｈｕｇａｉ、米国特許出願第２０１０００１５５１３３号；Ｏｎｃｏｍｅｄ、国際公開第２０１０１２９３０４号）、ＬＵＺ－Ｙ分子（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｗｒａｎｉｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２０１２，２８７（５２）：４３３３１－９，ｄｏｉ：１０．１０７４／ｊｂｃ．Ｍ１１２．３９７８６９．Ｅｐｕｂ　２０１２　Ｎｏｖ　１）、ＤＩＧボディ

およびＰＩＧボディ分子（Ｐｈａｒｍａｂｃｉｎｅ、国際公開第２０１０１３４６６６号、国際公開第２０１４０８１２０２号）、鎖交換操作ドメインボディ（ＳＥＥＤｂｏｄｙ）分子（ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏ、国際公開第２００７１１０２０５号）、Ｂｉｃｌｏｎｉｃｓ分子（Ｍｅｒｕｓ、国際公開第２０１３１５７９５３号）、ＦｃΔＡｄｐ分子（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ、国際公開第２０１０１５７９２号）、二重特異性ＩｇＧ１およびＩｇＧ２分子（Ｐｆｉｚｅｒ／Ｒｉｎａｔ、国際公開第１１１４３５４５号）、Ａｚｙｍｅｔｒｉｃ足場分子（Ｚｙｍｅｗｏｒｋｓ／Ｍｅｒｃｋ、国際公開第２０１２０５８７６８号）、ｍＡｂ－Ｆｖ分子（Ｘｅｎｃｏｒ、国際公開第２０１１０２８９５２号）、二価二重特異性抗体（国際公開第２００９０８０２５４号）およびＤｕｏＢｏｄｙ（登録商標）分子（Ｇｅｎｍａｂ、国際公開第２０１１１３１７４６号）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０１】

組換えＩｇＧ様二重標標的化分子の例としては、二重標的化（ＤＴ）－Ｉｇ分子（国際公開第２００９０５８３８３号）、ツー・イン・ワン抗体（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ；Ｂｏｓｔｒｏｍ，ｅｔ　ａｌ　２００９．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２３，１６１０－１６１４）、架橋Ｍａｂ（Ｋａｒｍａｎｏｓ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ）、ｍＡｂ２（Ｆ－Ｓｔａｒ、国際公開第２００８００３１１６号）、Ｚｙｂｏｄｙ分子（Ｚｙｎｇｅｎｉａ；ＬａＦｌｅｕｒ　ｅｔ　ａｌ．ＭＡｂｓ．２０１３　Ｍａｒ－Ａｐｒ；５（２）：２０８－１８）、共通軽鎖を用いたアプローチ（Ｃｒｕｃｅｌｌ／Ｍｅｒｕｓ、米国特許第７，２６２，０２８号）、κλＢｏｄｉｅｓ（ＮｏｖＩｍｍｕｎｅ、国際公開第２０１２０２３０５３号）およびＣｏｖＸ－ｂｏｄｙ（ＣｏｖＸ／Ｐｆｉｚｅｒ；Ｄｏｐｐａｌａｐｕｄｉ，Ｖ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ　２００７．Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１７，５０１－５０６）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０２】

ＩｇＧ融合分子の例としては、二重可変ドメイン（ＤＶＤ）－Ｉｇ分子（Ａｂｂｏｔｔ、米国特許第７，６１２，１８１号）、二重ドメインダブルヘッド抗体（Ｕｎｉｌｅｖｅｒ；Ｓａｎｏｆｉ　Ａｖｅｎｔｉｓ、国際公開第２０１００２２６９２３号）、ＩｇＧ様二重特異性分子（ＩｍＣｌｏｎｅ／Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ、Ｌｅｗｉｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１４　Ｆｅｂ；３２（２）：１９１－８）、Ｔｓ２Ａｂ（ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ／ＡＺ；Ｄｉｍａｓｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．２００９　Ｏｃｔ　３０；３９３（３）：６７２－９２）およびＢｓＡｂ分子（Ｚｙｍｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、国際公開第２０１０１１１６２５号）、ＨＥＲＣＵＬＥＳ分子（Ｂｉｏｇｅｎ　Ｉｄｅｃ、米国特許出願第００７９５１９１８号）、ｓｃＦｖ融合分子（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ｓｃＦｖ融合分子（Ｃｈａｎｇｚｈｏｕ　Ａｄａｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、中国特許第１０２２５０２４６号）ならびにＴｖＡｂ分子（Ｒｏｃｈｅ、国際公開第２０１２０２５５２５号、国際公開第２０１２０２５５３０号）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０３】

Ｆｃ融合分子の例としては、ＳｃＦｖ／Ｆｃ融合物（Ｐｅａｒｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｉｎｔ．１９９７　Ｓｅｐ；４２（６）：１１７９－８８）、ＳＣＯＲＰＩＯＮ分子（Ｅｍｅｒｇｅｎｔ　ＢｉｏＳｏｌｕｔｉｏｎｓ／Ｔｒｕｂｉｏｎ、Ｂｌａｎｋｅｎｓｈｉｐ　ＪＷ，ｅｔ　ａｌ．ＡＡＣＲ　１００ｔｈ　Ａｎｎｕａｌ　ｍｅｅｔｉｎｇ　２００９（Ａｂｓｔｒａｃｔ　＃５４６５）；Ｚｙｍｏｇｅｎｅｔｉｃｓ／ＢＭＳ、国際公開第２０１０１１１６２５号）、二重親和性再標的化技術（Ｆｃ－ＤＡＲＴ）分子（ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓ、国際公開第２００８１５７３７９号、国際公開第２０１００８０５３８号）およびデュアル（ＳｃＦｖ）２－Ｆａｂ分子（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ－Ｃｈｉｎａ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０４】

Ｆａｂ融合二重特異性抗体の例としては、Ｆ（ａｂ）２分子（Ｍｅｄａｒｅｘ／ＡＭＧ

ＥＮ；Ｄｅｏ ｅｔ ａｌ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９８ Ｆｅｂ １５；１６０（４）：１６７７－８６）、デュアルアクションまたはＢｉｓ－Ｆａｂ分子（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｂｏｓｔｒｏｍ，ｅｔ ａｌ ２００９．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２３，１６１０－１６１４）、ドックアンドロック（ＤＮＬ）分子（ＩｍｍｕｎｏＭｅｄｉｃｓ、国際公開第２００３０７４５６９号、国際公開第２００５００４８０９号）、二価二重特異性分子（Ｂｉｏｔｅｃｎｏｌ、Ｓｃｈｏｏｎｊａｎｓ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００ Ｄｅｃ １５；１６５（１２）：７０５０－７）およびＦａｂ－Ｆｖ分子（ＵＣＢ－Ｃｅｌｌｔｅｃｈ、国際公開第２００９０４０５６２ Ａ１号）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０５】

ＳｃＦｖベース、ダイアボディベースおよびドメイン抗体の例としては、二重特異性Ｔ細胞誘導（ＢｉＴＥ）分子（Ｍｉｃｒｏｍｅｔ、国際公開第２００５０６１５４７号）、タンデムダイアボディ分子（ＴａｎｄＡｂ）（Ａｆｆｉｍｅｄ）Ｌｅ Ｇａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．２００４ Ａｐｒ；１７（４）：３５７－６６）、二重親和性再標的化技術（ＤＡＲＴ）分子（ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓ、国際公開第２００８１５７３７９号、国際公開第２０１００８０５３８号）、一本鎖ダイアボディ分子（Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．１９９８ Ａｐｒ ３；４２５（３）：４７９－８４）、ＴＣＲ様抗体（ＡＩＴ、ＲｅｃｅｐｔｏｒＬｏｇｉｃｓ）、ヒト血清アルブミンＳｃＦｖ融合物（Ｍｅｒｒｉｍａｃｋ、国際公開第２０１００５９３１５号）およびＣＯＭＢＯＤＹ分子（Ｅｐｉｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２０１０ Ａｕｇ；８８（６）：６６７－７５）、二重標的化ナノボディ（Ａｂｌｙｎｘ，Ｈｍｉｌａ ｅｔ ａｌ．，ＦＡＳＥＢ Ｊ．２０１０）および二重標的化重鎖のみドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０６】

一態様では、本開示の二重特異性抗体は、第１のＣＨ３領域を含む第１のＦｃ配列と、第２のＣＨ３領域を含む第２のＦｃ配列とを含み、第１および第２のＣＨ３領域の配列は異なっており、前記第１および第２のＣＨ３領域間のヘテロ二量体相互作用が前記第１および第２のＣＨ３領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強いものである。これらの相互作用およびそれらがどのようにして達成され得るかについてのさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１１１３１７４６号および国際公開第２０１３０６０８６７号（Ｇｅｎｍａｂ）に提供されている。

【０５０７】

本明細書にさらに記載されるように、安定な二重特異性ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体は、ＣＨ３領域にわずかな保存的非対称突然変異のみを含有する１つのホモ二量体出発ＥｐＣＡＭ抗体および１つのホモ二量体出発ＣＤ１３７抗体に基づく特定の方法を使用して高収率で得ることができる。非対称突然変異は、前記第１および第２のＣＨ３領域の配列が非同一位置にアミノ酸置換を含むことを意味する。

【０５０８】

一実施形態では、本明細書に開示される実施形態のいずれかで定義される二重特異性抗体は、ヒトＩｇＧ１重鎖において、３６６、３６８、３７０、３９９、４０５、４０７および４０９からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する第１のＣＨ３領域と、ヒトＩｇＧ１重鎖において、３６６、３６８、３７０、３９９、４０５、４０７および４０９からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する第２のＣＨ３領域とを含み、第１および第２のＣＨ３領域は同じ位置で置換されていない。

【０５０９】

一実施形態では、本明細書に開示される実施形態のいずれかで定義される二重特異性抗体は、非対称突然変異、すなわち２つのＣＨ３領域の異なる位置における突然変異、例えばＣＨ３領域の一方の４０５位における突然変異および他方のＣＨ３領域の４０９位における突然変異を含む前記第１および第２のＣＨ３領域の配列を含む。一実施形態では、４

０５位の変異はＦ４０５Ｌである。一実施形態では、４０９位の変異はＫ４０９Ｒである。

【０５１０】

一実施形態では、二重特異性抗体は第１および第２の重鎖を含み、前記第１および第２の重鎖の各々は少なくともヒンジ領域、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含み、（ｉ）ヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖ではＬであり、ヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖ではＲであるか、または（ｉｉ）ヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖ではＲであり、ヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖ではＬである。

【０５１１】

ハイブリッドハイブリドーマ法および化学的コンジュゲーション法（Ｍａｒｖｉｎ ａｎｄ Ｚｈｕ（２００５）Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｉｎ ２６：６４９）などの従来の方法を、本明細書に記載の二重特異性抗体の調製に使用することができる。異なる重鎖および軽鎖からなる２つの抗体の宿主細胞における共発現は、所望の二重特異性抗体に加えて可能な抗体産物の混合物をもたらし、これは、その後、例えばアフィニティクロマトグラフィまたは同様の方法によって単離することができる。

【０５１２】

異なる抗体構築物の共発現時の機能的二重特異性産物の形成を促進する戦略、例えばＬｉｎｄｈｏｆｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９５ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５５：２１９）によって記載されている方法も使用することができる。異なる抗体を産生するラットおよびマウスハイブリドーマの融合は、選択的な種限定的重鎖／軽鎖対合のために、限られた数のヘテロ二量体タンパク質をもたらす。ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成を促進するための別の戦略は、「ノブ・イントゥ・ホール」戦略であり、この戦略では、第１の重鎖ポリペプチド上および第２の重鎖ポリペプチド中の対応する空洞に突起が導入され、その結果、突起は、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げるように、これらの２つの重鎖の界面の空洞内に配置され得る。「突起」は、第１のポリペプチドの境界面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖で置き換えることによって構築される。大きなアミノ酸側鎖を小さい側鎖で置き換えることによって、突起と同一または類似のサイズの代償的な「空洞」が第２のポリペプチドの境界面に作り出される（米国特許第５，７３１，１６８号）。欧州特許第１８７０４５９号（Ｃｈｕｇａｉ）および国際公開第２００９０８９００４号（Ａｍｇｅｎ）は、宿主細胞における異なる抗体ドメインの共発現時にヘテロ二量体形成を促進するための他の戦略を記載している。これらの方法では、ホモ二量体形成が静電的に好ましくなく、ヘテロ二量体化が静電的に好ましいように、両方のＣＨ３ドメインのＣＨ３－ＣＨ３境界面を構成する１つ以上の残基が荷電アミノ酸で置換される。国際公開第２００７１１０２０５号（Ｍｅｒｃｋ）は、ＩｇＡ ＣＨ３ドメインとＩｇＧ ＣＨ３ドメインとの間の違いを利用してヘテロ二量体化を促進する、さらに別の戦略を記載している。

【０５１３】

二重特異性抗体を産生するための別のインビトロ方法が国際公開第２００８１１９３５３号（Ｇｅｎｍａｂ）に記載されており、この方法では、二重特異性抗体は、還元条件下でのインキュベーションの際に、２つの単一特異性ＩｇＧ４またはＩｇＧ４様抗体間の「Ｆａｂアーム」または「半分子」交換（重鎖および結合した軽鎖の交換）によって形成される。得られる産物は、異なる配列を含み得る２つのＦａｂアームを有する二重特異性抗体である。

【０５１４】

本開示の二重特異性ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体を調製するための好ましい方法には、国際公開第２０１１１３１７４６号および国際公開第２０１３０６０８６７号（Ｇｅｎｍａｂ）に記載される方法であって、以下の工程：

ａ）Ｆｃ領域を含む第１の抗体を提供する工程であって、前記Ｆｃ領域が第１のＣＨ３

領域を含む、工程、
ｂ）第２のＦｃ領域を含む第２の抗体を提供する工程であって、前記Ｆｃ領域が第２のＣＨ３領域を含み、ここで、第１の抗体がＥｐＣＡＭ抗体であり、第２の抗体がＣＤ１３７抗体であるか、またはその逆であり、
前記第１および第２のＣＨ３領域の配列が異なり、前記第１および第２のＣＨ３領域の間のヘテロ二量体相互作用が前記第１および第２のＣＨ３領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強い、工程、
ｃ）還元条件下で前記第１の抗体を前記第２の抗体と共にインキュベートする工程、ならびに
ｄ）前記二重特異性ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体を得る工程
を含む方法が含まれる。
【０５１５】
同様に、本開示による抗体を作製するための方法であって、
ａ）本明細書で定義されるヒトＥｐＣＡＭに結合することができる抗原結合領域を含む第１の抗体を産生する宿主細胞を培養し、培養物から前記第１の抗体を精製する工程、
ｂ）本明細書で定義されるヒトにＣＤ１３７結合することができる抗原結合領域を含む第２の抗体を産生する宿主細胞を培養し、培養物から前記第２の抗体を精製する工程、
ｃ）ヒンジ領域内のシステインがジスルフィド結合異性化を受けるのを可能にするのに十分な還元条件下で前記第１の抗体を前記第２の抗体と共にインキュベートする工程、および
ｄ）前記二重特異性抗体を得る工程
を含む方法が提供される。
【０５１６】
本開示の一実施形態では、前記第１の抗体を前記第２の抗体と共に、ヒンジ領域内のシステインがジスルフィド結合異性化を受けるのを可能にするのに十分な還元条件下でインキュベートし、ここで、得られたヘテロ二量体抗体における前記第１の抗体と第２の抗体との間のヘテロ二量体相互作用は、３７℃で２４時間後に０．５ｍＭのＧＳＨでＦａｂアーム交換が起こらないものである。
【０５１７】
理論に拘束されるものではないが、工程ｃ）において、親抗体のヒンジ領域内の重鎖ジスルフィド結合が還元され、次いで、得られたシステインは、別の親抗体分子（元々は異なる特異性を有する）のシステイン残基と重鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。この方法の一実施形態では、工程ｃ）における還元条件は、還元剤、例えば２－メルカプトエチルアミン（２－ＭＥＡ）、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、ジチオエリトリトール（ＤＴＥ）、グルタチオン、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、Ｌ－システインおよびβ－メルカプトエタノールからなる群より選択される還元剤、好ましくは２－メルカプトエチルアミン、ジチオトレイトールおよびトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンからなる群より選択される還元剤の添加を含む。さらなる実施形態では、工程ｃ）は、例えば還元剤の除去によって、例えば脱塩によって、非還元性または低還元性になるように条件を回復させることを含む。
【０５１８】
上記のように、一実施形態では、ホモ二量体出発抗体の第１および第２のＣＨ３領域の配列は異なり、前記第１および第２のＣＨ３領域の間のヘテロ二量体相互作用が前記第１および第２のＣＨ３領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強いものである。これらの相互作用およびそれらがどのように達成され得るかについてのさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１１１３１７４６号および国際公開第２０１３０６０８６７号（Ｇｅｎｍａｂ）に提供されている。
【０５１９】
特に、安定な二重特異性ＥｐＣＡＭｘＣＤ１３７抗体は、上記の方法を使用して、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７にそれぞれ結合し、ＣＨ３領域にわずかな非対称突然変異のみを

含む２つのホモ二量体出発抗体に基づいて高収率で得ることができる。非対称突然変異は、前記第１および第２のＣＨ３領域の配列が非同一位置にアミノ酸置換を含むことを意味する。

【０５２０】

いくつかの実施形態では、本開示による結合剤は、抗原結合領域に加えて、２つの重鎖のＦｃ配列からなるＦｃ領域を含む。

【０５２１】

第１および第２のＦｃ配列は、それぞれ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含むがこれらに限定されない任意のアイソタイプのものであり得、１つ以上の突然変異または修飾を含み得る。一実施形態では、第１および第２のＦｃ配列の各々は、ＩｇＧ１アイソタイプのものであるかまたはＩｇＧ１アイソタイプに由来し、任意で１つ以上の突然変異または修飾を有する。一実施形態では、第１および第２のＦｃ配列の各々は、ＩｇＧ４アイソタイプのものであるかまたはＩｇＧ４アイソタイプに由来し、任意で１つ以上の突然変異または修飾を有する。別の実施形態では、Ｆｃ配列の一方はＩｇＧ１アイソタイプのものであり、他方はＩｇＧ４アイソタイプのものであるか、またはそのようなそれぞれのアイソタイプに由来し、任意で１つ以上の突然変異または修飾を有する。

【０５２２】

一実施形態では、一方または両方のＦｃ配列がエフェクタ機能欠損である。例えば、１つ以上のＦｃ配列は、ＩｇＧ１アイソタイプまたは非ＩｇＧ１アイソタイプ、例えば、ＡＤＣＣなどのエフェクタ機能を媒介する能力が低減または排除されるように変異したＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４のものであり得る。

【０５２３】

本明細書で使用される「エフェクタ機能」という用語は、例えば、腫瘍細胞などの疾患細胞の死滅、または腫瘍の播種および転移の阻害を含む腫瘍成長の阻害および／もしくは腫瘍発生の阻害をもたらす免疫系の成分によって媒介される任意の機能を含む。好ましくは、本開示の文脈におけるエフェクタ機能は、Ｔ細胞媒介エフェクタ機能である。そのような機能は、ＡＤＣＣ、ＡＤＣＰまたはＣＤＣを含む。

【０５２４】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）は、細胞傷害性顆粒の内容物の放出または細胞死誘導分子の発現を特徴とする、非食作用プロセスを介した細胞傷害性エフェクタ細胞による抗体被覆標的細胞の死滅である。ＡＤＣＣは、同様に標的を溶解するが他の細胞を必要としない免疫補体系とは無関係である。ＡＤＣＣは、標的結合抗体（ＩｇＧまたはＩｇＡまたはＩｇＥクラスに属する）と、免疫グロブリン（Ｉｇ）のＦｃ領域に結合するエフェクタ細胞表面上に存在する糖タンパク質である特定のＦｃ受容体（ＦｃＲ）との相互作用によって引き起こされる。ＡＤＣＣを媒介するエフェクタ細胞には、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球および樹状細胞が含まれる。ＡＤＣＣは、その有効性が多くのパラメータ（標的細胞の表面上の抗原の密度および安定性；抗体親和性およびＦｃＲ結合親和性）に依存する迅速なエフェクタ機構である。治療用抗体に最も使用されているＩｇＧサブクラスであるヒトＩｇＧ１が関与するＡＤＣＣは、そのＦｃ部分のグリコシル化プロファイルおよびＦｃγ受容体の多型に高度に依存する。

【０５２５】

抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）

ＡＤＣＰは、多くの抗体療法の重要な作用機序の１つである。これは、抗体が、そのＦｃドメインを食細胞上の特異的受容体に接続し、食作用を誘発することによって、結合した標的を排除する高度に調節されたプロセスとして定義される。ＡＤＣＣとは異なり、ＡＤＣＰは、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩおよびＦｃγＲＩＩＩａを介して、単球、マクロファージ、好中球および樹状細胞によって媒介され得、そのうちのマクロファージ上のＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）が主要な経路である。

【０５２６】
補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）
ＣＤＣは、抗体によって指示され得る別の細胞死滅方法である。ＩｇＭは、補体活性化のための最も有効なアイソタイプである。ＩｇＧ１およびＩｇＧ３も、両方とも古典的補体活性化経路を介してＣＤＣを誘導するのに非常に有効である。好ましくは、このカスケードにおいて、抗原－抗体複合体の形成は、ＩｇＧ分子などの関与する抗体分子の$C_{H}2$ドメイン上のごく近接した複数のＣ１ｑ結合部位の露出をもたらす（Ｃ１ｑは補体Ｃ１の３つのサブコンポーネントの１つである）。好ましくは、これらの露出されたＣ１ｑ結合部位は、それまでの低親和性のＣ１ｑ－ＩｇＧ相互作用を高アビディティのものに変換し、これは、一連の他の補体タンパク質を含む事象のカスケードを誘発し、エフェクタ細胞走化性／活性化物質Ｃ３ａおよびＣ５ａのタンパク質分解性放出をもたらす。好ましくは、補体カスケードは膜侵襲複合体の形成で終了し、これは、細胞内および細胞外への水および溶質の自由な通過を促進する細胞膜の孔を作り出す。
【０５２７】
本明細書に記載される抗体は、Ｆｃ領域における改変を含み得る。抗体は、そのような改変を含む場合、不活性または非活性化抗体になり得る。本明細書で使用される「不活性」、「不活性の」または「非活性化」という用語は、少なくとも、いかなるＦｃγ受容体にも結合することができず、ＦｃＲのＦｃ媒介架橋を誘導することができず、または個々の抗体の２つのＦｃ領域を介して標的抗原のＦｃＲ媒介架橋を誘導することができず、またはＣ１ｑに結合することができないＦｃ領域を指す。ヒト化またはキメラＥｐＣＡＭまたはＣＤ１３７抗体のＦｃ領域の不活性は、単一特異性形式の抗体を使用して有利に試験される。
【０５２８】
治療用抗体の開発のために、抗体のＦｃ領域をＦｃγ（ガンマ）受容体およびＣ１ｑとの相互作用に対して不活性にするためにいくつかの変異体を構築することができる。そのような変異体の例を本明細書で説明する。
【０５２９】
したがって、本明細書に記載される抗体の一実施形態では、前記抗体は第１および第２の重鎖を含み、一方または両方の重鎖は、改変されていない第１および第２の重鎖を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。前記Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃＲのＦｃ媒介架橋の誘導によって決定することによって測定され得る。
【０５３０】
別のそのような実施形態では、重鎖定常配列および軽鎖定常配列は、前記抗体へのＣ１ｑの結合が非修飾抗体と比較して少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように修飾されており、Ｃ１ｑ結合はＥＬＩＳＡによって決定される。
【０５３１】
したがって、Ｃ１ｑおよびｆｃγ受容体との相互作用において支配的な役割を果たすＦｃ領域のアミノ酸は、改変され得る。
【０５３２】
例えばＩｇＧ１アイソタイプ抗体において改変され得るアミノ酸位置の例としては、位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｇ２３６、Ｄ２６５およびＰ３３１が挙げられる。Ｌ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｄ２６５ＡまたはＬ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｇ２３６Ｒなどのそれらの組合せは、ヒトＣＤ６４、ＣＤ３２、ＣＤ１６およびＣ１ｑへの結合の著しい減少を引き起こし得る。
【０５３３】
Ｌ２３４ＦおよびＬ２３５Ｅアミノ酸置換は、Ｆｃγ受容体およびＣ１ｑとの相互作用が消失したＦｃ領域をもたらし得る（Ｃａｎｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，Ｊ．

Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．（１７３）：１４８３－９１；Ｄｕｎｃａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ（３３２）：７３８－４０）。したがって、一実施形態では、Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦおよびＥであり得る。Ｄ２６５ＡまたはＧ２３６Ｒアミノ酸置換は、全てのＦｃγ受容体への結合を減少させ、ＡＤＣＣを防止することができる（Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２７６）：６５９１－６０４；Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０２１，ＰｌｏＳ　ｏｎｅ（１６（１２））ｅ０２６０９５４）。したがって、一実施形態では、Ｄ２６５に対応する位置のアミノ酸はＡであり得、またはＧ２３６に対応する位置のアミノ酸はＲであり得る。

【０５３４】

本開示の一実施形態では、前記第１および第２の重鎖の両方において、ヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦおよびＥである。

【０５３５】

一実施形態では、前記第１および第２の重鎖の一方または両方において、ヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＤ２６５に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦ、Ｅ、およびＡである。

【０５３６】

一実施形態では、前記第１および第２の重鎖の一方または両方において、ヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＧ２３６に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである。

【０５３７】

Ｌ２３４Ｆ－Ｌ２３５Ｅ－Ｄ２６５Ａ非活性化変異（本明細書ではＦＥＡまたはＦＥＡフォーマットとも呼ばれる）は、優れた安全性プロファイルおよびＦｃ媒介エフェクタ機能を強く抑制する能力を有することが示されている。それにもかかわらず、ＦＥＡ変異を有する補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の強力な誘導物質であるＩｇＧ１抗体は、いくらかの残存ＣＤＣを示し得ることが観察された。さらに、ＦＥＡフォーマットを有する組換え発現された抗体は、野生型ＩｇＧ１　Ｆｃ領域と比較して、それらのＮ－グリカンのさらなるプロセシングの結果としてグリコシル化不均一性の増加を示し得ることが観察され、これらの抗体はまた、低ｐＨ条件によって誘導される凝集に対してより感受性であることが示された。一方、突然変異Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５ＥおよびＧ２３６ＲがＩｇＧ１抗体において組み合わされた場合（本明細書ではＦＥＲまたはＦＥＲフォーマットとも呼ばれる）、これは、潜在的な残存ＣＤＣ活性を回避し、野生型様グリコシル化を提供し、低ｐＨ条件に対する改善された耐性を有することができる改善された不活性フォーマットをもたらした。それにより、ＦＥＲフォーマットは、臨床開発および臨床使用によく適した非常に有利な非活性化抗体フォーマットである。二重特異性抗体の場合、このＦＥＲ不活性フォーマットはまた、不活性フォーマット置換に関してヘテロ二量体フォーマットで組み合わされてもよく、例えば、二重特異性抗体は、不活性フォーマット置換を有する一方の鎖から構成されてもよく、他方の鎖は、異なる不活性フォーマット置換、例えばＦＥＡを含んでもよい。したがって、ＦＥＲ不活性フォーマットは、例えば、臨床用途のための開発を既に受けている既存の候補抗体と、必要とされる全てのアッセイを再設計および再実行する必要なしに組み合わせるのに十分に適しており、それにより、制御されたＦａｂアーム交換などの技術を利用して、それと共に二重特異性抗体を迅速に生成することを可能にする。

【０５３８】

特に好ましい実施形態では、前記第１および第２の重鎖の一方において、ヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＤ２６５に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦ、Ｅ、およびＡであり、前記第１および第２の重鎖の他方において、ヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＧ２３６に対応する位置のアミノ酸は、それぞれＦ、Ｅ、およびＲである。

【０５３９】
本開示のさらなる特に好ましい実施形態では、結合剤は、第１および第２の重鎖を含む二重特異性抗体であり、ここで、第１の重鎖および第２の重鎖の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置はそれぞれＦおよびＥであり、ならびに（ｉ）第１の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０５４０】
さらなる特に好ましい実施形態では、結合剤は、第１および第２の重鎖を含む二重特異性抗体であり、ここで、
（１）第１の重鎖および第２の重鎖の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＡであるか、
（２）第１の重鎖および第２の重鎖の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または
（３）第１の重鎖および第２の重鎖の一方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置はそれぞれＦ、ＥおよびＡであり、第１の重鎖および第２の重鎖の他方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置はそれぞれＦ、ＥおよびＲであり、ならびに
（ｉ）第１の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。
【０５４１】
３つのアミノ酸置換Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５ＥおよびＤ２６５Ａの組合せを有し、さらにＫ４０９ＲまたはＦ４０５Ｌ変異を有する抗体変異体は、本明細書ではそれぞれ接尾辞「ＦＥＡＲ」または「ＦＥＡＬ」を付けて呼ばれる。
【０５４２】
３つのアミノ酸置換Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５ＥおよびＧ２３６Ｒの組合せを有し、さらにＫ４０９ＲまたはＦ４０５Ｌ変異を有する抗体変異体は、本明細書ではそれぞれ接尾辞「ＦＥＲＲ」または「ＦＥＲＬ」を付けて呼ばれる。
【０５４３】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体は、
（ｉ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＦＥＡＬに由来する半分子抗体およびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－ＦＥＡＲに由来する半分子抗体、
（ｉｉ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＦＥＡＲに由来する半分子抗体およびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－ＦＥＡＬに由来する半分子抗体、
（ｉｉｉ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＦＥＲＬに由来する半分子抗体およびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－ＦＥＡＲに由来する半分子抗体、または
（ｉｖ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＦＥＡＲに由来する半分子抗体およびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－ＦＥＲＬに由来する半分子抗体
を含む。
【０５４４】
さらなる実施形態では、本明細書に記載の結合剤または抗体は、サイトカイン、免疫抑制剤、免疫刺激分子および／または放射性同位体などの１つ以上の治療部分に連結または

複合体化される。そのような複合体は、本明細書では「免疫複合体」または「薬物複合体」と呼ばれる。１つ以上の細胞毒素を含む免疫複合体は、「免疫毒素」と呼ばれる。

【０５４５】

一実施形態では、第１および／または第２のＦｃ配列は、薬物もしくはプロドラッグに複合体化されるか、またはそのアクセプタ基を含む。そのようなアクセプタ基は、例えば非天然アミノ酸であり得る。

【０５４６】

ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤の一実施形態では、ＥｐＣＡＭは、ヒトＥｐＣＡＭ、特に配列番号５９に示される配列を含むヒトＥｐＣＡＭである。ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤の一実施形態では、ＣＤ１３７は、ヒトＣＤ１３７、特に配列番号６２に示される配列を含むヒトＣＤ１３７である。一実施形態では、ＥｐＣＡＭはヒトＥｐＣＡＭであり、ＣＤ１３７はヒトＣＤ１３７である。一実施形態では、ＥｐＣＡＭは、配列番号５９に示される配列を含むヒトＥｐＣＡＭであり、ＣＤ１３７は、配列番号６２に示される配列を含むヒトＣＤ１３７である。

【０５４７】

結合剤の一実施形態では、

ａ）ヒトＥｐＣＡＭに結合する第１の結合領域は、配列番号１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み；ならびに

ｂ）ヒトＣＤ１３７に結合する第２の結合領域は、配列番号１１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０５４８】

結合剤の一実施形態では、

ａ）ヒトＥｐＣＡＭに結合する第１の結合領域は、それぞれ配列番号２、３および４に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、それぞれ配列番号６、７および８に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含み；ならびに

ｂ）ヒトＣＤ１３７に結合する第２の結合領域は、それぞれ配列番号１２、１３および１４に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、それぞれ配列番号１６、１７および１８に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０５４９】

結合剤の一実施形態では、

ａ）ヒトＥｐＣＡＭに結合する第１の結合領域は、配列番号１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域とを含み；ならびに

ｂ）ヒトＣＤ１３７に結合する第２の結合領域は、配列番号１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域とを含む。

【０５５０】

結合剤の一実施形態では、

ａ）ヒトＥｐＣＡＭに結合する第１の結合領域は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域とを含み；ならびに

ｂ）ヒトＣＤ１３７に結合する第２の結合領域は、配列番号１１に示されるアミノ酸配

列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域とを含む。

【０５５１】

結合剤は、特に、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体などの抗体であり得る。また、結合剤は、全長抗体または抗体断片の形式であってもよい。

【０５５２】

結合剤は、ヒト抗体またはヒト化抗体であることがさらに好ましい。

【０５５３】

各可変領域は、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）ならびに４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含み得る。

【０５５４】

相補性決定領域（ＣＤＲ）およびフレームワーク領域（ＦＲ）は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置され得る：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【０５５５】

一実施形態では、結合剤は、

ｉ）第１の重鎖可変領域（ＶＨ）（前記第１の結合領域のＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）第２の重鎖可変領域（ＶＨ）（前記第２の結合領域のＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド

とを含む。

【０５５６】

一実施形態では、結合剤は、

ｉ）第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）（前記第１結合領域のＶＬ）を含み、第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）をさらに含むポリペプチドと、

ｉｉ）第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）（前記第２の結合領域のＶＬ）を含み、第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）をさらに含むポリペプチド

とを含む。

【０５５７】

一実施形態では、結合剤は、第１の結合アームと第２の結合アームとを含む抗体であり、ここで、第１の結合アームは、

ｉ）前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｉ）前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および前記第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含み；ならびに

第２の結合アームは、

ｉｉｉ）前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチドと、

ｉｖ）前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および前記第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド

とを含む。

【０５５８】

一実施形態では、結合剤は、ｉ）ＥｐＣＡＭに結合することができる前記抗原結合領域を含む第１の重鎖および軽鎖であって、第１の重鎖が第１の重鎖定常領域を含み、第１の軽鎖が第１の軽鎖定常領域を含む、第１の重鎖および軽鎖と、ｉｉ）ＣＤ１３７に結合することができる前記抗原結合領域を含む第２の重鎖および軽鎖であって、第２の重鎖が第２の重鎖定常領域を含み、第２の軽鎖が第２の軽鎖定常領域を含む、第２の重鎖および軽鎖とを含む。

【０５５９】

第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々は、定常重鎖１（ＣＨ１）領域、ヒンジ領域、定常重鎖２（ＣＨ２）領域および定常重鎖３（ＣＨ３）領域のうちの１つ以上、好ましくは少なくともヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含み得る。

【０５６０】

第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々はＣＨ３領域を含み得、２つのＣＨ３領域は非対称突然変異を含む。非対称突然変異は、前記第１および第２のＣＨ３領域の配列が非同一位置にアミノ酸置換を含むことを意味する。例えば、前記第１および第２のＣＨ３領域の一方は、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の４０５位に対応する位置に変異を含み、前記第１および第２のＣＨ３領域の他方は、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の４０９位に対応する位置に変異を含む。

【０５６１】

前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されていてもよく、前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）において、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＴ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｄ３９９、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも１つが置換されていてもよい。特定の実施形態では、第１および第２の重鎖は同じ位置で置換されていない（すなわち、第１および第２の重鎖は非対称突然変異を含む）。

【０５６２】

結合剤の一実施形態では、（ｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）のＬであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）のＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置のアミノ酸は前記第１の重鎖のＲであり、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置のアミノ酸は前記第２の重鎖のＬである。

【０５６３】

一実施形態では、結合剤は、同じ第１および第２の抗原結合領域ならびにヒトＩｇＧ１ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域を含む２つの重鎖定常領域（ＣＨ）を含む別の抗体と比較して、より少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導する。

【０５６４】

結合剤の１つの特定の実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）は、改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がより少ない程度でＦｃ媒介エフェクタ機能を誘導するように改変されている。特に、前記改変されていない第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の各々または両方は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を含み得るか、それからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。

【０５６５】

Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｆｃγ受容体への結合剤の結合、Ｃ１ｑへの結合、またはＦｃγ受容体のＦｃ媒介架橋の誘導を測定することによって決定され得る。特に、Ｆｃ媒介エフェクタ機能は、Ｃ１ｑへの結合剤の結合を測定することによって決定され得る。

【０５６６】

結合剤の第１および第２の重鎖定常領域は、前記抗体へのＣ１ｑの結合が野生型抗体と比較して減少する、好ましくは少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％減少するように改変されていてもよく、Ｃ１ｑ結合は、好ましくはＥＬＩＳＡによって決定される。

【０５６７】

結合剤の一実施形態では、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）の少なくとも１つにおいて、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｇ２３６、Ｄ２６５、Ｎ２９７およびＰ３３１に対応する位置の１つ以上のアミノ酸は、それ

ぞれＬ、Ｌ、Ｇ、Ｄ、ＮおよびＰではない。

【０５６８】

結合剤の一実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥであり得る。

【０５６９】

特に、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり得、ならびに／またはＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および／もしくは第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり得る。一実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＨＣ）の一方ではそれぞれＦ、ＥおよびＲであり得、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＨＣ）の他方ではそれぞれＦ、ＥおよびＡであり得る。一実施形態では、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、前記第１の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＲであり得、ＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、前記第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、ＥおよびＡであり得る。

【０５７０】

結合剤の一実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置は、それぞれＦおよびＥであり、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【０５７１】

結合剤の一実施形態では、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＡであり、第１および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＲであるか、または第１および第２の重鎖定常領域の一方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＤ２６５に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＡであり、第１および第２の重鎖定常領域の他方のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５およびＧ２３６に対応する位置は、それぞれＦ、ＥおよびＲであり、ここで、（ｉ）第１の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬであり、第２の重鎖定常領域のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであるか、または（ｉｉ）第１の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＫ４０９に対応する位置はＲであり、第２の重鎖のＥＵナンバリングによるヒトＩｇＧ１重鎖のＦ４０５に対応する位置はＬである。

【０５７２】

一実施形態では、結合剤は、カッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。

【０５７３】

一実施形態では、結合剤は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。

【０５７４】

結合剤の一実施形態では、第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラ

ムダ（λ）軽鎖定常領域である。
【０５７５】
結合剤の一実施形態では、第２の軽鎖定常領域は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である。
【０５７６】
結合剤の一実施形態では、第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。結合剤の一実施形態では、第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域である。結合剤の一実施形態では、第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域であり、第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であり、第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。
【０５７７】
一実施形態では、結合剤（特に抗体）は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプのものである。特に、結合剤は全長ＩｇＧ１抗体であり得る。好ましい実施形態では、結合剤（特に抗体）は、ＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプのものである。
【０５７８】
ＥｐＣＡＭおよびＣＤ１３７に結合する結合剤の使用
本明細書に開示される結合剤は、腫瘍または癌の治療に使用され得る。一実施形態では、腫瘍または癌は、ＥｐＣＡＭを発現する腫瘍または癌である。一実施形態では、ＥｐＣＡＭは、ヒトＥｐＣＡＭ、特に配列番号５９に示される配列を含むヒトＥｐＣＡＭである。
【０５７９】
本開示に従って治療される対象は、好ましくはヒト対象である。
【０５８０】
好ましい一実施形態では、治療される腫瘍または癌は、固形腫瘍または癌である。腫瘍または癌は、転移性腫瘍または癌であり得る。
【０５８１】
好ましくは、腫瘍または癌は、黒色腫、卵巣癌、肺癌（例えば非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ））、結腸直腸癌、頭頸部癌、胃癌、乳癌、腎癌、尿路上皮癌、膀胱癌、食道癌、膵臓癌、肝臓癌、胸腺腫および胸腺癌、脳癌、神経膠腫、副腎皮質癌、甲状腺癌、他の皮膚癌、肉腫、多発性骨髄腫、白血病、リンパ腫、骨髄異形成症候群、子宮内膜癌、前立腺癌、陰茎癌、子宮頸癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、メルケル細胞癌および中皮腫からなる群より選択され得る。より好ましくは、腫瘍または癌は、黒色腫、肺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、および頭頸部癌からなる群より選択される。
【０５８２】
特定の実施形態では、腫瘍または癌は、肺癌（例えば非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、尿路上皮癌（膀胱、尿管、尿道または腎盂の癌）、子宮内膜癌（ＥＣ）、乳癌（例えばトリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））、頭頸部扁平上皮癌（ＳＣＣＨＮ）（例えば口腔、咽頭または喉頭の癌）および子宮頸癌からなる群より選択される。
【０５８３】
いくつかの実施形態では、各用量および／または各治療サイクルにおいて投与される結合剤の量は、
約０．３～５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約２５～４００ｍｇ；および／または
約２．１×１０$^{-9}$～３．４×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約１．７×１０$^{-7}$～２．７×１０$^{-6}$ｍｏｌ
である。
【０５８４】
これらの実施形態によれば、ｍｇ／ｋｇで定義される用量は、結合剤が投与される対象

の体重の中央値が８０ｋｇであることに基づいて固定用量に変換されてもよく、その逆もまた同様である。

【０５８５】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．３～４．０ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約２５～３２０ｍｇ；および／または

約２．１×１０$^{-9}$～２．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約１．７×１０$^{-7}$～２．２×１０$^{-6}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５８６】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．３８～４．０ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約３０～３２０ｍｇ；および／または

約２．６×１０$^{-9}$～２．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約２．４×１０$^{-7}$～２．２×１０$^{-6}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５８７】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．５～３．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約４０～２６０ｍｇ；および／または

約３．４×１０$^{-9}$～２．２×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約２．７×１０$^{-7}$～１．８×１０$^{-6}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５８８】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．６～２．５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約５０～２００ｍｇ；および／または

約４．３×１０$^{-9}$～１．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約３．４×１０$^{-7}$～１．４×１０$^{-6}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５８９】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．８～１．８ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約６０～１４０ｍｇ；および／または

約５．１×１０$^{-9}$～１．２×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約４．１×１０$^{-7}$～９．５×１０$^{-7}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５９０】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．９～１．８ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約７０～１４０ｍｇ；および／または

約６．０×１０$^{-9}$～１．２×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約４．８×１０$^{-7}$～９．５×１０$^{-7}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５９１】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約１～１．５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約８０～１２０ｍｇ；および／または

約６．８×１０$^{-9}$～１．０×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約５．５×１０$^{-7}$～８．２×１０$^{-7}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５９２】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約１．１～１．４ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約９０～１１０ｍｇ；および／または

約７．７×１０$^{-9}$～９．４×１０$^{-9}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約６．１×１０$^{-7}$～７．５×１０$^{-7}$ｍｏｌ

であり得る。

【０５９３】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約１．２～１．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約９５～１０５ｍｇ；および／または
約６．８×１０$^{-9}$～８．９×１０$^{-9}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約６．５×１０$^{-7}$～７．２×１０$^{-7}$ｍｏｌ
であり得る。
【０５９４】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０，８～１．５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約６５～１２０ｍｇ；および／または
約５．５×１０$^{-9}$～１．０×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約４．４×１０$^{-7}$～８．２×１０$^{-7}$ｍｏｌ
であり得る。
【０５９５】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、約０．９～１．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計で約７０～１００ｍｇ；および／または
約６．０×１０$^{-9}$～８．５×１０$^{-9}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約４．８×１０$^{-7}$～６．８×１０$^{-7}$ｍｏｌ
であり得る。
【０５９６】
約０．９～１．１ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約７５～９０ｍｇ；および／または
約６．４×１０$^{-9}$～７．７×１０$^{-9}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約５．１×１０$^{-7}$～６．１×１０$^{-7}$ｍｏｌ。
【０５９７】
さらに、各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．３～４．０ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計２５～３２０ｍｇ；および／または
２．１×１０$^{-9}$～２．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計１．７×１０$^{-7}$～２．２×１０$^{-6}$ｍｏｌ
であり得る。
【０５９８】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．３８～４．０ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計３０～３２０ｍｇ；および／または
２．６×１０$^{-9}$～２．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計２．４×１０$^{-7}$～２．２×１０$^{-6}$ｍｏｌ
であり得る。
【０５９９】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．５～３．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計４０～２６０ｍｇ；および／または
３．４×１０$^{-9}$～２．２×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計２．７×１０$^{-7}$～１．８×１０$^{-6}$ｍｏｌ
であり得る。
【０６００】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．６～２．５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計５０～２００ｍｇ；および／または
４．３×１０$^{-9}$～１．７×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計３．４×１０$^{-7}$～１．４×１０$^{-6}$ｍｏｌ
であり得る。
【０６０１】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．８～１．８ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計６０～１４０ｍｇ；および／または
５．１×１０$^{-9}$～１．２×１０$^{-8}$ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計４．１×１０$^{-7}$

～９．５×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０２】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．９～１．８ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計７０～１４０ｍｇ；および／または
６．０×１０－９～１．２×１０－８ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計４．８×１０－７～９．５×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０３】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、１～１．５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計８０～１２０ｍｇ；および／または
６．８×１０－９～１．０×１０－８ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計５．５×１０－７～８．２×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０４】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、１．１～１．４ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計９０～１１０ｍｇ；および／または
７．７×１０－９～９．４×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計６．１×１０－７～７．５×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０５】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、１．２～１．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計９５～１０５ｍｇおよび／または
６．８×１０－９～８．９×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計６．５×１０－７～７．２×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０６】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０，８～１．５ｍｇ／ｋｇ体重または合計６５～１２０ｍｇ；および／または
５．５×１０－９～１．０×１０－８ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計４．４×１０－７～８．２×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０７】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．９～１．３ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計７０～１００ｍｇ；および／または
６．０×１０－９～８．５×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計４．８×１０－７～６．８×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０８】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、特に、０．９～１．１ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計７５～９０ｍｇ；および／または
６．４×１０－９～７．７×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計５．１×１０－７～６．１×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６０９】
各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、約１．１ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約８０ｍｇ；および／または
約６．８×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約５．５×１０－７ｍｏｌ
であり得る。
【０６１０】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、１．１ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計８０ｍｇ；および／または
６．８×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計５．５×１０－７ｍｏｌ
であり得る。

【０６１１】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、
約１．２５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計約１００ｍｇ；および／または
約８．５×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計約６．８×１０－７ｍｏｌ
であることが現在好ましい。

【０６１２】

各用量および／または各治療サイクルで投与される結合剤の量は、
１．２５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは合計１００ｍｇ；および／または
８．５×１０－９ｍｏｌ／ｋｇ体重もしくは合計６．８×１０－７ｍｏｌ
であることが同様に好ましい。

【０６１３】

結合剤は、当技術分野で公知の任意の方法および任意の経路によって投与され得る。好ましい実施形態では、結合剤は、全身的に、例えば非経口的に、特に静脈内に投与される。

【０６１４】

結合剤は、本明細書に記載の任意の適切な医薬組成物の形態で投与され得る。好ましい実施形態では、結合剤は注入の形態で投与される。

【０６１５】

結合剤は、静脈内（ＩＶ）注入を使用することによって、例えば最小３０分間にわたる、例えば最小６０分間にわたる静脈内注入によって、例えば３０～１２０分間にわたる静脈内注入を使用することによって投与され得る。好ましくは、結合剤は、３０分間にわたる静脈内（ＩＶ）注入を使用することによって投与される。

【０６１６】

本明細書に記載の結合剤は、それ自体で、または結合剤をコードする核酸の形態で投与され得る。

【０６１７】

結合剤または結合剤をコードする核酸は、任意の適切な形態で（例えば、そのまま裸で、または結合剤もしくは核酸を含む適切な粒子の形態でパッケージングされて）投与され得る。しかし、結合剤または核酸は、本明細書に記載の任意の適切な医薬組成物の形態で投与されることが好ましい。

【０６１８】

結合剤は、１つ以上のさらなる治療薬と共に同時投与され得る。いくつかの実施形態では、１つ以上のさらなる治療薬は、１つ以上の化学療法剤、特に、本明細書に記載されるような腫瘍または癌の治療において一般的に使用される化学療法剤を含む。例えば、１つ以上の化学療法剤には、白金系化合物（例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン）、タキサン系化合物（例えば、パクリタキセルおよびｎａｂ－パクリタキセル）、ヌクレオシド類似体（例えば、５－フルオロウラシルおよびゲムシタビン）、およびそれらの組合せ（例えば、シスプラチン／カルボプラチン＋５－フルオロウラシルまたはｎａｂ－パクリタキセル＋ゲムシタビン）が含まれる。

【０６１９】

組成物または医薬組成物は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，１９ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９９５に開示されているような従来の技術に従って、担体、賦形剤および／または希釈剤、ならびに公知のアジュバントを含む医薬組成物に適した任意の他の成分と共に製剤化され得る。薬学的に許容される担体または希釈剤、ならびに任意の公知のアジュバントおよび賦形

剤は、結合剤および／または核酸および／または、存在する場合、１つ以上のさらなる治療薬および選択された投与方法に適しているべきである。医薬組成物の担体および他の成分の適合性は、選択された化合物または医薬組成物の所望の生物学的特性に対する有意な悪影響がないことに基づいて決定される。

【０６２０】

組成物、特に医薬組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、界面活性剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ－２０もしくはＴｗｅｅｎ－８０などの非イオン性界面活性剤）、安定剤（例えば、糖もしくはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、可溶化剤、および／または医薬組成物に含めるのに適した他の物質を含み得る。

【０６２１】

本開示の医薬組成物は、１つ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤および／または希釈剤を含み得る。治療的使用のための薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤は、製薬分野で周知であり、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．（Ａ．Ｒ Ｇｅｎｎａｒｏ ｅｄｉｔ．１９８５）に記載されている。

【０６２２】

医薬担体、賦形剤または希釈剤は、意図される投与経路および標準的な製薬慣行に関して選択することができる。

【０６２３】

「担体」という用語は、医薬組成物の投与を容易にする、増強する、または可能にするために活性成分が組み合わされる、天然、合成、有機、無機であり得る成分を指す。本明細書で使用される担体は、対象への投与に適した１つ以上の適合性の固体または液体充填剤、希釈剤または封入物質であり得る。適切な担体には、限定されないが、滅菌水、リンゲル、乳酸リンゲル、滅菌塩化ナトリウム溶液、等張食塩水、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレンおよび特に生体適合性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレンコポリマーが含まれる。一実施形態では、本開示の医薬組成物は等張食塩水を含む。

【０６２４】

（医薬）組成物に使用され得る適切な水性および非水性担体の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、オリーブ油、トウモロコシ油、落花生油、綿実油およびゴマ油などの植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル、ならびに／または様々な緩衝液が挙げられる。他の担体は、製薬技術分野において周知である。

【０６２５】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、（医薬）組成物におけるその使用が企図される。

【０６２６】

本明細書で使用される「賦形剤」という用語は、本開示の（医薬）組成物中に存在し得るが、活性成分ではない物質を指す。賦形剤の例としては、限定されないが、担体、結合剤、希釈剤、潤滑剤、増粘剤、界面活性剤、防腐剤、安定剤、乳化剤、緩衝剤、香味剤または着色剤が挙げられる。

【０６２７】

「希釈剤」という用語は、希釈するおよび／または希薄にする薬剤に関する。さらに、「希釈剤」という用語は、流体、液体または固体の懸濁液および／または混合媒体のいずれか１つ以上を含む。適切な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロールおよび水が挙げられる。

【０６２８】
本開示の医薬組成物に使用するための適切な防腐剤には、限定されないが、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサールが含まれる。
【０６２９】
（医薬）組成物はまた、薬学的に許容される抗酸化剤、例えば（１）水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（２）油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロールなど；および（３）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。
【０６３０】
（医薬）組成物はまた、組成物中に等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロールまたは塩化ナトリウムを含んでもよい。
【０６３１】
（医薬）組成物はまた、組成物の貯蔵寿命または有効性を高め得る、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤または緩衝剤などの選択された投与経路に適した１つ以上のアジュバントを含んでもよい。本明細書で使用される組成物は、化合物を急速な放出から保護する担体、例えばインプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤を用いて調製され得る。そのような担体には、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、生分解性・生体適合性ポリマー、例えばエチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、および単独もしくはワックスを伴うポリ乳酸、または当技術分野で周知の他の物質が含まれ得る。そのような製剤を調製するための方法は、一般に当業者に公知であり、例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７８参照。
【０６３２】
「薬学的に許容される塩」は、例えば、塩酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酢酸、安息香酸、クエン酸、酒石酸、炭酸またはリン酸などの薬学的に許容される酸を使用することによって形成され得る酸付加塩を含む。さらに、適切な薬学的に許容される塩は、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウムまたはカリウム塩）；アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウムまたはマグネシウム塩）；アンモニウム（NH_4^+）；ならびに適切な有機配位子で形成される塩（例えば、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、アルキルスルホン酸塩およびアリールスルホン酸塩などの対アニオンを使用して形成される第四級アンモニウムおよびアミンカチオン）を含み得る。薬学的に許容される塩の例示的な例としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アルギニン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重硫酸塩、重酒石酸塩、ホウ酸塩、臭化物、酪酸塩、エデト酸カルシウム、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、クラブラン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、二塩酸塩、ドデシル硫酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、ガラクテート、ガラクツロン酸塩、グルセプチン酸塩、グルコヘプトン酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリセロリン酸塩、グリコリルアルサニル酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシ－エタンスルホン酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イソ酪酸塩、イソチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メタンスルホン酸塩、メチル硫酸塩、粘液酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ナプシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、Ｎ－メチルグルカミンアンモニウム塩、オレイ

ン酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、パルミチン酸塩、パントテン酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩／二リン酸塩、フタル酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、ポリガラクツロン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、硫酸塩、スペリン酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクル酸塩、トシル酸塩、トリエチオダイド、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Ｓ．Ｍ．Ｂｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，“Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ”，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．，６６，ｐｐ．１－１９（１９７７）参照）。薬学的に許容されない塩は、薬学的に許容される塩を調製するために使用されてもよく、本開示に含まれる。

【０６３３】

一実施形態では、本明細書で使用される結合剤は、インビボでの適切な分布を確実にするように製剤化され得る。非経口投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。他の活性化合物または治療化合物も、組成物に組み込まれ得る。

【０６３４】

注射用の医薬組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化され得る。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルを含有する水性または非水性溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることによってもたらされ得る。滅菌注射液は、必要に応じて、例えば上に列挙した成分の１つまたは組合せと共に必要量の活性化合物を適切な溶媒に組み込み、続いて滅菌精密濾過することによって調製され得る。一般に、分散液は、基本的な分散媒および例えば上に列挙したものの中から必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、あらかじめ滅菌濾過された活性成分の溶液から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる、減圧乾燥および凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｙｉｎｇ、ｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ）である。

【０６３５】

滅菌注射液は、必要に応じて、上に列挙した成分の１つまたは組合せと共に必要量の活性化合物を適切な溶媒に組み込み、続いて滅菌精密濾過することによって調製され得る。一般に、分散液は、基本的な分散媒および上に列挙したものの中から必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、あらかじめ滅菌濾過された活性成分の溶液から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる、減圧乾燥および凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｙｉｎｇ、ｌｙｏｐｈｉｌｉｚａｔｉｏｎ）である。

【０６３６】

特定の実施形態では、結合剤は、ヒスチジン、スクロースおよびポリソルベート８０を含み、約５～約６、例えば５～６のｐＨを有する組成物または製剤に製剤化される。特に、結合剤は、約２０ｍＭのヒスチジン、約２５０ｍＭのスクロース、約０．０２％のポリソルベート８０を含み、約５．５のｐＨを有する組成物または製剤、例えば、２０ｍＭの

ヒスチジン、２５０ｍＭのスクロース、０．０２％のポリソルベート８０を含み、５．５のｐＨを有する組成物または製剤であり得る。製剤は、特定の実施形態では、約１０～約３０ｍｇの結合剤／ｍＬ、例えば１０～３０ｍｇの結合剤／ｍＬ、特に約２０ｍｇの結合剤／ｍＬ、例えば２０ｍｇの結合剤／ｍＬを含み得る。

【０６３７】

結合剤は、上で定義された組成物で提供され得、次いで、投与前に０．９％ＮａＣｌ（生理食塩水）で希釈され得る。

【０６３８】

本開示による医薬組成物は、一般に、「薬学的有効量」および「薬学的に許容される調製物」で適用される。

【０６３９】

「薬学的に許容される」という用語は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない物質の非毒性を指す。

【０６４０】

本明細書で参照される文書および試験の引用は、前述のいずれかが関連する先行技術であることの承認として意図されていない。これらの文書の内容に関する全ての記述は、出願人が入手可能な情報に基づいており、これらの文書の内容の正確さに関するいかなる承認も構成しない。

【０６４１】

説明（以下の実施例を含む）は、当業者が様々な実施形態を作成および使用することを可能にするために提示される。具体的な装置、技術、および用途の説明は、例としてのみ提供される。本明細書に記載される例に対する様々な変更は、当業者には容易に明らかであり、本明細書で定義される一般的な原理は、様々な実施形態の精神および範囲から逸脱することなく他の例および用途に適用され得る。したがって、様々な実施形態は、本明細書に記載され、示される例に限定されることを意図するものではなく、特許請求の範囲と一致する範囲を与えられるべきである。

【実施例】

【０６４２】

実施例１：２－ＭＥＡ誘導性Ｆａｂアーム交換によるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の作製

以下の抗体を実施例で使用した：

【０６４３】

ＥｐＣＡＭ抗体

ＵＢＳ－５４のＶＨおよびＶＬ配列は、欧州特許第１　４７９　６９６　Ａ１号（Ｃｒｕｃｅｌｌ　Ｈｏｌｌａｎｄ　ＢＶ）に開示されており、これらの配列に基づく抗体は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４」と呼ばれる。Ａ３７のＶＨおよびＶＬ配列は、欧州特許第１　４７９　６９６　Ａ１号（Ｃｒｕｃｅｌｌ　Ｈｏｌｌａｎｄ　ＢＶ）に開示されており、これらの配列に基づく抗体は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７」と呼ばれる。Ｃ５２のＶＨおよびＶＬ配列は、欧州特許第１　４７９　６９６　Ａ１号（Ｃｒｕｃｅｌｌ　Ｈｏｌｌａｎｄ　ＢＶ）に開示されており、これらの配列に基づく抗体は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２」と呼ばれる。３２３／Ａ３のカッパ軽鎖および重鎖配列全体は、米国特許第７，６４８，７０３　Ｂ２号（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　ＬＬＣ）に開示されており、３２３／Ａ３のＶＨおよびＶＬ配列に基づく抗体は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３」と呼ばれる。

【０６４４】

４－１ＢＢ抗体

国際公開第２０１８／０１１４２１号（Ｇｅｎｍａｂ　Ａ／Ｓ；ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＡＧ）の実施例１および表１に記載のＣＤ１３７抗体クローン００５。ＣＤ１３７抗体クローン００５は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００５」と呼ばれる。

国際公開第２０１８／０１１４２１号（Ｇｅｎｍａｂ　Ａ／Ｓ；ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＡＧ）の実施例１および表１に記載のＣＤ１３７抗体クローン００９。ＣＤ１３７抗体クローン００９は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９」と呼ばれる。

国際公開第２０１８／０１１４２１号（Ｇｅｎｍａｂ　Ａ／Ｓ；ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＡＧ）の実施例７および表１に記載のＣＤ１３７－００９ヒト化抗体（ＨＣ７およびＬＣ２）。名称４－１ＢＢ－００９－ＨＣ７ＬＣ２は、本明細書では「ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２」と呼ばれる。

【０６４５】

抗体発現

抗体配列をｐｃＤＮＡ３．３発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＵＳ）にクローニングし、ＦｃドメインにおいてＦｃサイレンシングおよび／またはＤｕｏＢｏｄｙ（登録商標）技術のアミノ酸置換を用いてまたは用いずに、ＩｇＧ１、κまたはＩｇＧ１、λとして発現させた（下記参照）。全ての抗体は、本質的に製造業者によって記載されるように、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）２９３（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号Ａ１４５２５）を使用して、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ＵＳ；カタログ番号Ａ１４５２７）において関連する重鎖および軽鎖発現ベクターを同時トランスフェクトすることによって無血清条件下で作製した。

【０６４６】

二重特異性抗体の作製

二重特異性抗体を、ＤｕｏＢｏｄｙ（登録商標）プラットフォーム技術、すなわち、国際公開第２０１１１４７９８６号、国際公開第２０１１１３１７４６号および国際公開第２０１３０６０８６７号（Ｇｅｎｍａｂ）、Ｌａｂｒｉｊｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　２０１３，１１０：５１４５－５０およびＧｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ　２０１３，５：９６２－９７３に記載されるように２－ＭＥＡ誘導性の制御されたＦａｂアーム交換（ｃＦＡＥ）を使用してインビトロで作製した。この方法による二重特異性抗体の作製を可能にするために、ＣＨ３ドメインに単一の変異を有するＩｇＧ１分子を作製した：一方の親ＩｇＧ１抗体ではＦ４０５Ｌ変異、他方の親ＩｇＧ１抗体ではＫ４０９Ｒ変異。これらの変異に加えて、親ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ　Ｆｃ受容体（Ｆｃガンマ受容体）および／またはＣ１ｑ：Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、Ｄ２６５Ａ（ＦＥＡ；米国特許出願公開第２０１５／０３３７０４９号）もしくはＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、Ｇ２３６Ｒ（ＦＥＲ）などの補体因子と相互作用することができないＦｃドメインをもたらす置換を含んでいた。

【０６４７】

ＦｃサイレンシングとＤｕｏＢｏｄｙ（登録商標）技術突然変異との組合せを以下のように命名した：

Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、Ｄ２６５ＡおよびＦ４０５Ｌ：ＦＥＡＬ

Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、Ｄ２６５ＡおよびＫ４０９Ｒ：ＦＥＡＲ

Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、Ｇ２３６ＲおよびＦ４０５Ｌ：ＦＥＲＬ

【０６４８】

マウス二重特異性抗体を、Ｌａｂｒｉｊｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　２０１７，７：２４７６に記載されているように２－ＭＥＡ誘導性の制御されたＦａｂアーム交換（ｃＦＡＥ）によってインビトロで作製した。この方法による二重特異性抗体の作製を可能にするために、ＣＨ３ドメインに二重一致点変異を有するマウスＩｇＧ２ａ分子（ＩｇＧ２ａｍｍ）を作製した：一方の親ＩｇＧ２ａｍｍ抗体ではＦ４０５Ｌ／Ｒ４１１Ｔ（ＬＴ）変異、他方の親ＩｇＧ２ａｍｍ抗体ではＴ３７０Ｋ／Ｋ４０９Ｒ（ＫＲ）変異。これらの変異に加えて、親ＩｇＧ２ａｍｍ抗体は、Ｌａｂｒｉｊｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　２０１７，７：２４７６に記載されているように、ＩｇＧ　Ｆｃ受容体（Ｆｃガンマ受容体）および／またはＣ１ｑ：Ｌ２３４Ａ，Ｌ２３５Ａなどの補体因子と相互作用することができないＦｃドメインをもたらす置換を含んでいた。

【０６４９】
マウス二重特異性抗体について、サイレンシングとｃＦＡＥ変異との組合せを以下のように命名した：
Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｆ４０５Ｌ／Ｒ４１１Ｔ：ＡＡＬＴ
Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｔ３７０Ｋ／Ｋ４０９Ｒ：ＡＡＫＲ
【０６５０】
親抗体の重鎖（ＨＣ）および軽鎖（ＬＣ）配列を以下の配列番号に示す：
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ　配列番号２５（ＨＣ）および配列番号２６（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ　配列番号２９（ＨＣ）および配列番号１０（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ　配列番号９（ＨＣ）および配列番号１０（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ　配列番号２７（ＨＣ）および配列番号２８（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３　配列番号２４（ＨＣ）および配列番号２２（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＬ　配列番号２１（ＨＣ）および配列番号２２（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ　配列番号２３（ＨＣ）および配列番号２２（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００５－ＦＥＡＲ　配列番号３３（ＨＣ）および配列番号３４（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＦＥＡＲ　配列番号３１（ＨＣ）および配列番号３２（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ　配列番号１９（ＨＣ）および配列番号２０（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ　配列番号３０（ＨＣ）および配列番号２０（ＬＣ）。
ＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＫＲ　配列番号３９（ＨＣ）および配列番号４０（ＬＣ）。
ＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＬＴ　配列番号４１（ＨＣ）および配列番号４０（ＬＣ）。
ＩｇＧ２ａｍｍ－ｍ４－１ＢＢ－３Ｈ３－ＡＡＫＲ　配列番号４２（ＨＣ）および配列番号４３（ＬＣ）。
【０６５１】
二重特異性抗体を作製するために、ＰＢＳ緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水；８．７ｍＭ HPO_4^{2-}、１．８ｍＭ $H_2PO_4^-$、１６３．９ｍＭ Ｎａ＋、１４０．３ｍＭ Ｃｌ－、ｐＨ７．４）中で２つの親抗体を等モル比で混合した。２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ（２－ＭＥＡ）を７５ｍＭの最終濃度まで添加し、反応混合物を３１℃で５時間インキュベートした。製造業者のプロトコルに従って、分子量カットオフ１０ｋＤａのＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒキャリッジ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＢＳ緩衝液中に透析することによって２－ＭＥＡを除去した。試料を４℃で一晩保存して、ジスルフィド結合の再酸化および無傷の二重特異性抗体の形成を可能にした。Ｇｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ＭＡｂｓ．２０１３　Ｎｏｖ　１；５（６）：９６２－９７３）によって記載されているように、エレクトロスプレーイオン化質量分析法（ＥＳＩ－ＭＳ）によって評価した場合、ｃＦＡＥの有効性は＞９５％であった。
【０６５２】
非結合対照抗体ｂ１２
ＩｇＧ１－ｂ１２は、単一特異性および二重特異性抗体についての陰性非結合対照抗体

としていくつかの例で使用されるＨＩＶ－１　ｇｐ１２０特異的抗体である（Ｂａｒｂａｓ，ＣＦ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．１９９３　Ａｐｒ　５；２３０（３）：８１２－２３）。

【０６５３】

親抗体の重鎖（ＨＣ）および軽鎖（ＬＣ）配列を以下の配列番号に示す：

ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ　　配列番号３６（ＨＣ）および配列番号３７（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＲ　　配列番号３５（ＨＣ）および配列番号３７（ＬＣ）。
ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ　　配列番号３８（ＨＣ）および配列番号３７（ＬＣ）。
ＩｇＧ２ａｍｍ－ｂ１２－ＡＡＬＴ 配列番号４４（ＨＣ）および配列番号４５（ＬＣ）。
ＩｇＧ２ａｍｍ－ｂ１２－ＡＡＫＲ 配列番号４６（ＨＣ）および配列番号４５（ＬＣ）。

【０６５４】

実施例２：バイオレイヤー干渉法を用いたＥｐＣＡＭ特異的抗体の結合親和性の決定方法

ＥｐＣＡＭ特異的抗体の標的結合親和性を、Ｏｃｔｅｔ　ＨＴＸ機器（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）での無標識バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって決定した。

【０６５５】

実験は、３０℃にて１，０００ＲＰＭで振盪しながら行った。Ａｎｔｉ－Ｐｅｎｔａ－ＨＩＳ（ＨＩＳ１Ｋ）バイオセンサ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－５１２０）を、１０ｍＭグリシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号１５５２７）緩衝液ｐＨ１．５に５秒間曝露し、続いてＳａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－１１０４）中で５秒間中和することによってプレコンディショニングし、両方の工程を２回繰り返した。ａｎｔｉ－Ｐｅｎｔａ－ＨＩＳバイオセンサに、１００ｎＭ（２．８μｇ／ｍＬ）の組換えヒトＥｐＣＡＭ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号９２７７－ＥＰ）または組換えカニクイザルＥｐＣＡＭ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号１０４５１－ＥＰ）を６００秒間ロードした。Ｓａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔでのベースライン測定（３００秒）の後、機能的一価抗体の会合（２００秒）および解離（１，０００秒）を、Ｓａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔにおける２倍希釈工程で、１．５６～１００ｎＭの濃度範囲を使用して決定した。機能的一価ＥｐＣＡＭ抗体は、１つのＥｐＣＡＭ特異的ＦａｂアームおよびＦａｂアーム（実施例１に記載のＨＩＶ　ｇｐ１２０特異的ｂ１２抗体に基づく）を含む二重特異性分子であり、それにより、このアッセイにおけるＥｐＣＡＭへの結合が機能的に一価であることが保証される。使用した抗体のアミノ酸配列に基づく分子量（１４６．０～１４８．６ｋＤａ）を計算に使用した。各抗体について、参照センサを使用し、これを抗体の代わりにＳａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔとインキュベートした。

【０６５６】

データ取得ソフトウェアＶ１２．０（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を用いてデータを取得し、データ解析ソフトウェアｖ１２（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）で解析した。参照センサを差し引くことによって抗体ごとにデータトレースを補正した。Ｙ軸をベースラインの最後の１０秒に整列させた。解離に対する工程間補正アラインメントおよびＳａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙフィルタリングを適用した。＜０．０５ｎｍの応答を有するデータトレースを分析から除外した。２００秒の会合時間ならびに５０秒および２００秒に設定した解離時間についての関心ウィンドウを使用して、１：１のグローバルフルフィットモデルでデータをフィットさせた（表４および表５に示す）。

【０６５７】

報告されたデータに使用された解離時間は、曲線フィットの目視検査および最高R^2値に基づいて選択した。R^2＜０．９８の曲線フィットに対応するデータを分析から除外した。

【０６５８】

「K_D」（Ｍ）は、抗体－抗原相互作用の平衡解離定数を指し、k_dをk_aで割ることによって得られる。「k_d」（sec^{-1}）は、抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指す。これは、k_{off}値またはオフレートと呼ばれることもある。「k_a」（$M^{-1} \times s$

ｅｃ$^{-1}$）は、抗体－抗原相互作用の会合速度定数を指す。これは、k_{on}値またはオンレートと呼ばれることもある。

【０６５９】

結果

表４は、バイオレイヤー干渉法によって決定された、組換えヒトＥｐＣＡＭに対する二重特異性の機能的一価ＥｐＣＡＭ抗体の会合速度定数k_a（１／Ｍｓ）、解離速度定数k_d（１／ｓ）および平衡解離定数K_D（Ｍ）を示す。ヒトＥｐＣＡＭに対する抗体の親和性は、３．２～５５ｎＭの範囲であった。

【０６６０】

表５は、バイオレイヤー干渉法で決定された、カニクイザルＥｐＣＡＭに対するＥｐＣＡＭ抗体の会合速度定数k_a（１／Ｍｓ）、解離速度定数k_d（１／ｓ）および平衡解離定数K_D（Ｍ）を示す。ＢｉｓＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲだけが、カニクイザルＥｐＣＡＭへの結合について信頼できる結果を示し、親和性は４１ｎＭであった。ＢｉｓＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲでは、ヒトＥｐＣＡＭと比較してカニクイザルへの結合動態の差が観察されたが（カニクイザルＥｐＣＡＭへの結合のオンレートおよびオフレートはより速い）、親和性（K_D）の差は２倍だけであった。

【０６６１】

【表９】

表４：無標識バイオレイヤー干渉法によって決定されたヒトEpCAM細胞外ドメインに対する二重特異性の機能的一価EpCAM抗体の結合親和性。

抗体	応答	フィット時間（秒）	完全な R^2	オンレート k_a (1/Ms)	オフレート k_d (1/s)	K_D (M)
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR	0.60	50	1.00	5.3×10^5	3.0×10^{-2}	5.5×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR	1.44	50	1.00	3.2×10^5	6.3×10^{-3}	2.0×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR	0.73	50	1.00	4.6×10^5	2.2×10^{-2}	4.8×10^{-8}
BisG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR	1.21	200	1.00	3.4×10^5	1.1×10^{-3}	3.2×10^{-9}

【０６６２】

【表１０】

表5：無標識バイオレイヤー干渉法によって決定されたカニクイザルEpCAM細胞外ドメインに対する二重特異性の機能的一価EpCAM抗体の結合親和性。

抗体	応答	フィット時間（秒）	完全な R^2	オンレート k_a (1/Ms)	オフレート k_d (1/s)	K_D (M)
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-UBS-54-FEAR	0.11	50	0.90	完全な $R^2 < 0.98$		
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-A37-FEAR	0.59	50	1.00	5.5×10^5	2.3×10^{-2}	4.1×10^{-8}
BisG1-b12-FEAL/EpCAM-C52-FEAR	0.28	50	0.97	完全な $R^2 <0.98$		
BisG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/m4-1BB-3H3-AAKR	0.02	N/A	N/A	応答 <0.05		

【０６６３】

実施例３：バイオレイヤー干渉法によって決定されるＥｐＣＡＭ抗体のクロスブロック方法

古典的なサンドイッチ形式での抗体クロスブロック分析（エピトープビニング）を、Ｏｃｔｅｔ　ＨＴＸ機器（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）でＢＬＩによって行った。実験は、１，０００ＲＰＭおよび３０℃で振盪しながら行った。

【０６６４】

アミン反応性第２世代（ＡＲ２Ｇ）バイオセンサ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－５０９２）を、２０ｍＭ　ＥＤＣ（Ｎ－［３－ジメチルアミノプロピル］－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩；ＦｏｒｔｅＢｉｏ、１８－１０３３）および１０ｍＭ　ｓ－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウム塩；ＦｏｒｔｅＢｉｏ、１８－１０６７）の溶液で３００秒間活性化した。活性化したＡＲ２Ｇセンサに、１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ６．０（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－１０７０）中２０μｇ／ｍＬの第１のＥｐＣＡＭ抗体を６００秒間ロードし、１ＭエタノールアミンｐＨ８．５（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－１０７１）で３００秒間クエンチした。

【０６６５】

Ｓａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ、カタログ番号１８－１１０４）におけるベースライン測定（５０秒）の後、固定化抗体を含有するＡＲ２Ｇバイオセンサに組換えヒトＥｐＣＡＭ（Ｓａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔで希釈した１００ｎＭまたは２．８μｇ／ｍＬ；Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号９２７７－ＥＰ）を３００秒間ロードした。アミノ酸配列に基づくヒトＥｐＣＡＭの理論分子量（２８ｋＤａ）を計算に使用した。第２のＥｐＣＡＭ抗体（Ｓａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔ中１０μｇ／ｍＬ）の会合（３００秒）を決定した。

【０６６６】

データ取得ソフトウェアｖ１２．０．１．８（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を用いてデータを取得し、データ解析ＨＴソフトウェアｖ１２．０．１．５５（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）で解析した。固定化された第１の抗体からのヒトＥｐＣＡＭの解離を補正するために、参照曲線（第２の抗体の代わりにＳａｍｐｌｅ　Ｄｉｌｕｅｎｔ）を差し引くことによってデータトレースを補正した。Ｙ軸を会合工程の開始に整列させ、Ｓａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙフィルタリングを適用した。第２の抗体の補正された会合応答をマトリックス形式でプロッ

トした。一般に、第２の抗体についての＞０．１ｎｍの応答を第２の抗体結合の指標、したがって、第１の抗体と第２の抗体との間の結合競合がないかまたは不完全であることの指標と見なした。対照的に、－０．１～０．１ｎｍの応答は、遮断抗体対であると見なした。

【０６６７】

結果

ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲおよびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲの抗体について、クロスブロック結合競合実験を行った。全てのＥｐＣＡＭ抗体が、組換えヒトＥｐＣＡＭに対する他のＥｐＣＡＭ抗体の結合をブロックした（表６）。

【０６６８】

【表１１】

表6：バイオレイヤー干渉法によって決定された抗体クロスブロック。

	IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	IgG1-EpCAM-C52-FEAR	IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	IgG1-EpCAM-A37-FEAR
IgG1-EpCAM-323-A3-FEAR	0.00	-0.01	0.00	-0.01
IgG1-EpCAM-C52-FEAR	-0.02	-0.02	-0.01	0.00
IgG1-EpCAM-UBS-54-FEAR	-0.01	0.00	-0.02	0.00
IgG1-EpCAM-A37-FEAR	-0.02	-0.03	-0.03	-0.04

【０６６９】

１列目は固定化された抗体（第１の抗体）を示し、１行目は溶液中の抗体（第２の抗体）を示す。溶液中の抗体の補正された会合応答を示す。抗体のクロスブロックは、濃い灰色で示されている。

【０６７０】

実施例４：ヒト腫瘍細胞株でのＥｐＣＡＭの発現

方法

ＥｐＣＡＭ発現に関する腫瘍細胞株のランク付けを可能にするために、相対的なＥｐＣＡＭ表面発現レベルを、以下のヒト腫瘍細胞株に対するフローサイトメトリを使用して評価した：Ｔ８４（結腸腺癌の肺転移；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＬＬ－２４８）、ＤｉＦｉ（直腸癌；Ｔｈｏｍａｓ Ｖａｌｅｒｉｕｓ Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ Ａｌｂｒｅｃｈｔｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｋｉｅｌ，Ｇｅｒｍａｎｙの厚意により提供された）、ＨＰＡＦ－ＩＩ（膵臓腺癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－１９９７）、ＮＣＩ－Ｎ８７（胃癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－５８２２）、Ｃａｌｕ－３（非小細胞肺癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＨＴＢ－５５）、ＮＣＩ－Ｈ７４７（結腸直腸腺癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＬＬ－２５２）およびＡ５４９（非小細胞肺腺癌；ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＬＬ－１８５）。

【０６７１】

細胞（５×１０^{4}細胞／ウェル）を、ポリスチレン９６ウェル丸底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、カタログ番号６５０１８０）において、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液（０．１％ウシ血清アルブミン［ＢＳＡ、画分Ｖ、Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１０７３５０８６００１］および０．０２％NaN_3［Ｂｉｏ－ｗｏｒｌｄ、カタログ番号４１９２００４４－３］を添加したリン酸緩衝生理食塩水［ＰＢＳ；Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＢＥ１７－５１７Ｑ］）中のアロフィコシアニン（ＡＰＣ）結合抗ＥｐＣＡＭ抗体（クローンＥＢＡ－１、ＩｇＧ１λ；ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号３４７２００）、ＡＰＣ結合の非結合対照抗体（クローン１１７１１、ＩｇＧ１ｋ；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓ

ｔｅｍｓ、カタログＩＣ００２Ａ）と共にまたは抗体なしで、４℃で３０分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液中で洗浄し、ＦＡＣＳＣｅｌｅｓｔａフローサイトメータ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）でフローサイトメトリによって分析した。Δ幾何平均蛍光強度（ＧｅｏＭＦＩ）を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ＳｏｆｔｗａｒｅおよびＭｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｏｆｆｉｃｅ　Ｅｘｃｅｌを使用して、抗ＥｐＣＡＭ抗体で染色した細胞のＧｅｏｍｅａｎ　ＭＦＩから非結合対照抗体とインキュベートした細胞のＧｅｏｍｅａｎ　ＭＦＩを差し引くことによって、各細胞株について計算した。

【０６７２】

結果

図１は、フローサイトメトリを使用して決定された腫瘍細胞株での相対的なＥｐＣＡＭ発現を示し、試験した全ての細胞株でのＥｐＣＡＭ発現を確認している。腫瘍細胞株を、ＥｐＣＡＭ発現に基づいて以下のようにランク付けした：Ｔ８４＞ＤｉＦｉ＞ＨＰＡＦ－ＩＩ＞ＮＣＩ－Ｎ８７＞Ｃａｌｕ－３＞ＮＣＩ－Ｈ７４７＞＞Ａ５４９。

【０６７３】

実施例５：ＥｐＣＡＭ陽性ヒト腫瘍細胞へのＥｐＣＡＭ抗体の結合

方法

二価ＥｐＣＡＭ抗体または１つのＥｐＣＡＭ結合アームを有する二重特異性抗体によるＥｐＣＡＭ発現ヒト腫瘍細胞株ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩおよびＡ５４９への結合をフローサイトメトリによって分析した。細胞（３～５×１０^{4}細胞／ウェル）を、ポリスチレン９６ウェル丸底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ、カタログ番号６５０１８０）において、５０μＬのＰＢＳ（図２Ａ～２Ｃ；Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＳＨ３Ａ３８３０．０３）またはＦＡＣＳ緩衝液（図２Ｄ、Ｅ）中の二価または一価ＥｐＣＡＭ抗体（図２Ａ～２Ｄ：５倍希釈段階で０．００５ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬの範囲；図２　Ｅ：３倍希釈段階で０．５ｎｇ／ｍＬ～３０μｇ／ｍＬの範囲）の段階希釈物と共に、４℃で３０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液中で１回（Ａ～Ｄ）または２回（Ｅ）洗浄した後、細胞を５０μＬのＲ－フィコエリトリン（Ｒ－ＰＥ）ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｆ（ａｂ’）$_2$断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９－１１６－０９８；ＦＡＣＳ緩衝液［Ａ～Ｄ］で１：５００またはＦＡＣＳ緩衝液［Ｅ］で１：２００に希釈）と共に暗所にて４℃で３０分間インキュベートした。次に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で１回（Ａ～Ｄ）または２回（Ｅ）洗浄し、１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＢＤ　ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａ　ＦＡＣＳ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）、Ｃｅｌｅｓｔａ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）またはｉＱｕｅ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で分析した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　Ｖ７．０２ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して、非線形回帰（可変勾配を有するシグモイド用量反応）を使用して結合曲線を分析した。

【０６７４】

結果

図２は、単一特異性二価（モノクローナル）ＥｐＣＡＭ抗体（Ａ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、（Ｂ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲおよび（Ｃ）ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲが、ヒトＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩおよびＡ５４９腫瘍細胞への用量依存的結合を示すことを示す。二重特異性一価ＥｐＣＡＭｘｂ１２抗体（Ａ）ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、（Ｂ）ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲおよび（Ｃ）ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬｘＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲは、それぞれＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲまたはＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲと比較してより高い抗体濃度で結合を示す。ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩおよびＡ５４９腫瘍細胞への最大結合は、それらのそれぞれの単一特異性二価ＥｐＣＡＭ対応物の最大結合に匹敵した。さらに、単一特異性二価ＥｐＣＡＭ抗体ＩｇＧ１－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲは、ＤｉＦｉおよびＨＰＡＦ

－ＩＩ腫瘍細胞への用量依存的結合を示した（Ｄ）。これらの実験に含まれた陰性対照抗体ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬは、ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩおよびＡ５４９腫瘍細胞への結合を示さなかった。

【０６７５】

次に、同じ可変ドメインを含むが、Ｆｃドメインが異なる２つの二重特異性ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ抗体について、ＤｉＦｉ腫瘍細胞に結合する能力を試験した：１つは両方の重鎖（ＨＣ）にＬ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｄ２６５Ａ（ＦＥＡ）不活性変異を保有するＦｃドメインを含有し、もう１つは４－１ＢＢ結合アームのＨＣにＦＥＡ不活性変異を含有し、ＥｐＣＡＭ結合アームのＨＣにＬ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｇ２３６Ｒ（ＦＥＲ）不活性変異を含有していた。２つの二重特異性抗体は、ＥＣ５０値によって実証されるように同等の結合を示した（それぞれ３．８４１ｎＭ対３．９６１ｎＭ；図２Ｅ）。これらの実験に含まれた陰性対照抗体、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲは、ＤｉＦｉ腫瘍細胞への結合を示さず、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の結合がＥｐＣＡＭに特異的であることを示した。

【０６７６】

実施例６：ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭをトランスフェクトしたＣＨＯ細胞へのＥｐＣＡＭ抗体の結合

チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）－Ｓ細胞（１．０×１０^{6}細胞／ｍＬ；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｒ８００－０７）をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）ＣＨＯ発現培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１２６５１０２２）中で培養した。全長ヒト（配列番号５９）、カニクイザル（配列番号６０）またはマウスＥｐＣＡＭ（配列番号６１；全ての構築物について１．２５μｇ／ｍＬ）をコードする構築物によるトランスフェクションの前に、培地に５０単位のペニシリンおよび５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ；Ｌｏｎｚａ，、カタログ番号ＤＥ１７－６０３Ｅ）を添加した。トランスフェクションは、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ　Ｍａｘ（商標）トランスフェクション試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１６４４７１００）およびＯｐｔｉＰＲＯ（商標）ＳＦＭ培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１２３０９０１９）を製造業者の指示に従って使用して行った。トランスフェクション後、細胞を３７℃、８５％湿度、８％CO_2で振盪しながら２４時間インキュベートし、次いで、さらに使用するまで１０％ＤＭＳＯを添加したＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）ＣＨＯ発現培地で凍結した。

【０６７７】

全長ヒト、カニクイザルまたはマウスＥｐＣＡＭを一過性にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｓ細胞へのＥｐＣＡＭ抗体の結合を、フローサイトメトリによって分析した。鉄を含む１０％ドナーウシ血清（ＤＢＳＩ；Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２０３７１）を添加したＲｏｓｗｅｌｌ　Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｐａｒｋ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　１６４０培地（ＲＰＭＩ；Ｌｏｎｚａ、カタログ番号１２－１１５Ｆ）中で細胞を解凍した。細胞（３×１０^{4}細胞／ウェル）を、ポリスチレン９６ウェル丸底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ、カタログ番号６５０１８０）において、５０μＬＰＢＳ／０．１％ＢＳＡ／０．０２％アジド（ＦＡＣＳ緩衝液）中のＥｐＣＡＭ抗体の段階希釈物（５倍希釈段階で０．０００１～５０μｇ／ｍＬの範囲）と共に４℃で３０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液中で２回洗浄した後、細胞を５０μＬのＲ－フィコエリトリン（ＰＥ）結合ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）$_2$（ＦＡＣＳ緩衝液中１：５００；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号１０９－１１６－０９８）中で、４℃で３０分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液中で２回洗浄し、ＴＯ－ＰＲＯ（商標）－３ヨウ化物（１：２００００希釈；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｔ３６０５）を添加した２０μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ｉＱｕｅスクリーナ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，

ＵＳＡ）で分析した。結合曲線を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　Ｖ８．４．１ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して非線形回帰（可変勾配を有するシグモイド用量反応）によって分析した。

【０６７８】

図３Ａは、全長ヒト、カニクイザルおよびマウスＥｐＣＡＭをトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｓ細胞への二価ＥｐＣＡＭ結合抗体ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲおよびＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３の用量依存的結合を示す。同様に、図３Ｂは、全長ヒト、カニクイザルおよびマウスＥｐＣＡＭをトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｓ細胞への一価ＥｐＣＡＭ結合抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ－５４－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ、およびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲの用量依存的結合を示す。対照的に、トランスフェクトされていないＣＨＯ－ＷＴ細胞に対する一価または二価のいずれのＥｐＣＡＭ抗体の結合も観察されなかった。

【０６７９】

実施例７：ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体の４－１ＢＢアゴニスト活性および標的架橋に対するアゴニスト活性の依存性を決定するための細胞ベースのレポータアッセイ。

Ｆｃ不活性ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体の４－１ＢＢアゴニスト活性を決定するために、ＮＦ－κＢ応答エレメントの制御下でルシフェラーゼを発現するレポータ細胞株（ＨＥＫ２９３＿ＮＦＫ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃ細胞）にヒト４－１ＢＢを形質導入した（ＨＥＫ２９３＿ＮＦＫ＿ｈ４－１ＢＢ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃ細胞）。標的架橋に対する４－１ＢＢアゴニスト活性の依存性を決定するために、レポータ細胞株のみを使用して、またはＥｐＣＡＭ発現ＯＶ－９０－ＳＣ１２細胞と共培養して、レポータアッセイを行った。

【０６８０】

ＨＥＫ２９３＿ＮＦＫ＿ｈ４－１ＢＢ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃ細胞を、ＨＥＫ２９３＿ＮＦＫ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃ細胞（ＢｉｏＣａｔ　ＧｍｂＨ、カタログ番号ＴＲ８６０Ａ－１）へのヒト４－１ＢＢのトランスポゾン媒介トランスフェクションとそれに続くブラストサイジン選択によって作製した。細胞を９６ウェル白色平底プレート（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１００７２１５１）に３×１０^{4}細胞／ウェルで播種し、１０％非熱不活性化ＦＢＳ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ、カタログ番号Ｓ０１１５）を添加したＤＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号３１９６６－０４７）中で一晩培養した。翌日、ＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００５－ＦＥＡＲ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＬの段階希釈物を、０．５％非熱不活性化ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ中で調製し、ＨＥＫ２９３＿ＮＫＦ＿ｈ４－１ＢＢ＿ｇｆｐ＿ｌｕｃ細胞（３倍希釈系列、最終濃度範囲８．２～０．０１μｇ／ｍＬ）を含むウェルに添加した。０．５％非熱不活性化ＦＢＳを含むＤＭＥＭ（３×１０^{4}細胞／ウェル）または培地のみを含むＤＭＥＭ中のＯＶ－９０－ＳＣ１２細胞（ＯＶ－９０のサブクローン、ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－１１７３０）をウェルに添加し、プレートを一晩インキュベートした。翌日、培養上清を廃棄し、５０μＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ＧｍｂＨ、カタログ番号６１８７０－０１０）を、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｇ７９４０）を含む５０μＬの培地と共に、各ウェルに添加した。プレートを、光から保護して１０分間インキュベートした。Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｆ２００　Ｐｒｏプレートリーダを用いて発光を測定した。

【０６８１】

ＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００５－ＦＥＡＲ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＬの４－１ＢＢアゴニスト活性を、８．２～０．０１μｇ／ｍＬの３倍段階希釈で分析した（図４）。ルシフェラーゼ発光の用量依存的増加は、ＥｐＣＡＭ発現ＯＶ－９０－ＳＣ１

２細胞の存在下でのみ観察された。これらの結果は、Ｆｃ不活性ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体がインビトロで条件付きの４－１ＢＢアゴニスト活性を示すことを示した。

【０６８２】

実施例８：不活性変異を含むＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体による、ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を誘導する能力

方法

４－１ＢＢ共刺激を介してＰＢＭＣ増殖を増加させるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、Ｆｉｃｏｌｌ勾配（Ｃｏｒｎｉｎｇ；リンパ球分離培地、カタログＮｏ．２５－０７２－ＣＩ）を使用してＥｐＣＡＭ発現腫瘍細胞株と健常ヒトドナー軟膜（Ｓａｎｑｕｉｎ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）から単離した初代ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）とのインビトロ共培養物において評価した。ＰＢＭＣ増殖を増強する能力を、両方の重鎖（ＨＣ）にＦＥＡ不活性変異を含有するＦｃドメインを有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体、ならびに４－１ＢＢ結合アームのＨＣにＦＥＡ不活性変異およびＥｐＣＡＭ結合アームのＨＣにＦＥＲ不活性変異を含有するＦｃドメインを有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の両方について評価した。

【０６８３】

第１のセットの実験（図５～７）では、ＥｐＣＡＭ発現腫瘍細胞（ＤｉＦｉ、Ｔ８４、ＨＰＡＦ－ＩＩ、ＮＣＩ－Ｎ８７、Ｃａｌｕ－３またはＮＣＩ－Ｈ７４７；本明細書で上述した通り）を、Ｔ細胞培地（５％ヒト血清［Ｓａｎｑｕｉｎ Ｂｌｏｏｄ Ｂａｎｋ、カタログ番号Ｂ０６２６］および１％Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ、Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＤＥ１７－６０３Ｅを添加したＩｓｃｏｖｅの改変ダルベッコ培地［ＩＭＤＭ；Ｌｏｎｚａ、カタログ番号１２－７２２Ｆ］）中のポリスチレン９６ウェル平底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、カタログ番号６５５１８０）に６，２５０細胞／ウェルの密度で播種し、３７℃で４時間接着させた。ＰＢＭＣをＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水、Ｈｙｃｌｏｎｅ、カタログ番号ＳＨ３Ａ３８３００３）中０．５μＭ ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）ＣＦＳＥ（カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号Ｃ３４５５４Ａ）で、３７℃にて２０分間標識した。洗浄し、ＰＢＭＣをＴ細胞培地中で０．５～１．５時間静置し、再度洗浄した後、ＰＢＭＣを抗ＣＤ３抗体（０．１μｇ／ｍＬ；クローンＵＣＨＴ１；Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、カタログ番号６００１１）と混合し、１６：１の比で腫瘍細胞に添加した（１００，０００細胞／ウェル）。二重特異性ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ、ＥｐＣＡＭｘｂ１２または非結合対照抗体を添加し（最終濃度段階希釈：５倍希釈で８～２５，０００ｎｇ／ｍＬ［図５および７］、または１０μｇ／ｍＬの単一濃度［図６］）、プレートを３７℃で９６時間インキュベートした。次に、ＰＢＭＣを含有する１５０μＬの上清を９６ウェル丸底プレートに移した。細胞をＰＢＳで洗浄した後、ＰＢＭＣを、光から保護して室温で２０分間、５０μＬ ＢＤ Ｈｏｒｉｚｏｎ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｓｔａｉｎ ５１０（ＦＶＳ５１０；ＰＢＳで１：５０００希釈；ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；カタログ番号５６４４０６）で染色した。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞サブセットにおいて増殖を評価した実験では、細胞を、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中のブリリアントバイオレット（ＢＶ）７８５標識抗ＣＤ１９（クローンＳＪ２５Ｃ１、１：５０；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３６３０２８）、ＡＰＣ－ｅＦ７８０標識抗ＣＤ４（クローンＯＫＴ４，１：５０；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号４７－００４８－４２）、ＡＦ７００標識抗ＣＤ８（クローンＲＰＡ－Ｔ８、１：１００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０２８）、およびＢＶ６０５標識抗ＣＤ１４（クローン：Ｍ５Ｅ２、１：２００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１８３４）抗体で、光から保護して４℃で３０分間、さらに染色した。細胞を洗浄した後、細胞を３０～６０μＬのＦＡＣＳ緩衝液（０．１％ウシ血清アルブミン［ＢＳＡ、画分Ｖ、Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１０７３５０８６００１］、０．０２％ＮａＮ３［Ｂｉｏ－ｗｏｒｌｄ、カタログ番号４１９２００４４－３］および２ｍＭ ＥＤＴＡ［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カ

タログ番号ＢＣＣＢ３７８９］を添加したＰＢＳ［Ｌｏｎｚａ、ＢＥ１７－５１７Ｑ］）に再懸濁し、Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔソフトウェアを使用するｉＱｕｅフローサイトメータ（図５および７）またはＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用するＢＤ　Ｓｙｍｐｈｏｎｙフローサイトメータ（図６）で分析した。

【０６８４】

実験の第２のセットを、以下の例外を除いて、本質的に上記のように行った。二重特異性ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ、ＥｐＣＡＭｘｂ１２または非結合対照抗体の最終濃度段階希釈は、０．３２～２５，０００ｎｇ／ｍＬであった（図８）。細胞を５０μＬ　ＢＤ　Ｈｏｒｉｚｏｎ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｓｔａｉｎ　５１０（ＰＢＳで１：５０００希釈）で染色した後、プレートを光から保護して室温で３０分間インキュベートした。細胞を、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中のブリリアントバイオレット（ＢＶ）７８５標識抗ＣＤ１９（クローンＳＪ２５Ｃ１、１：８０）、ＡＰＣ－ｅＦ７８０標識抗ＣＤ４（クローンＯＫＴ４，１：１００）、ＡＦ７００標識抗ＣＤ８（クローンＲＰＡ－Ｔ８、１：１００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０２８）およびＰＥ－Ｃｙ７標識抗ＣＤ１４（クローン：Ｍ５Ｅ２；１：５０；ＢＤ、カタログ番号５５７７４２）抗体で、光から保護して４℃で３０分間、さらに染色した。洗浄後、細胞を８０μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用するＢＤ　Ｓｙｍｐｈｏｎｙフローサイトメータを用いてｉＱｕｅフローサイトメータで分析した（図８）。ＰＢＭＣ増殖の評価のために、細胞をリンパ球（ＦＳＣ／ＳＳＣに基づく）および生細胞（ＦＶＳ５１０－集団）についてゲートした。ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の評価のために、ＰＢＭＣをリンパ球（ＦＳＣ／ＳＳＣに基づく）、生細胞（ＦＶＳ５１０－集団）、Ｔ細胞（ＣＤ１４－ＣＤ１９－集団）および最後にＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞（それぞれＣＤ４＋ＣＤ８－集団またはＣＤ４－ＣＤ８＋集団）についてゲートした。ＣＦＳＥ染色細胞を測定して、ＰＢＭＣ、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を評価した。細胞あたりの平均分裂数を表す分裂指数を、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｏｆｆｉｃｅ　Ｅｘｃｅｌを使用して計算し、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して以下の式を用いて可視化した：

Σ（ｘ$_i$／２ｉ＊ｉ）／Σ（ｘ$_i$／２ｉ）、ここで、ｉはピークの数であり、分裂していないピークは０、最初の分裂は１などであり、ｘ$_i$は対応するピークにおける細胞の数である。

【０６８５】

結果

４－１ＢＢ共刺激を介してＴ細胞増殖を増加させるＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、ＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞株とＰＢＭＣとのインビトロ共培養物において評価した。図５は、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ（Ａ）、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（Ｂ）、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（Ｃ）およびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ（Ｄ）が、ＣＦＳＥ標識細胞の用量依存的増殖を増強した（分裂指数の増加として示される）ことを示す。４つ全てのＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ抗体によって誘導された分裂指数の最大増加は同等であった。対照的に、二重特異性ＥｐＣＡＭｘｂ１２抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ（Ａ）、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ（Ｂ）、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲ（Ｃ）およびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲ（Ｄ）は、分裂指数がアイソタイプ対照抗体ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬと同等であったので、増殖を増強しなかった。

【０６８６】

さらに、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖に対するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の効果を、これらのＴ細胞サブセットに対して特異的にゲートすることによって評価した。図６は、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－

００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲが、（Ａ）ＣＤ４＋Ｔ細胞および（Ｂ）ＣＤ８＋Ｔ細胞の両方の増殖を増強した（分裂指数の増加として示される）ことを示す。対照的に、二重特異性ＥｐＣＡＭｘｂ１２抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－ＵＢＳ５４－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ｃ５２－ＦＥＡＲは、分裂指数がアイソタイプ対照抗体ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬと同等であったので、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

【０６８７】

次に、様々なＥｐＣＡＭ発現レベルを有する腫瘍細胞株（実施例４に記載）の選択を使用して、ＰＢＭＣ増殖に対するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ抗体の効果をさらに評価した。図７は、Ｔ８４、ＤｉＦｉ、ＨＰＡＦ－ＩＩ、ＮＣＩ－Ｎ８７、Ｃａｌｕ－３またはＮＣＩ－Ｈ７４７腫瘍細胞の存在下で、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲがＰＢＭＣ増殖を増強した（分裂指数の増加として示される）ことを示す。対照的に、二重特異性ＥｐＣＡＭｘｂ１２抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲは、分裂指数がアイソタイプ対照抗体ＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＡＬと同等であったので、ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物のいずれにおいても増殖に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、ＥｐＣＡＭｘ－４－１ＢＢ　ｂｓＡｂが、試験した全ての腫瘍細胞株において活性化ＰＢＭＣの増殖を増加させることができ、ここで試験した範囲でのＥｐＣＡＭ発現の明確な影響がないことを示した。

【０６８８】

両方のＨＣにＦＥＡ変異を含有するＦｃドメインを有するか、または一方のＨＣにＦＥＡ変異を有し、他方のＨＣにＦＥＲ変異を有するＦｃドメインを有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の、活性化ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を増強する能力を比較した（図８）。ＰＢＭＣと、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲまたはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬのいずれかの濃度系列を有するＤｉＦｉ腫瘍細胞との共培養物の９６時間のインキュベーション後に、非常に匹敵するレベルのＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖が観察された。これは、２つのＨＣのうちの１つにおいてＦＥＡ不活性変異をＦＥＲ不活性変異と交換した場合に、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体によるＴ細胞増殖を増強する能力が変化しなかったことを示している。

【０６８９】

結論として、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体は、様々なＥｐＣＡＭ発現レベルを有する腫瘍細胞との共培養物において、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の両方の増殖を含む、活性化ＰＢＭＣの増殖を増強した。Ｔ細胞増殖を増強する能力は、両方のＨＣにＦＥＡ不活性変異を含有するか、または一方のＨＣにＦＥＡ不活性変異を含有し、他方のＨＣにＦＥＲ不活性変異を含有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体について同等であった。

【０６９０】

実施例９：腫瘍浸潤Ｔ細胞およびＮＫ細胞の増殖を誘導するＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を決定するためのエクスビボＴＩＬ増殖アッセイ。

ＴＩＬサブセットに対するＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体の効果を決定するために、ヒト非小細胞肺癌患者から外科的に切除された原発腫瘍組織を使用してエクスビボＴＩＬ増殖アッセイを行った。

【０６９１】

凍結保存した腫瘍組織断片を解凍し、約１ｍｍ^{3}の断片に切断した。断片を、２％ヒト血清アルブミン（ＣＬＳ　Ｂｅｈｒｉｎｇ、ＰＺＮ－００５０４７７５）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１５１４０－１２２）、１％アムホテリシンＢ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１５２－９００－２６）および５０Ｕ／ｍＬインターロイキン（ＩＬ）－２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ－Ｓ、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｐｈａｒｍａ　ＧｍｂＨ、ＰＺＮ－０２２３８１３１）を添加したＸ－ＶＩＶＯ（商標）１５培地（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＢＥ０２－０６０Ｑ）中、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、カタログ番号６６２１６０；１ウェルあたり２断片、１条件あたり１２～１６ウェル）に播種した。二重特異性抗体（ＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＦＥＡＲまたはＢｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ）をウェルに添加した（０．２または５μｇ／ｍＬの最終濃度）。断片を３日間培養した。ＩＬ－２および抗体（上記と同じ濃度）を含有する新鮮な培養培地を３日目に添加した。残りの培養期間中、ＴＩＬ成長およびＴＩＬマイクロクラスタの形成を顕微鏡によって定期的に観測した。７日目に、元の２４ウェルプレートの２つのウェルの内容物を新しい６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、カタログ番号６５７１６０）の１つのウェルに移すことによって細胞をプールした。ＩＬ－２（最終濃度３３Ｕ／ｍＬ）を含有する新鮮な培養培地を添加した。１０日目に、各ウェルの培養上清の半分を、ＩＬ－２（最終濃度１５Ｕ／ｍＬ）を含有する新鮮な培養培地に置き換えた。１４日目に、細胞を採取し、フローサイトメトリ分析のための処理条件別にプールした。

【０６９２】

採取した細胞の各処理群からの１００μＬのアリコートを、以下の抗ヒト抗体で染色した：Ｖ５００結合抗ＣＤ４５（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６０７７７）、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｖｉｏｌｅｔ（ＢＶ）７８６結合抗ＣＤ５６（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号７４０９７９）、Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅ結合抗ＣＤ３（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５８１１７）、ＰｅｒＣＰ－ｅＦｌｕｏｒ７８０結合抗ＣＤ４（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４６－００４７－４２）、およびＢＶ６０５結合抗ＣＤ８α（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６４１１６）。さらに、細胞を固定可能な生存色素ｅＦｌｕｏｒ７８０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号６５－０８６５－１４）で染色した。取得の前に、３０μＬの参照ビーズ（ＣｏｕｎｔＢｒｉｇｈｔ（商標）Ａｂｓｏｌｕｔｅ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｂｅａｄｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｃ３６９５０）を各試料に添加した。ＦＡＣＳ　Ｃｅｌｅｓｔａフローサイトメータ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）でデータを収集した。

【０６９３】

Ｆｌｏｗｊｏ　Ｓｏｆｔｗａｒｅバージョン１０．７．１を使用して、フローサイトメトリデータを分析した。絶対細胞数を、式：

【数１】

$$\text{細胞数} = \frac{\text{事象数（細胞）}}{\text{事象数（ビーズ）}} \times \text{ビーズ濃度} \times \text{試料体積}$$

を使用して決定した。

【０６９４】

エクスビボＴＩＬ増殖アッセイでは、全てのＴＩＬ（ＣＤ４５$^+$）ならびにＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＮＫ細胞の数が、抗体対照なしと比較して、ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体で処理した培養物において増加した（図９）。細胞数の増加は、５μｇ／ｍＬと比較して、０．２μｇ／ｍＬのＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体で処理した培養物においてより顕著であった。これらの結果は、ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二

重特異性抗体が、エクスビボでヒト腫瘍標本からのＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＮＫ細胞の増殖を増強することができることを示した。

【０６９５】

実施例１０：ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍活性を測定するためのＭＣ３８担癌マウスの処置。

ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体の抗腫瘍活性を評価するために、ヒトＥｐＣＡＭ過剰発現ＭＣ３８腫瘍（ＭＣ３８＿ｈＥｐＣＡＭ）を担持するヒトＥｐＣＡＭトランスジェニックマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｂ６．ＦＶＢ－Ｔｇ株（ＴＡＣＳＴＤ１）０２Ｌｅｉｊ／Ｊ）のインビボモデルを使用した。ＭＣ３８＿ｈＥｐＣＡＭ細胞を、ＭＣ３８細胞（Ｋｅｒａｆａｓｔ、カタログ番号ＥＮＨ２０４－ＦＰ）へのヒトＥｐＣＡＭのレトロウイルス形質導入によって作製した。

【０６９６】

年齢および性別が一致するマウスに、１００μＬのＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１４１－９０２－５０）中の5×10^5個のＭＣ３８＿ｈＥｐＣＡＭ細胞を皮下接種した。カリパスを使用して腫瘍成長を少なくとも週に２回評価し、カリパス測定値から腫瘍体積を（［長さ］×［幅］^{2}）／２として計算し、ここで、長さは最長腫瘍寸法であり、幅は長さに垂直な最長腫瘍寸法である。腫瘍が約３０ｍｍ^{3}のメジアン径に達したとき、ＢｓＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＬＴ／ｍ４－１ＢＢ－３Ｈ３－ＡＡＫＲまたはアイソタイプ対照抗体ＩｇＧ２ａｍｍ－ｂ１２－ＡＡＫＲによる処置を開始した。マウスを、腫瘍接種後１２、１７、２１、２４、２８および３１日目に、２００μＬのＰＢＳ中の１００μｇのそれぞれの抗体で腹腔内処置した。マウスの体重を週に３回測定した。腫瘍体積が１，５００ｍｍ^{3}を超えたとき、またはマウスが他の人道的エンドポイント（例えば、体重減少≧２０％、腫瘍の潰瘍化（＞７５％）または疾病の臨床徴候の発生）に達したとき、個々の動物を安楽死させた。

【０６９７】

ＭＣ３８＿ｈＥｐＣＡＭ腫瘍の成長は、アイソタイプ対照処置マウスと比較して、ＢｓＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＬＴ／ｍ４－１ＢＢ－３Ｈ３－ＡＡＫＲで処置したマウスにおいて有意に減少した（図１０）。さらに、ＢｉｓＩｇＧ２ａｍｍ－ＥｐＣＡＭ－３２３－Ａ３－ＡＡＬＴ／ｍ４－１ＢＢ－３Ｈ３－ＡＡＫＲ処置マウスの生存も有意に改善された。これらの結果から、ＥｐＣＡＭ×４－１ＢＢ二重特異性抗体はインビボで抗腫瘍活性を示すことが示された。

【０６９８】

実施例１１：ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＥｐＣＡＭ特異的抗体および４－１ＢＢ特異的抗体の組合せとＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異的抗体との比較

ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化（Ｔ細胞活性化マーカＣＤ２５および４－１ＢＢの発現によって定義される）を増強する能力を、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体と、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ抗体の組合せまたはｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ抗体の組合せとの間で比較した。

【０６９９】

方法

ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、ＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞と健常ヒトドナー軟膜（Ｓａｎｑｕｉｎ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）から精製したＰＢＭＣとのインビトロ共培養物において評価した。

【０７００】

第１のセットの実験では、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７

－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲのＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を増強する能力を、二価モノクローナル抗体ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した（図１１）。これらの実験は、以下の例外を除いて、本質的に実施例８に記載されるように行った。ＰＢＭＣを、光から保護して３７℃で２０分間、ＰＢＳ中の０．５μＭ ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ；１：１０，０００、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号Ｃ３４５５７）で標識した。ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ、ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ（単独または組合せのいずれか）およびｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの最終濃度は、０．３または３μｇ／ｍＬ（組合せの場合：各抗体０．３または３μｇ／ｍＬ）であった。抗体と９６時間インキュベートし、洗浄した後、細胞を、光から保護して４℃で３０分間、５０μＬ ＢＤ Ｈｏｒｉｚｏｎ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｓｔａｉｎ ５１０（ＦＶＳ５１０；ＰＢＳで１：１０００希釈；ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；カタログ番号５６４４０６）で染色した。次に、細胞を、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中のＢＶ７８５標識抗ＣＤ１９（クローンＳＪ２５Ｃ１、１：８０；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３６３０２８）、ＡＰＣ－ｅＦ７８０標識抗ＣＤ４（クローンＯＫＴ４、１：１００；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号４７－００４８－４２）、ＡＦ７００標識抗ＣＤ８（クローンＲＰＡ－Ｔ８、１：１００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０２８）、およびＰＥ－Ｃｙ７標識抗ＣＤ１４（クローン：Ｍ５Ｅ２、１：５０；ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５７７４２）抗体で、光から保護して４℃で３０分間染色した。洗浄後、細胞を８０μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＢＤ ＦＡＣＳＣｅｌｅｓｔａ（商標）Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して分析した。ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の評価のために、ＰＢＭＣをリンパ球および単一細胞（ＦＳＣ／ＳＳＣに基づく）、生細胞（ＦＶＳ５１０－集団）、Ｔ細胞（ＣＤ１４－ＣＤ１９－集団）および最後にＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞（それぞれＣＤ４＋ＣＤ８－集団またはＣＤ４－ＣＤ８＋集団）についてゲートした。ＣＴＶ染色細胞を測定して、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を評価した。分裂細胞の割合を、全ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞集団のうちの細胞分裂を受けた細胞の割合（ＣＴＶ希釈に基づく）として決定した。増殖指数値を以下のように計算した：

増殖指数＝総細胞数／培養開始時の細胞数＝（Ｇ０＋Ｇ１＋Ｇ２＋Ｇ３＋Ｇ４＋Ｇ５＋Ｇ６＋Ｇ７）／（Ｇ０＋Ｇ１：２＋Ｇ２：４＋Ｇ３：８＋Ｇ４：１６＋Ｇ５：３２＋Ｇ６：６４＋Ｇ７：１２８）

Ｇｎ＝世代ｎピークの細胞数（ｎ＝０～７）

【０７０１】

第２のセットの実験では、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せと比較した（図１２および図１３）。これらの実験は、以下の例外を除いて、本質的に実施例８に記載されるように行った。ＰＢＭＣを、光から保護して３７℃で２０分間、ＰＢＳ中の０．５μＭ ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ，１：１０，０００、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号Ｃ３４５５７）で標識した。二重特異性ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢの段階希釈の最終濃度は０．０００５～３μｇ／ｍＬであった。ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲとｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲとの組合せの最終濃度は、各抗体３μｇ／ｍＬであった。抗体と９６時間インキュベートし、洗浄した後、ＰＢＭＣを、光から保護して４℃で３０分間、５０μＬ ＢＤ Ｈｏｒｉｚｏｎ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｓｔａｉｎ ５７５Ｖ（ＦＶＳ５７５；ＰＢＳで１：１０００希釈；ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；カタログ番号５６５６９４）で染色した。

次に、細胞を、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中のＢＶ７８５標識抗ＣＤ１９（クローンＳＪ２５Ｃ１、１：８０；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３６３０２８）、ＡＰＣ－ｅＦ７８０標識抗ＣＤ４（クローンＯＫＴ４、１：１００；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号４７－００４８－４２）、ＡＦ７００標識抗ＣＤ８（クローンＲＰＡ－Ｔ８、１：１００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０２８）、ＡＰＣ標識抗４－１ＢＢ（クローン：４Ｂ４－１、１：４０、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０９８１０）、ＰＥ標識抗ＣＤ２５（クローン：Ｍ－Ａ２５１、１：２００、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３５６１０４）およびＰＥ－Ｃｙ７標識抗ＣＤ１４（クローン：Ｍ５Ｅ２、１：５０；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５７７４２）抗体で、光から保護して４℃で３０分間染色した。洗浄後、細胞を８０μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＢＤ　ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａ　ＦＡＣＳ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）で取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して分析した。ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の評価のために、ＰＢＭＣをリンパ球および単一細胞（ＦＳＣ／ＳＳＣに基づく）、生細胞（ＦＶＳ５７５－集団）、Ｔ細胞（ＣＤ１４－ＣＤ１９－集団）および最後にＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞（それぞれＣＤ４＋ＣＤ８－集団またはＣＤ４－ＣＤ８＋集団）についてゲートした。ＣＴＶ染色細胞を測定して、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を評価した。これらの実験について増殖指数を計算することができなかったので、代わりに分裂細胞の割合を報告し、全ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞集団のうちの細胞分裂を受けた細胞の割合（ＣＴＶ希釈に基づく）として決定した。ＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団のＣＤ２５＋％または４－１ＢＢ＋細胞％または幾何平均蛍光強度（ＦＩ）を、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞集団内で決定した。

【０７０２】

結果

ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、ＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞とＰＢＭＣとのインビトロ共培養物において評価した。ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体で処理したＴ細胞の増殖および活性化を、ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体（一価または二価、単独または組合せのいずれか）と比較した。

【０７０３】

図１１は、増殖指数の増加によって示されるように、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲが、二価モノクローナル抗体ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ（単独または組合せのいずれか）と比較して、ＣＴＶ標識ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を増強したことを示す。試験した全てのＰＢＭＣドナーにわたって、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲは、一貫してＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の最大の増加を示した（データは示していない）。

【０７０４】

図１２は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲが、分裂細胞の割合の増加によって示されるように、ＣＴＶ標識ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を用量依存的に増強したことを示す。対照的に、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せは、分裂細胞の割合が、抗体を添加せずにＤｉＦｉ腫瘍細胞と共培養した抗ＣＤ３刺激ＰＢＭＣと同等であったので、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を増強しなかった。

【０７０５】

図１３は、Ｔ細胞活性化マーカＣＤ２５および４－１ＢＢの発現の増加によって示されるように、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲがＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を用量依存的に増強したこと

を示す。ＣＤ２５および４－１ＢＢを発現するＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の割合、ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団の幾何平均ＦＩの両方が、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲによって増加した。対照的に、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せは、ＣＤ２５および４－１ＢＢを発現する細胞の割合ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団の幾何平均ＦＩが、抗体を添加せずにＤｉＦｉ腫瘍細胞と共培養した抗ＣＤ３刺激ＰＢＭＣと同等であったので、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を増強しなかった。

【０７０６】

結論として、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体は、二価または一価のＥｐＣＡＭ特異的抗体と４－１ＢＢ特異的抗体との組合せと比較して、ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物における増強されたＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖および活性化を示した。

【０７０７】

実施例１２：癌患者由来のＰＢＭＣを使用したＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＴ細胞増殖および活性化に対するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の効果

ＰＢＭＣ－腫瘍細胞共培養物におけるＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化（Ｔ細胞活性化マーカＣＤ２５および４－１ＢＢの発現によって定義される）を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、癌患者由来のＰＢＭＣを使用して評価した。

【０７０８】

方法

ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、ＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞と癌患者由来のＰＢＭＣ（Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）とのインビトロ共培養物において評価した。これらの実験は、以下の例外を除いて、本質的に実施例８に記載されるように行った。

【０７０９】

ＰＢＭＣは、化学療法および他の治療を受けている結腸直腸癌患者に由来し、採血時に安定した疾患を示した。ＰＢＭＣを、光から保護して３７℃で２０分間、ＰＢＳ中の０．５μＭ　ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Ｖｉｏｌｅｔ（ＣＴＶ；１：１０，０００、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号Ｃ３４５５７）で標識した。ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの最終濃度は０．０００４～３μｇ／ｍＬであり、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲとｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲとの組合せの最終濃度は各抗体３μｇ／ｍＬであった。抗体と９６時間インキュベートし（３７℃、５％CO_2）、ＰＢＳで洗浄した後、細胞を、光から保護して４℃で３０分間、５０μＬ　ＢＤ　Ｈｏｒｉｚｏｎ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｓｔａｉｎ　５１０（ＦＶＳ５１０；ＰＢＳで１：１０００希釈；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；カタログ番号５６４４０６）で染色した。次に、細胞を、５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中のＢＶ７８５標識抗ＣＤ１９（クローンＳＪ２５Ｃ１、１：８０；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３６３０２８）、ＡＰＣ－ｅＦ７８０標識抗ＣＤ４（クローンＯＫＴ４、１：１００；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号４７－００４８－４２）、ＡＦ７００標識抗ＣＤ８（クローンＲＰＡ－Ｔ８、１：１００；ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０１０２８）、ＡＰＣ標識抗４－１ＢＢ（クローン：４Ｂ４－１、１：４０、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０９８１０）、ＰＥ標識抗ＣＤ２５（クローン：Ｍ－Ａ２５１、１：２００、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３５６１０４）およびＰＥ－Ｃｙ７標識抗ＣＤ１４（クローン：Ｍ５Ｅ２、１：５０；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５７７４２）抗体で、光から保護して４℃で３０分間染色した。洗浄後、細胞を８０μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＢＤ　ＬＳ

ＲＦｏｒｔｅｓｓａ　ＦＡＣＳ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）で取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して分析した。ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の評価のために、ＰＢＭＣをリンパ球および単一細胞（ＦＳＣ／ＳＳＣに基づく）、生細胞（ＦＶＳ５１０－集団）、Ｔ細胞（ＣＤ１４－ＣＤ１９－集団）および最後にＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞（それぞれＣＤ４＋ＣＤ８－集団またはＣＤ４－ＣＤ８＋集団）についてゲートした。ＣＴＶ染色細胞を測定して、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を評価した。分裂細胞の割合を、全ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞集団のうちの細胞分裂を受けた細胞の割合（ＣＴＶ希釈に基づく）として決定した。ＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団のＣＤ２５＋％または４－１ＢＢ＋細胞％または幾何平均蛍光強度（ＦＩ）を、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞集団内で決定した。

【０７１０】

結果

ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖および活性化を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を、ＥｐＣＡＭ発現ＤｉＦｉ腫瘍細胞と結腸直腸癌患者由来のＰＢＭＣとのインビトロ共培養物において評価し、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体の組合せと比較した。

【０７１１】

図１４は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲが、分裂細胞の割合の増加によって示されるように、ＣＴＶ標識ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を用量依存的に増強したことを示す。対照的に、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せは、３μｇ／ｍＬでＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を増強しなかった。

【０７１２】

図１５は、Ｔ細胞活性化マーカＣＤ２５および４－１ＢＢの増加によって示されるように、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲがＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を用量依存的に増強したことを示す。ＣＤ２５または４－１ＢＢを発現するＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の割合、ならびにＣＤ２５＋または４－１ＢＢ＋集団における幾何平均ＦＩの両方が、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲによって増加した。対照的に、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの組合せは、ＣＤ２５または４－１ＢＢならびに両方のマーカの幾何平均ＦＩを発現する細胞の割合が、抗体を添加せずにＤｉＦｉ腫瘍細胞と共培養した抗ＣＤ３刺激ＰＢＭＣと同等であったので、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を増強しなかった。

【０７１３】

結論として、ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体は、一価ＥｐＣＡＭ特異的および４－１ＢＢ特異的抗体の組合せと比較して、癌患者由来のＰＢＭＣとＤｉＦｉ腫瘍細胞との共培養物において増強されたＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖および活性化を示した。

【０７１４】

実施例１３：腫瘍細胞に対するＴ細胞媒介性細胞傷害を増強するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の能力を決定するためのインビトロ死滅アッセイ

ヒトＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の細胞傷害活性に対するＤｕｏＢｏｄｙ　ＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢの効果を、標的細胞としての腫瘍細胞と共培養して調べた。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞による細胞傷害関連分子グランザイムＢ（ＧｚｍＢ）およびＣＤ１０７ａの発現をフローサイトメトリによって評価した。標的細胞死滅を、ｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅシステムを使用したリアルタイム細胞分析によって評価した。ヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（ＡＴＣＣ（登

録商標）、ＨＴＢ－２６（商標））に、モデル抗原クローディン６およびヒトＥｐＣＡＭ（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ細胞）を安定に形質導入し、標的細胞株として使用した。

【０７１５】

方法

ＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ細胞を、９６ウェル平底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、カタログ番号６５５１８０）およびｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ Ｅプレート（Ａｇｉｌｅｎｔ、カタログ番号０５２３２３６８００１）において１．５×10^4細胞／ウェルで、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｆ７５２４）を添加した１００μＬのダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号３１９６６－０４７）に播種した。細胞を室温で３０分間静置させた。９６ウェル平底プレート（フローサイトメトリ分析用）およびＥプレート（リアルタイム細胞分析用）を、それぞれインキュベータまたはｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅリアルタイム細胞分析機器（Ａｃｅａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で１日間インキュベートした（両方の場合に３７℃、５％CO_2）。

【０７１６】

ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ＣＤ８マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－０４５－２０１）を使用する磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）によって、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性健常ヒトドナーに由来するＰＢＭＣから精製した。精製ＣＤ８$^+$Ｔ細胞に、ＣＬＤＮ６特異的ＴＣＲのα鎖およびβ鎖をコードするＲＮＡ（ＴＣＲ＃１２α、ＴＣＲ＃１２β；それぞれ１０μｇのＲＮＡ）を５００Ｖ、３ミリ秒および１パルスでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの直後に、５％プールヒト血清（ＰＨＳ；Ｏｎｅ Ｌａｍｂｄａ Ｉｎｃ．、カタログ番号Ａ２５７６１）を添加した予熱したＩＭＤＭ ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＧｍｂＨ、カタログ番号３１９８００３０）を細胞に添加した。エレクトロポレーションしたＴ細胞を６ウェルプレートに移し、一晩インキュベートした（３７℃、５％CO_2）。翌日のフローサイトメトリによって決定されたエレクトロポレーション効率は、＞８５％であった。

【０７１７】

一晩のインキュベーション後、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭに再懸濁した。ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、前日に播種したＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ細胞を含むウェル（９６ウェルプレートおよびＥプレートの両方）に添加した。７．５×10^4個のＣＤ８$^+$Ｔ細胞をウェルあたりに添加し、５：１のエフェクタ：標的比を得た。対照として、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ細胞を、Ｔ細胞を添加せずに培養した。ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲまたは対照抗体を、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭで希釈し、ウェルに添加した。対照として、１つの非結合Ｆａｂアームと対になった１つのＥｐＣＡＭ特異的Ｆａｂアームまたは１つの４－１ＢＢ特異的Ｆａｂアームを含むＦｃ不活性一価二重特異性抗体（ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬｘＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ）ならびにＦｃ不活性非結合抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲを使用した。ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを０．００３２～３．２μｇ／ｍＬの最終濃度範囲にわたって試験し、対照抗体を３．２μｇ／ｍＬの単一最終濃度で試験した。最終容量は２００μＬ／ウェルであった。

【０７１８】

蛍光色素標識抗ＣＤ１０７ａ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２８６１１；最終希釈率１：２，５００）を９６ウェルプレートのウェルに添加したが、Ｅプレートには添加しなかった。９６ウェルプレート中の細胞をインキュベータ（３７℃、５％CO_2）中で２日間培養した。培養の最後の４時間の間に、２０μＬのＧｏｌｇｉ－Ｐｌｕｇ（

ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５５５０２９、最終希釈１：１，１００）を添加した。培養終了時に、細胞を蛍光色素標識抗ＣＤ８α抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６４１１６、２％ＥＤＴＡ［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号０３６９０］および５％ＦＢＳ［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｆ７５２４］を含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水［ＤＰＢＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号１４１９０２５０］で１：４００希釈）で染色し、２％Ｈｉｓｔｏｆｉｘ（Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ　ＧｍｂＨ、カタログ番号Ｐ０８７．４、ＰＢＳで希釈）で固定し、蛍光色素標識抗ＧｚｍＢ抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６１１４２；透過化緩衝液［Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号００－８３３３－５６］で１：３００希釈）で細胞内染色した。フローサイトメトリデータをＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃｅｌｅｓｔａフローサイトメータ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で取得し、ＦｌｏｗＪｏ（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ　Ｉｎｃ．）で分析した。

【０７１９】

Ｅプレート中の細胞を、ｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅリアルタイム細胞分析装置内で、外乱なしで５～６日間培養し、２～３時間間隔でインピーダンス測定を行った。インピーダンス測定値を細胞指数値として表した。細胞指数は、接着性腫瘍細胞単層の総面積と相関する。したがって、腫瘍細胞のみと比較してＴ細胞／腫瘍細胞共培養物の細胞指数が低いことは、腫瘍細胞の死滅を示す。各条件についての細胞指数を、Ｔ細胞／腫瘍細胞共培養が開始された時点に対して正規化した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して、経時的な正規化された細胞指数曲線を可視化した。

【０７２０】

ドナー全体および全アッセイ期間にわたるリアルタイム細胞分析データのプール評価のために、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して曲線下面積（ＡＵＣ）を計算した。共培養の開始から終了までの正規化された細胞指数データをＡＵＣ分析に使用した。各処置群のＡＵＣを、ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲで処理した共培養物のＡＵＣに対して正規化した。

【０７２１】

結果

図１６Ａは、その同族抗原を発現する腫瘍細胞と共培養した場合、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞がＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢの発現を上方制御したことを示す。図１６は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲがＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢ発現を用量依存的に増強したのに対して、一価対照抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲは、非結合対照抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲよりも発現レベルを増加させなかったことを示す。表７は、ＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢ発現のｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ媒介増加のＥＣ$_{50}$値がサブナノモル濃度範囲であったことを示す：ＣＤ１０７ａについては０．１８±０．１０ｎＭおよびＧｚｍＢについては０．１２±０．０２ｎＭ（ｎ＝５～６人のドナーの平均±ＳＤ）。０．２および０．８μｇ／ｍＬのｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ濃度では、ＣＤ１０７ａおよびＧｚｍＢ発現レベルの増加は、両方の一価対照抗体と比較して統計学的に有意であった。

【０７２２】

図１７は、抗原刺激ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞が、単独で培養した腫瘍細胞と比較して、非結合対照抗体ｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲで処理したＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞／腫瘍細胞共培養物の細胞指数値が低いことによって示されるように、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１＿ｈＣＬＤＮ６＿ｈＥｐＣＡＭ細胞に対して細胞傷害活性を示したことを示す。ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲは、ｂｓＩｇＧ－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲと比較してＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞媒介性細胞傷害活性を用量依存的に増強し、最大効果は≧０．２μｇ／ｍＬの濃度で観察された

。対照的に、一価対照抗体ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ｂ１２－ＦＥＡＲおよびｂｓＩｇＧ１－ｂ１２－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲは、細胞傷害活性に大きな影響を及ぼさなかった。０．２および０．８μｇ／ｍＬのｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ濃度では、細胞傷害活性の増加は、両方の一価対照抗体と比較して統計学的に有意であった。

【０７２３】

【表１２】

表7. CD8＋T細胞によるCD107aおよびGzmB発現のEC50値

ドナー番号	EC_{50} CD107a GMFI (μg/mL)	EC_{50} GzmB GMFI (μg/mL)
1	0.0503	0.0179
2	0.0300	0.0176
3	0.0217	0.0204
4	0.0120	0.0121
5	N/A[a]	0.0201
6	0.0210	0.0224
平均 ± SD (μg/mL)	0.0270 ± 0.0145	0.0184 ± 0.0036
平均 ± SD (nM)	0.1834 ± 0.0986	0.1226 ± 0.0237

[a)] シグモイド用量反応曲線が得られなかったので、EC_{50}値は決定しなかった。

EC_{50}＝最大半量有効濃度；GMFI＝幾何平均蛍光強度；
GzmB＝グランザイムB；N／A＝該当せず；SD＝標準偏差。

【０７２４】

実施例１４：異なるＦｃ不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡ、ＦＥＲ／ＦＥＲ）を有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体のＦｃγＲおよびＦｃＲｎへの結合

ＦｃγＲおよびＦｃＲｎ結合に対するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体中のＦｃ不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡ、ＦＥＲ／ＦＥＲ）の異なる組合せの効果を、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって分析した。

【０７２５】

方法

固定化されたヒト組換えＦｃγＲ変異体（ＦｃγＲＩａ、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂおよびＦｃγＲＩＩＩａ）への様々なＦｃ不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡ、ＦＥＲ／ＦＥＲ）を有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の結合を、Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ　ＳＰＲシステムを使用してＳＰＲによって分析した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓ　Ｓｅｎｓｏｒ　Ｃｈｉｐｓ　ＣＭ５（Ｃｙｔｉｖａ、カタログ番号２９１０４９８８）を、アミンカップリングおよびＨｉｓ捕捉キット（Ｃｙｔｉｖａ、カタログ番号ＢＲ１０００５０およびカタログ番号２９２３４６０２）を製造業者の指示に従って使用して、抗ヒスチジン（Ｈｉｓ）抗体で共有結合的に被覆した。

【０７２６】

Ｈｉｓタグ付きＦｃγＲタンパク質（表８）のアリコートをＨＢＳ－ＥＰ＋（Ｃｙｔｉｖａ、カタログ番号ＢＲ１００６６９）で希釈し、流量１０μＬ／分および接触時間６０秒で抗Ｈｉｓ被覆したセンサチップの表面上に捕捉するために使用した。これにより、約２１５～３６５共鳴単位（ＲＵ）の捕捉レベルが得られた。

【０７２７】

ＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液の３回の開始サイクルの後、表９に示す抗体範囲を使用して、抗体（ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ、ＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／Ｃ

Ｄ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＲＲ、ＩｇＧ１－ｂ１２）を注入して結合曲線を作成した。ＦｃγＲが捕捉された表面（活性表面）で分析した各試料を、ＦｃγＲが捕捉されていない平行フローセル（基準表面）でも分析し、バックグラウンド補正に使用した。

【０７２８】

各サイクルの最後に、１０ｍＭグリシン－ＨＣｌ　ｐＨ１．５（Ｃｙｔｉｖａ、カタログ番号ＢＲ１００３５４）を使用して表面を再生した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア（Ｃｙｔｉｖａ）を使用してセンサグラムを作成し、エンドポイント測定（結合プラトー対捕捉後ベースライン）に４パラメータロジスティックフィットを適用して、野生型Ｆｃ領域を有するＩｇＧ１－ｂ１２抗体に対するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体の相対結合を計算した。

【０７２９】

【表１３】

表8. SPRに使用された組換えヒトFcγRタンパク質

名称	説明	SinoBiological カタログ番号	被覆濃度
FcγRIa	CD64 タンパク質、ヒト、組換え（His タグ）、ビオチン化	10256-H08S-B	70 nM
FcγRIIa-H131	CD32A タンパク質、ヒト、組換え（167 His、His タグ）	10374-H08H1	160 nM
FcγRIIa-R131	CD32A タンパク質、ヒト、組換え（167 Arg、His および AVI タグ）、	10364-H27H	70 nM
FcγRIIb	CD32B/Fcgr2b タンパク質、ヒト、組換え（His および AVI タグ）	10259-H27H	70 nM
FcγRIIIa-V158	CD16a タンパク質、ヒト、組換え（176 Val、His および AVI タグ）	10389-H27H1	110 nM
FcγRIIIa-F158	CD16a タンパク質、ヒト、組換え（ECD、176 Phe、His および AVI タグ）	10389-H27H	150 nM

【０７３０】

【表１４】

表9. SPRにおける個々のFcγRの試験条件

FcγR	試験した抗体濃度範囲		
	開始濃度 (nM)	最低濃度 (nM)	希釈倍率
FcγRIa	3,000	0.02	1:3
FcγRIIa-H131	10,000	0.42	1:2.5
FcγRIIa-R131	10,000	0.42	1:2.5
FcγRIIb	10,000	4.88	1:2
FcγRIIIa-V158	10,000	0.06	1:3
FcγRIIIa-F158	10,000	0.42	1:2.5

【０７３１】

別の実験では、新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）への結合を、上記の方法に以下の変更を加えた動態アッセイを使用してＳＰＲによって試験した。Ｈｉｓタグ付きＦｃＲｎ（ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ、カタログ番号ＣＴ００９－Ｈ０８Ｈ－Ｂ）を、ＰＢＳ－Ｐ＋緩衝液（Ｃｙｔｉｖａ、カタログ番号２８９９５０８４）中で５ｎＭ（ｐＨ６．０の場合）または７．３ｎＭ（ｐＨ７．４の場合）に希釈した。ＩｇＧ１－ｂ１２についての抗体濃度曲線は０～１００ｎＭであり、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ

およびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲについては０～５００ｎＭであった。実験は、ｐＨ６．０（ＩｇＧがＦｃＲｎに結合する酸性条件下）で３回およびｐＨ７．４（このｐＨではＩｇＧへの結合は予想されない）で２回行った。

【０７３２】

結果

図１８は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＬ／ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＡＲ、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＲＲの、ＦｃγＲＩａ、ＦｃγＲＩＩａ（Ｈ１３１変異体またはＲ１３１変異体のいずれか）、ＦｃγＲＩＩｂおよびＦｃγＲＩＩＩａ（Ｆ１５８変異体またはＶ１５８変異体のいずれか）への結合が検出されなかったことを示す。さらに、モノクローナル抗体ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲもまた、これらのＦｃγＲへの結合を全く示さなかった。対照的に、陽性対照抗体ＩｇＧ１－ｂ１２は、試験した全てのＦｃγＲに対して用量依存的な結合を示した。

【０７３３】

表１０は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲ、ＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬおよびＩｇＧ１－ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲのＦｃＲｎへの結合が、それぞれ３１２ｎＭ、２３０ｎＭおよび３７５ｎＭの平均結合親和性（K_D）で保持されたことを示す。野生型ＩｇＧ１骨格を有するＩｇＧ１－ｂ１２の親和性は２９ｎＭ（K_D）と決定された。ｐＨ７．４では、試験した抗体のいずれについてもＦｃＲｎへの結合は観察されなかった。

【０７３４】

結論として、異なる不活性変異（ＦＥＲ／ＦＥＡ、ＦＥＡ／ＦＥＡまたはＦＥＲ／ＦＥＲ）を含有するＥｐＣＡＭｘ４－１ＢＢ二重特異性抗体はいずれも、ＳＰＲによるＦｃγＲへの結合を示さなかったが、ＦｃＲｎへの結合は保持された。

【０７３５】

【表１５】

表10．異なるFc不活性変異（FER／FEA、FEAまたはFER）を有する抗体のFcRnへの結合

抗体	会合定数 (k_a) ($M^{-1}s^{-1}$)	解離定数 (k_d) (s^{-1})	平均結合親和性(K_D)
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR	1.59E+05	4.89E-02	312 nM
IgG1-EpCAM-A37-FERL	1.80E+05	4.13E-02	230 nM
IgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAR	1.43E+05	5.39E-02	375 nM
IgG1-b12	1.10E+06	3.22E-02	29 nM

【０７３６】

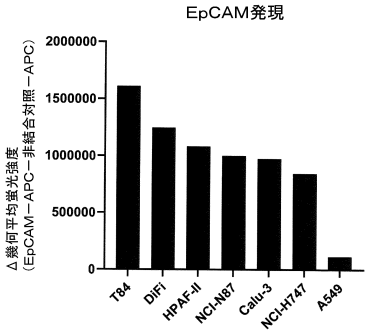
実施例１５：カニクイザルにおけるｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの非臨床毒性試験

カニクイザルにおいてｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲの毒性評価を行った。臨床徴候、体重、ＥＣＧ、トキシコキネティクス、免疫表現型検査、臨床化学パラメータ（リパーゼおよびアミラーゼを含む）、肉眼剖検および組織病理学を調べることによって毒性を評価した。予備的結果は、ｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲを１週間間隔で最大５回静脈内投与した場合、最大５０ｍｇ／ｋｇの用量が十分に忍容されたことを示している。３回目以降の注入の４時間後に血漿中ＩＬ－６、ＭＣＰ－１およびＭＩＰ－１ｂレベルの非有害な一過性増加のみが観察され、これは投与後２４時間

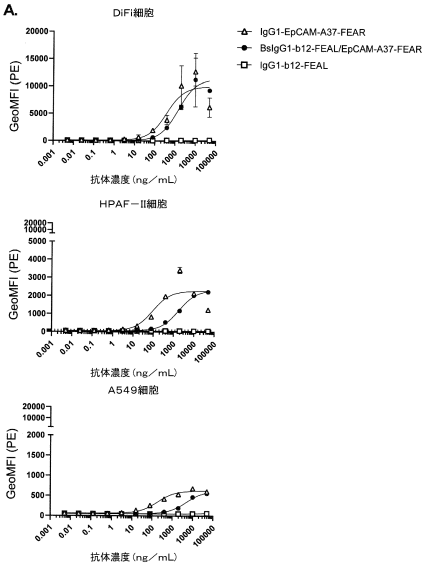
までに消散した。結論として、試験したパラメータのいずれについても最大５０ｍｇ／ｋｇまで有害作用はなく、したがってｂｓＩｇＧ１－ＥｐＣＡＭ－Ａ３７－ＦＥＲＬ／ＣＤ１３７－００９－ＨＣ７ＬＣ２－ＦＥＡＲは許容される非臨床安全性プロファイルを誘発するようであり、Ｆｉｒｓｔ－ｉｎ－Ｈｕｍａｎ臨床試験におけるそのさらなる試験を裏付ける。

【図面】

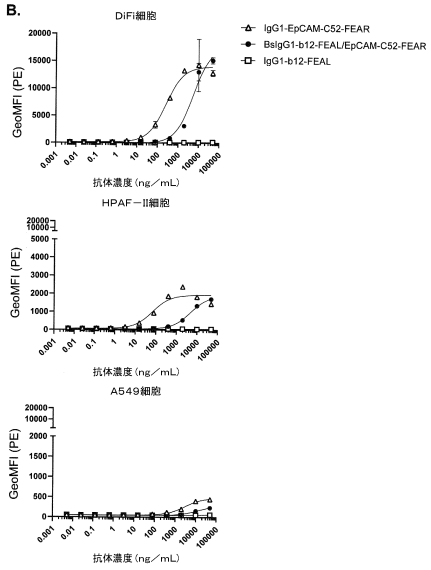
【図１】



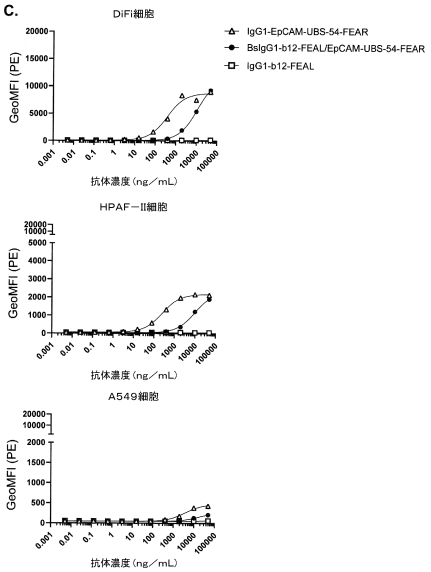
【図２Ａ】



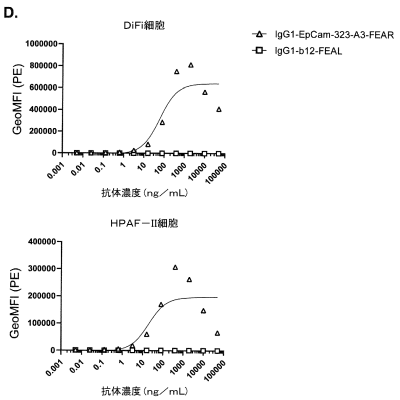
【図２Ｂ】



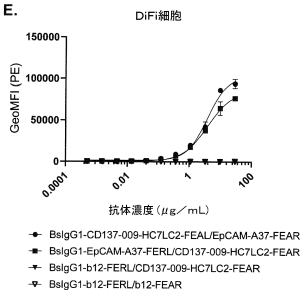
【図２Ｃ】



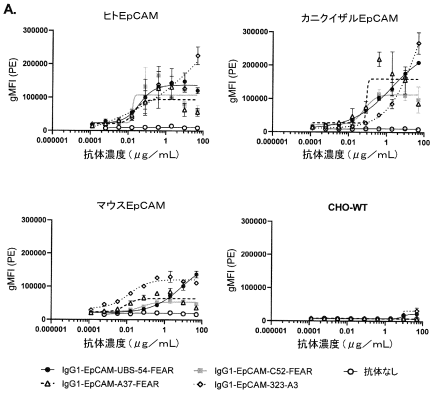
【図２Ｄ】



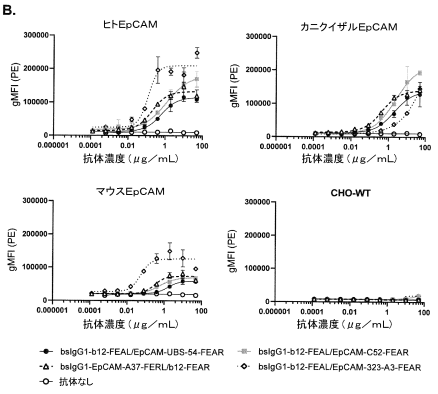
【図２Ｅ】



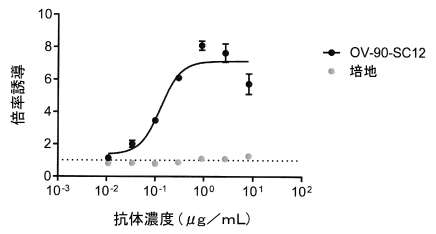
【図３Ａ】



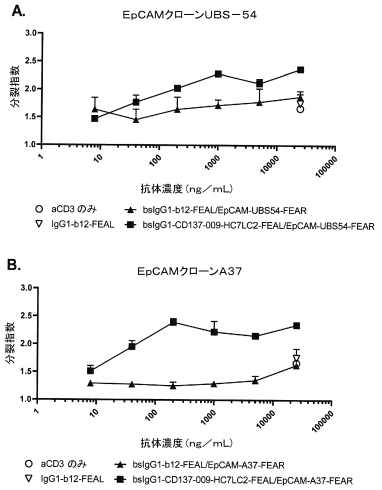
【図３Ｂ】



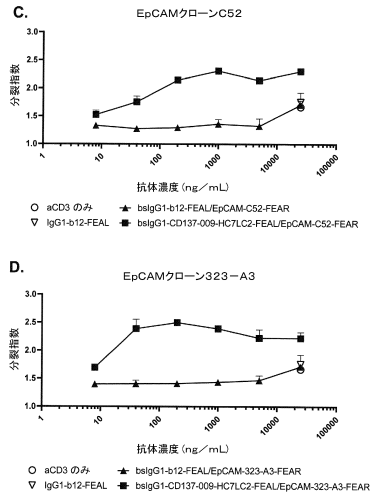
【図４】



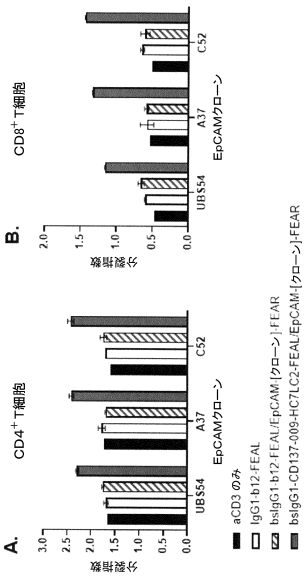
【図５ＡＢ】



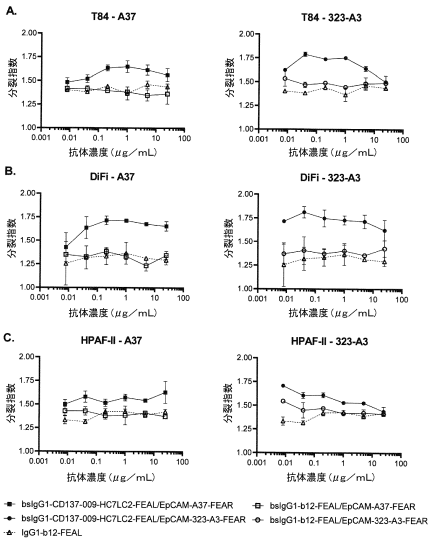
【図５ＣＤ】



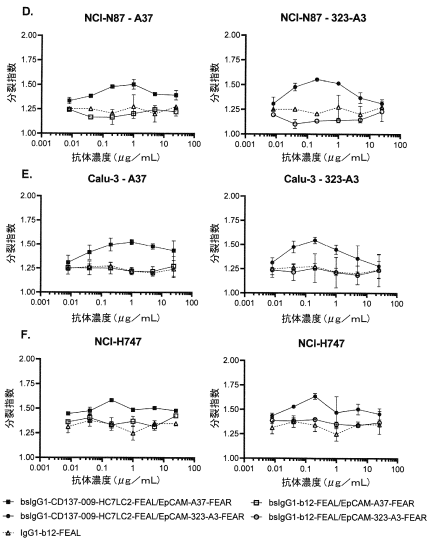
【図６】



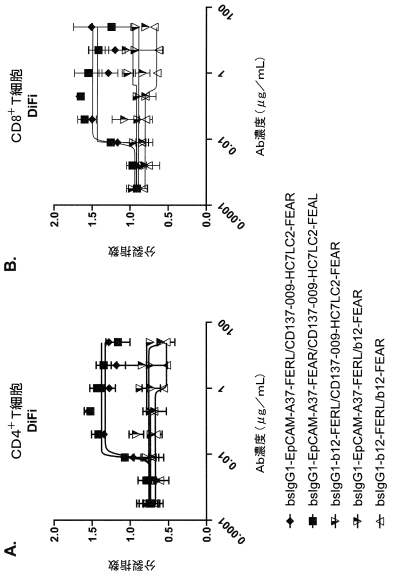
【図７ＡＢＣ】



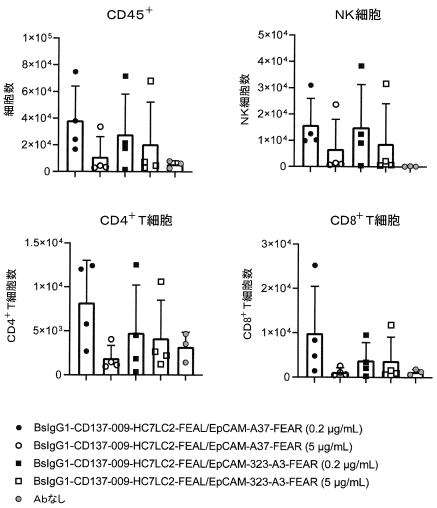
【図７ＤＥＦ】



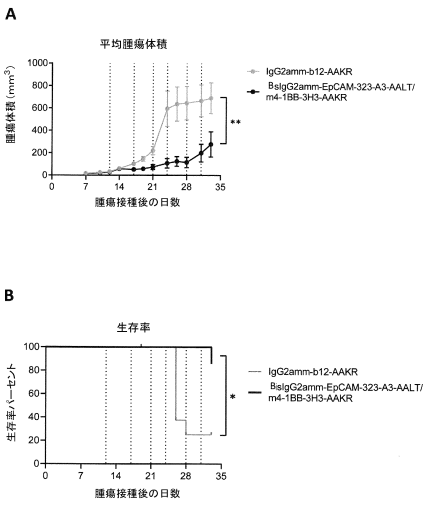
【図８】


A.
CD4+ T細胞
DiFi
B.
CD8+ T細胞
DiFi
分裂指数
Ab濃度（μg／mL）
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FEAR/CD137-009-HC7LC2-FEAL
bsIgG1-b12-FERL/CD137-009-HC7LC2-FEAR
bsIgG1-EpCAM-A37-FERL/b12-FEAR
bsIgG1-b12-FERL/b12-FEAR

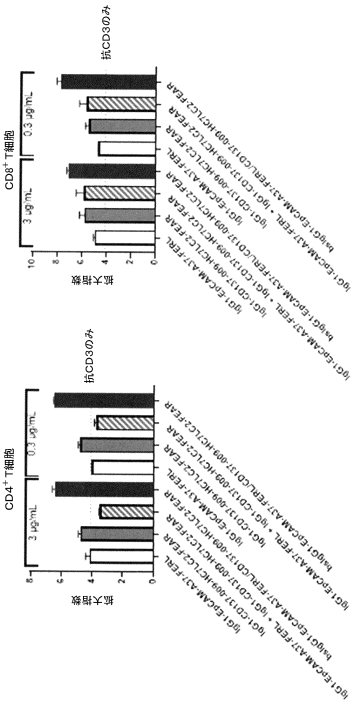
【図９】


CD45+
NK細胞
CD4+ T細胞
CD8+ T細胞
細胞数
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR (0.2 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-A37-FEAR (5 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR (0.2 μg/mL)
BsIgG1-CD137-009-HC7LC2-FEAL/EpCAM-323-A3-FEAR (5 μg/mL)
Abなし

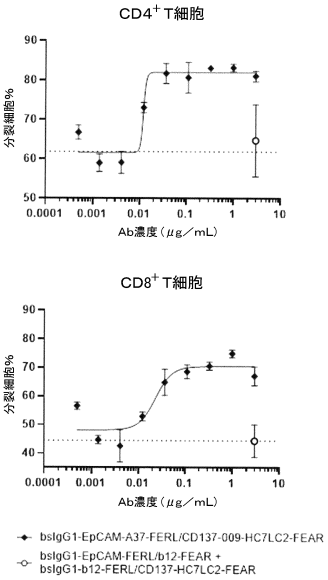
【図１０】


A
平均腫瘍体積
腫瘍体積（mm3）
IgG2amm-b12-AAKR
BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/
m4-1BB-3H3-AAKR
腫瘍接種後の日数
B
生存率
生存率（パーセント）
IgG2amm-b12-AAKR
BsIgG2amm-EpCAM-323-A3-AALT/
m4-1BB-3H3-AAKR
腫瘍接種後の日数

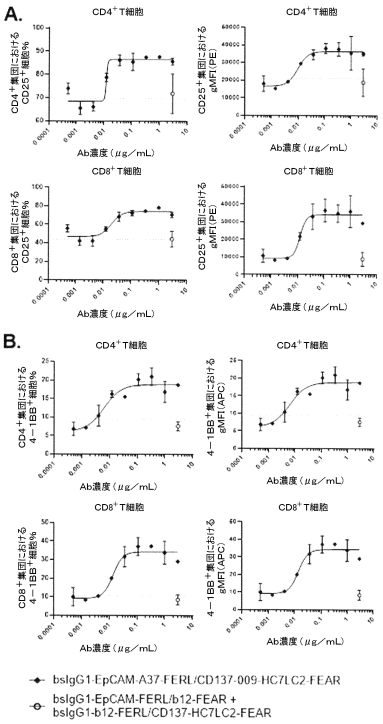
【図１１】


抗CD3のみ
CD8+ T細胞
0.3 μg/mL
3 μg/mL
拡大指数
抗CD3のみ
CD4+ T細胞
0.3 μg/mL
3 μg/mL
拡大指数

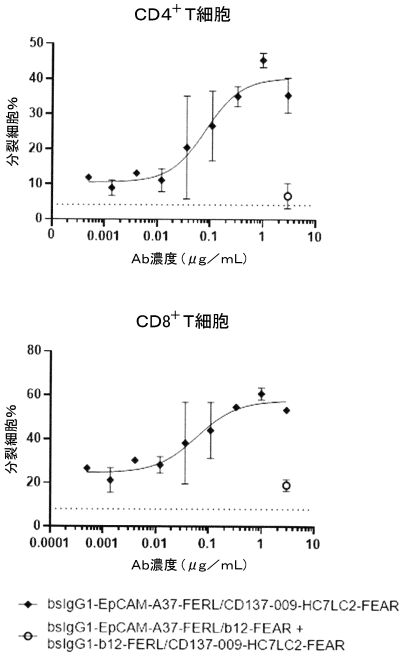
【図１２】



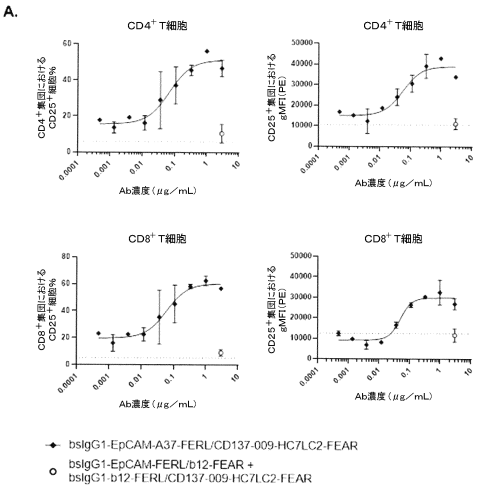
【図１３】



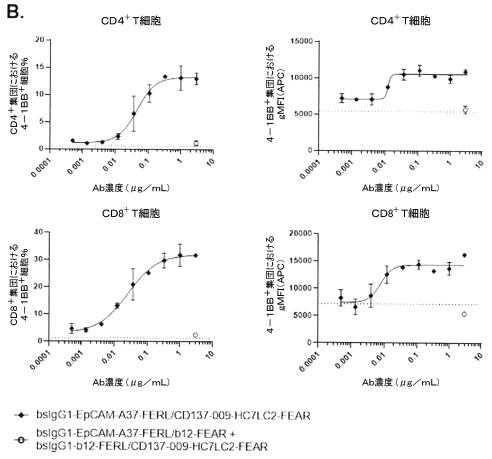
【図１４】



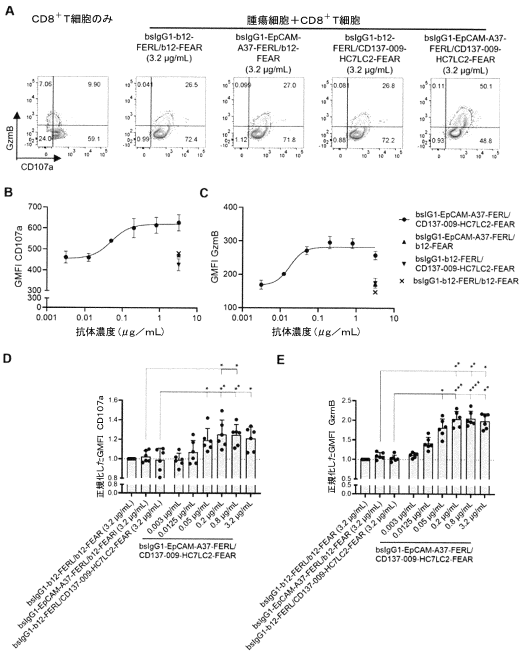
【図１５Ａ】



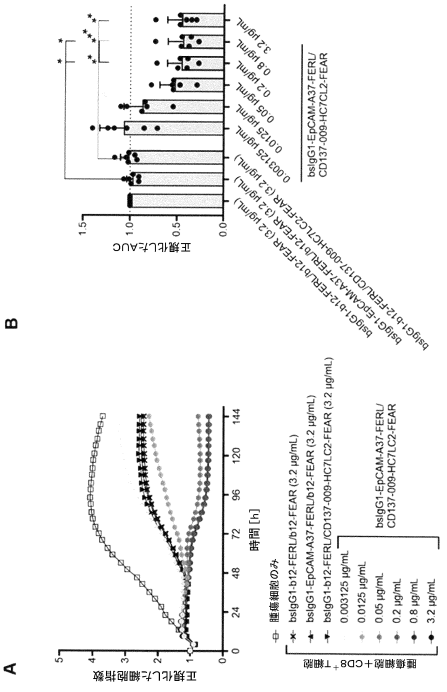
【図１５Ｂ】



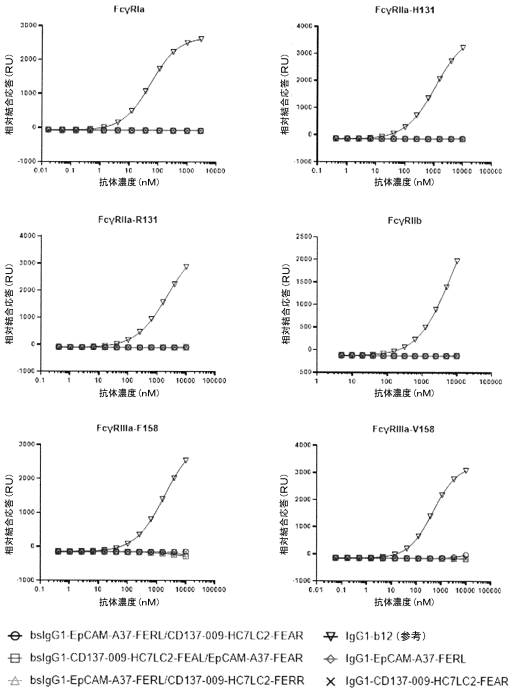
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】
20255095550000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/30 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/182672 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB [SE]) 26 October 2017 (2017-10-26)	1-12, 14-17, 19-27, 29-32, 34, 36-38, 41,43, 45,59, 96-105
Y	legend to Fig. 25; page 51, lines 16-18 example 31 page 104, line 29 tables 21, 8 example 8	13,18, 28,33, 35,58

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 June 2023	03/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bumb, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHRISTIAN KLEIN ET AL: "Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies", MABS, vol. 4, no. 6, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 653-663, XP055106060, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21379 figure 2	1-45, 58-60, 96-105
Y	AU 2005 232 313 A1 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]) 8 December 2005 (2005-12-08) figure 2	13,18, 35,58
Y	WO 2019/025545 A1 (GENMAB AS [DK]; BIONTECH AG [DE]) 7 February 2019 (2019-02-07) examples 8, 13 sequences 15,16	28,33, 35,58
T	STEFFEN DICKOPF ET AL: "Format and geometries matter: Structure-based design defines the functionality of bispecific antibodies", COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 18, 14 May 2020 (2020-05-14), pages 1221-1227, XP055740966, Sweden ISSN: 2001-0370, DOI: 10.1016/j.csbj.2020.05.006 the whole document	1-45, 58-60, 96-105
X	WO 2022/002038 A1 (HARBOUR BIOMED SHANGHAI CO LTD [CN]) 6 January 2022 (2022-01-06)	1-12, 14-17, 19-27, 29-32, 34,39, 40,43, 59, 96-105
Y	examples 4.1.4, 6.5, 7.3	13,18, 28,33, 35,58

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/056513

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/056513

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
5-35, 42-44, 58-60(completely); 1-4, 36-41, 45, 96-105(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2023/056513

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 5-35, 42-44, 58-60(completely); 1-4, 36-41, 45, 96-105(partially)

A binding agent comprising a first antigen-binding region binding to EpCAM and a second antigen-binding region binding to CD137, further defined in terms of comprising V-regions sequences (CDRs, VH, VL sequences):
SUB-INVENTION 1.1
A binding agent comprising a first antigen-binding region binding to EpCAM and a second antigen-binding region binding to CD137, further defined in terms if comprising specific CDR or V-region sequences against EpCam.
Since EpCam binding regions of EpCam x CD137 bsAbs are already known these features relate to the technical problem of providing new EpCam-binding regions for such bsAbs.
SUB-INVENTION 1.2
A binding agent comprising a first antigen-binding region binding to EpCAM and a second antigen-binding region binding to CD137, further defined in terms if comprising specific CDR or V-region sequences against CD137.
Since CD137- binding regions of EpCam x CD137 bsAbs are already known these features relate to the technical problem of providing new CD137-binding regions for such bsAbs.

---

2. claims: 46-57, 61-95(completely); 1-4, 36-41, 45, 96-105(partially)

A binding agent comprising a first antigen-binding region binding to EpCAM and a second antigen-binding region binding to CD137, further defined in terms of comprising Fc-modifications
SUB-INVENTION 2.1
wherein the Fc-modification are asymmetric CH3-modifications.
SUB-INVENTION 2.2
wherein the Fc-modification reduce effector functions.
SUB-INVENTION 2.3
wherein EU-positions L234, L235, D265, N297, P331, G236 in huIgG1 are not L, L, D, N, P, G, respectively.
Note: it is completely unclear what effect the L234F/L235E substitutions are supposed to have. This is explained NOWHERE in the specification. Hence, it is completely unclear whether this coincides with subinvention 2.2.
Corresponding monospecific EpCam-binding agent comprising L234F, L235E, G236R.
Corresponding monospecific CD137-binding agent comprising L234F, L235E, G236R.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/056513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017182672 A1	26-10-2017	AU 2017252233 A1	15-11-2018
		BR 112018071612 A2	19-02-2019
		CA 3021618 A1	26-10-2017
		CN 109195994 A	11-01-2019
		DK 3445788 T3	11-04-2022
		EP 3445788 A1	27-02-2019
		ES 2910365 T3	12-05-2022
		IL 262482 A	31-12-2018
		JP 2019523630 A	29-08-2019
		JP 2022058338 A	12-04-2022
		KR 20180135454 A	20-12-2018
		RU 2018139339 A	22-05-2020
		US 2019169308 A1	06-06-2019
		US 2022213213 A1	07-07-2022
		WO 2017182672 A1	26-10-2017
AU 2005232313 A1	08-12-2005	NONE	
WO 2019025545 A1	07-02-2019	AU 2018309339 A1	20-02-2020
		BR 112020001944 A2	04-08-2020
		CA 3071211 A1	07-02-2019
		CN 111406067 A	10-07-2020
		CN 116333131 A	27-06-2023
		EP 3661960 A1	10-06-2020
		IL 272159 A	31-03-2020
		JP 7290013 B2	13-06-2023
		JP 2020529438 A	08-10-2020
		JP 2023100942 A	19-07-2023
		KR 20200064062 A	05-06-2020
		MA 49753 A	10-06-2020
		SG 11202000198Q A	27-02-2020
		US 2020165349 A1	28-05-2020
		US 2021163616 A1	03-06-2021
		US 2021269541 A1	02-09-2021
		US 2021277133 A1	09-09-2021
		US 2023087745 A1	23-03-2023
		WO 2019025545 A1	07-02-2019
WO 2022002038 A1	06-01-2022	CN 115698088 A	03-02-2023
		EP 4174092 A1	03-05-2023
		TW 202202524 A	16-01-2022
		WO 2022002038 A1	06-01-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人 100110928
弁理士 速水 進治
(72)発明者 イオアン， アンドレア
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 ブライジ， エスター コーネリア ウィルヘルミナ
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 ゲレン， ラース
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 サティン， デビッド ピー． イー．
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 サヒン， ウグル
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ アン デル ゴールドグルーベ １２ バイオエヌテックエスエー内
(72)発明者 ミューク， アレクサンダー
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ アン デル ゴールドグルーベ １２ バイオエヌテックエスエー内
(72)発明者 ショーデル， クリスティーナ
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ アン デル ゴールドグルーベ １２ バイオエヌテックエスエー内
(72)発明者 フェラーマイヤー－コップフ， ジーナ
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ アン デル ゴールドグルーベ １２ バイオエヌテックエスエー内
(72)発明者 デ クルック， バート－ヤン
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 ヒバート， リチャード
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 シューマン， ジャニーン
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者 ラブリン， アラン フランク
オランダ王国 ３５８４ シーティー ユトレヒト ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内

Ｆターム（参考） 4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA51 FA74 GA26