(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公開特許公報(A)　　(11)公開番号
特開2024-28811
(P2024-28811A)
(43)公開日　令和6年3月5日(2024.3.5)

(51)国際特許分類　　FI
C07K 16/00 (2006.01)　　C07K 16/00　　ZNA
C07K 16/46 (2006.01)　　C07K 16/46

審査請求　有　請求項の数　1　　OL　外国語出願　（全72頁）

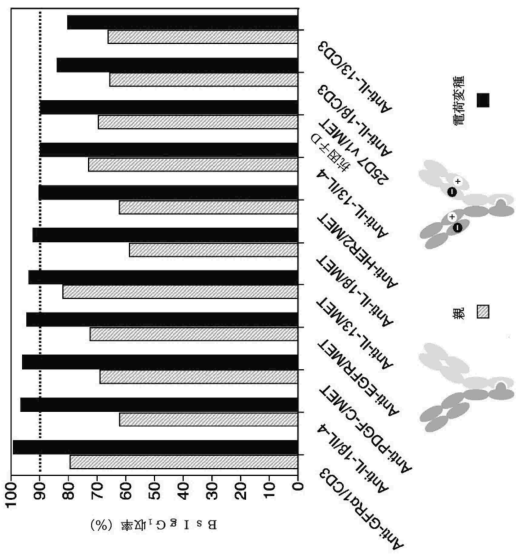
(21)出願番号　特願2023-203630(P2023-203630)
(22)出願日　令和5年12月1日(2023.12.1)
(62)分割の表示　特願2021-565744(P2021-565744)の分割
原出願日　令和2年5月7日(2020.5.7)
(31)優先権主張番号　62/845,594
(32)優先日　令和1年5月9日(2019.5.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ
２．ＴＲＩＴＯＮ

(71)出願人　509012625
ジェネンテック， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ １
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　ジョシ， カマル キショール
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者　カーター， ポール ジェー．
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， デ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗体の作製方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】抗体（例えば、二重特異性抗体）の重鎖と軽鎖との対合を改善する方法を提供する。そのような方法、ライブラリ、およびそのようなライブラリをスクリーニングする方法を使用して生成された抗体（例えば、二重特異性抗体）も提供する。
【解決手段】抗体の重鎖と軽鎖との優先的対合を改善する方法であって、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）の９４位またはＶＬの９６位の少なくとも１つのアミノ酸を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）からなる群から選択される荷電残基に置換するステップを含み、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている、方法である。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体の重鎖と軽鎖との優先的対合を改善する方法であって、軽鎖可変ドメイン（V_L）の９４位またはV_Lの９６位の少なくとも１つのアミノ酸を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）からなる群から選択される荷電残基に置換するステップを含み、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている、方法。
【請求項２】
前記９４位および９６位のアミノ酸のそれぞれを非荷電残基から荷電残基に置換するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記９４位のアミノ酸がＤに置換される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記９６位のアミノ酸がＲに置換される、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記９４位のアミノ酸がＤに置換され、前記９６位のアミノ酸がＲに置換される、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸が、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）からなる群から選択される荷電残基に置換され、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記V_Lの前記９４位のアミノ酸がＤに置換され、前記V_Lの前記９６位のアミノ酸がＲに置換され、前記V_Hの前記９５位のアミノ酸がＤに置換される、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記抗体を少なくとも１つの親和性成熟ステップに供することをさらに含み、前記V_Lの前記９４位の置換されたアミノ酸がランダム化されていない、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記V_Lの前記９６位の置換されたアミノ酸がランダム化されていない、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記V_Hの前記９５位の置換されたアミノ酸がランダム化されていない、請求項８または９に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗体が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、１アーム抗体、およびｓｃＦｖからなる群から選択される抗体断片、またはＦｖである、請求項１から１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗体が、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域が、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３またはヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域である、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】
前記抗体が単一特異性抗体である、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記抗体が多重特異性抗体である、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記多重特異性抗体が二重特異性抗体である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記二重特異性抗体が、第１のＣＨ２ドメイン（ＣＨ２$_1$）、第１のＣＨ３ドメイン（ＣＨ３$_1$）、第２のＣＨ２ドメイン（ＣＨ２$_2$）および第２のＣＨ３ドメインを含み、
ＣＨ３$_2$が、ＣＨ３$_1$／ ＣＨ３$_2$ 界面内で、１つ以上 のアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基に置換され、それにより、ＣＨ３$_1$と相互作用するＣＨ３$_2$の表面上に突起を生成するように変更され、かつ
ＣＨ３$_1$が、ＣＨ３$_1$／ＣＨ３$_2$ 界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有する置換されたアミノ酸残基に置換され、それにより、ＣＨ３$_2$と相互作用するＣＨ３$_1$の表面上に空洞を生成するように変更される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１９】
前記二重特異性抗体が、第１のＣＨ２ドメイン（ＣＨ２$_1$）、第１のＣＨ３ドメイン（ＣＨ３$_1$）、第２のＣＨ２ドメイン（ＣＨ２$_2$）および第２のＣＨ３ドメインを含み、
ＣＨ３$_1$が、ＣＨ３$_1$／ＣＨ３$_2$界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基に置換され、それにより、ＣＨ３$_2$と相互作用するＣＨ３$_1$の表面上に突起を生成するように変更され、かつ
ＣＨ３$_2$が、ＣＨ３$_1$／ＣＨ３$_2$界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有する置換されたアミノ酸残基に置換され、それにより、ＣＨ３$_1$と相互作用するＣＨ３$_2$の表面上に空洞を生成するように変更される、請求項１４に記載の方法。
【請求項２０】
前記突起がノブ変異である、請求項１５または１６に記載の方法。
【請求項２１】
前記ノブ変異がＴ３６６Ｗを含み、アミノ酸番号付けがＥＵインデックスに従っている、請求項１７に記載の方法。
【請求項２２】
前記空洞が、ホール変異である、請求項１５から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ホール変異が、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てを含み、アミノ酸番号付けがＥＵインデックスに従っている、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
請求項１から２３のいずれか一項に記載の方法によって産生される抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年５月９日に出願された米国仮特許出願第６２／８４５，５９４号に対する優先権を主張するものであり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（ｃｏｍｐｕｔｅｒ ｒｅａｄａｂｌｅ ｆｏｒｍ：ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：１４６３９２０４７７４０ＳＥＱＬＩＳＴ．ＴＸＴ、データ記録日：２０２０年５月４日、サイズ：９ＫＢ）。

【背景技術】
【０００３】
ヒト疾患の治療剤としての二重特異性抗体の開発は、大きな臨床的可能性を有する。しかしながら、抗体重鎖が比較的無差別な様式で抗体軽鎖に結合するように進化しているので、ＩｇＧ形式の二重特異性抗体の産生は困難であった。この無差別な対合の結果として、単一細胞における２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖の同時発現は、天然では、例えば、重鎖ホモ二量体化および重鎖／軽鎖の対合のスクランブルをもたらす。
【０００４】
「ノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ）」として知られる重鎖ホモ二量体化の問題を回避するための１つのアプローチは、接触界面を改変するためにC_H3ドメインに突然変異を導入することによって２つの異なる抗体重鎖の対合を強制することを目的としている。１つの重鎖上で、元のアミノ酸を、短側鎖を有するアミノ酸に置換して「ホール」を作製した。逆に、大きな側鎖を有するアミノ酸を他のC_H3ドメインに導入して、「ノブ」を作製した。これらの２つの重鎖（および両方の重鎖に対して適切でなければならない２つの同一の軽鎖）を共発現させることにより、ホモ二量体形成（「ホール－ホール」または「ノブ－ノブ」）に対するヘテロ二量体形成（「ノブ－ホール」）の高収率が観察された（Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．９（１９９６）６１７－６２１、Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ「Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｒｏｕｔｅ ｔｏ ｈｕｍａｎ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ」．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９８、１６：６７７－８１、Ｊａｃｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｔｗｏ－ｐａｒｔ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｔｏ ｉｄｅｎｔｉｆｙ ａ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｈｕｍａｎ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｈａｔ ｉｎｈｉｂｉｔｓ ＩｇＥ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ．」Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２０１０、２８５：２０８５０－９、および国際公開第９６／０２７０１１号）。
【０００５】
重鎖／軽鎖のスクランブルを最小限に抑えることは、抗体Ｆａｂ内の複雑なマルチドメインヘテロ二量体相互作用のために、より困難であった。重鎖／軽鎖スクランブリングに対処することを目的とした二重特異性抗体フォーマットには、以下が含まれる、ＤＶＤ－Ｉｇ（二重可変ドメインＩｇ）（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２５，１２９０－１２９７（２００７））、クロスオーバーＩｇ（ＣＲＯＳＳＭＡＢ（商標））（Ｓｃｈａｅｆｅｒ Ｗ ｅｔ ａｌ（２０１１）ＰＮＡＳ １０８（２７）：１１１８７－１１１９２）、ツー－イン－ワンＩｇ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００９，３２３，１６１０）、ＢｉＴＥ（登録商標）抗体（ＰＮＡＳ ９２（１５）：７０２１－７０２５；１９９５）およびＬｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．２０１４）「Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ａｎ ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ Ｆａｂ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ」Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３２、１９１－８；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２０１５）「Ａ Ｎｏｖｅｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ Ｍａｋｉｎｇ Ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｃ ＩｇＧ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ Ｅｌｅｃｔｒｏｓｔａｔｉｃ Ｓｔｅｅｒｉｎｇ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ．」Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．オンライン公開２０１５年１月１２日、ｄｏｉ：１０．１０７４／ｊｂｃ．Ｍ１１４．６２０２６０；Ｍａｚｏｒ ｅｔ ａｌ．、２０１５．「Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｔａｒｇｅｔ ｃｅｌｌ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｕｓｉｎｇ ａ ｎｏｖｅｌ ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ ｄｅｓｉｇｎ．」Ｍａｂｓ．オンライン公開２０１５年１月２６日、ｄｏｉ：１０．１０８０／１９４２０８６２．２０１５．１００７８１６、国際公開第２０１４／０８１９５５号、国際公開第２０１４／０８２１７９号、国際公開第２０１４／１５０９７３号に記載されている戦略。
【０００６】

それにもかかわらず、当技術分野では、誤対合した重鎖／軽鎖副産物を減少させ、正しく集合した二重特異性抗体の収率を上昇させる方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

抗体の重鎖と軽鎖との優先的対合を改善する方法であって、軽鎖可変ドメイン（V_L）の９４位またはV_Lの９６位の少なくとも１つのアミノ酸を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）からなる群から選択される荷電残基に置換するステップを含み、アミノ酸番号付けがＫａｂａｔに従っている、方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、９４位および９６位のアミノ酸のそれぞれを非荷電残基から荷電残基に置換するステップを含む。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸はＤに置換される。いくつかの実施形態において、９６位のアミノ酸はＲに置換される。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸はＤに置換され、９６位のアミノ酸はＲに置換される。いくつかの実施形態において、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸は、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）、およびリジン（Ｋ）からなる群から選択される荷電残基に置換され、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、V_Lの９４位のアミノ酸はＤに置換され、V_Lの９６位のアミノ酸はＲに置換され、V_Hの９５位のアミノ酸はＤに置換される。

【０００８】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法は、抗体（例えば、重鎖と軽鎖の優先的対合を改善するように改変された抗体）を少なくとも１つの親和性成熟ステップに供することをさらに含み、ここで、V_Lの９４位の置換されたアミノ酸はランダム化されない。追加的または代替的に、いくつかの実施形態において、V_Lの９６位の置換されたアミノ酸はランダム化されない。追加的または代替的に、いくつかの実施形態において、V_Hの９５位の置換されたアミノ酸はランダム化されない。

【０００９】

いくつかの実施形態において、抗体は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、１アーム抗体、およびｓｃＦｖからなる群から選択される抗体断片、またはＦｖである。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態において、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域はヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３またはヒトＩｇＧ４Ｆｃ領域である。いくつかの実施形態において、抗体は、単一特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、多重特異性抗体である。

【００１０】

いくつかの実施形態において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、第１のC_H2ドメイン（C_H2_1）、第１のC_H3ドメイン（C_H3_1）、第２のC_H2ドメイン（C_H2_2）および第２のC_H3ドメインを含み；ここで、C_H3_2は、C_H3_1／C_H3_2界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基に置換され、それにより、C_H3_1と相互作用するC_H3_2の表面上に突起を生成するように変更され、かつ、C_H3_1は、C_H3_1／C_H3_2界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有する置換されたアミノ酸残基に置換される、それにより、C_H3_2と相互作用するC_H3_1の表面上に空洞を生成するように変更される。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、第１のC_H2ドメイン（C_H2_1）、第１のC_H3ドメイン（C_H3_1）、第２のC_H2ドメイン（C_H2_2）および第２のC_H3ドメインを含み；ここで、C_H3_1は、C_H3_1／C_H3_2界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基で置換され、それにより、C_H3_2と相互作用するC_H3_1の表面上に突起を生成するように変更され、かつ、C_H3_2は、C_H3_1／C_H3_2　界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有する置換されたアミノ酸残基に置換され、それにより、C_H3_1と相互作用するC_H3_2の表面上に空洞が生成され

るように変更される。いくつかの実施形態において、突起はノブ変異である。いくつかの実施形態において、ノブ変異は、Ｔ３６６Ｗを含み、アミノ酸番号付けは、ＥＵインデックスに従っている。いくつかの実施形態において、空洞は、ホール変異である。いくつかの実施形態において、ホール変異は、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖの少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てを含み、ここで、アミノ酸番号付けは、ＥＵインデックスに従っている。

【００１１】

本明細書中に記載の方法のいずれか１つ（または組み合わせ）によって産生される抗体も提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

図１Ａおよび図１Ｂは、抗ＬＧＲ５／抗ＩＬ４二重特異性抗体、すなわち低収率ＢｓＩｇＧの代表例についての高分解能液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）データを提供する。図１Ａは、電荷状態３８＋および３９＋の質量包絡線を示す。図１Ｂは、対応するデコンボリューションされたデータを示す。

【００１３】

図１Ｃおよび図１Ｄは、抗ＳＩＲＰα／抗ＩＬ４二重特異性抗体、すなわち中間収量ＢｓＩｇＧの代表例についての高分解能ＬＣＭＳデータを提供する。図１Ｃは、電荷状態３８＋および３９＋の質量包絡線を示す。図１Ｄは、対応するデコンボリューションされたデータを示す。

【００１４】

図１Ｅおよび図１Ｆは、抗Ｍｅｔ／抗ＤＲ５二重特異性抗体、すなわち高収率ＢｓＩｇＧの代表例についての高分解能ＬＣＭＳデータを提供する。図１Ｅは、電荷状態３８＋および３９＋の質量包絡線を示す。図１Ｆは、対応するデコンボリューションされたデータを示す。

【００１５】

図２は、C_H1／C_L電荷対置換変異を組み込むと、強い固有のＨＣ／ＬＣ対合優先性を示すＢｓＩｇＧの収率が上昇するかどうかを決定するために行った実験の結果を提供する。

【００１６】

図３は、抗ＥＧＦＲ／抗ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧおよび抗ＩＬ－４／抗ＩＬ－１３　ＢｓＩｇＧにおける優先的なＨＣ／ＬＣ対合の機構的基礎を調べるために行った実験の設計を示す。この実験の結果を表Ｃに示す。

【００１７】

図４Ａは、抗ＭＥＴ抗体オナルツズマブ（Ｍｅｒｃｈａｎｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　１１０：Ｅ２９８７－２９９６を参照）（配列番号１）および抗ＥＧＦＲ抗体Ｄ１．５（Ｓｃｈａｅｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　２０：４７２－４８６を参照）（配列番号２）の軽鎖可変ドメイン（V_L）のアラインメントを提供する。アミノ酸残基はＫａｂａｔに従って番号付けする。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ＩｎｔｅｒｅｓｔＢｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ：ＮＩＨ，１９９１の配列定義およびＣｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１９６：９０１－９１７の構造定義からのＣＤＲを網掛けで示す。

【００１８】

図４Ｂは、抗ＭＥＴ抗体オナルツズマブ（配列番号３）および抗ＥＧＦＲ抗体Ｄ１．５（配列番号４）の重鎖可変ドメイン（V_H）のアラインメントを提供する。アミノ酸残基はＫａｂａｔに従って番号付けする。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ＩｎｔｅｒｅｓｔＢｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ：ＮＩＨ，１９９１の配列定義およびＣｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１９６：９０１－９１７の構造定義からのＣＤＲを

網掛けで示す。

【００１９】

図５Ａは、ＢｓＩｇＧ収率に対する抗ＥＧＦＲ／抗ＭＥＴ二重特異性抗体の抗ＥＧＦＲアームの相補性決定領域（ＣＤＲ）Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の寄与を評価するために行った実験の結果を提供する。ＢｓＩｇＧ収率に対する抗ＥＧＦＲ／抗ＭＥＴ二重特異性抗体の抗ＭＥＴアームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の寄与を評価するために行った実験の結果も提供される。

【００２０】

図５Ｂは、ＢｓＩｇＧ収率に対する抗ＩＬ－４／抗ＩＬ－１３二重特異性抗体の抗ＩＬ－４アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の寄与を評価するために行った実験の結果を提供する。ＢｓＩｇＧ収率に対する抗ＩＬ－４／抗ＩＬ－１３二重特異性抗体の抗ＩＬ－１３アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の寄与を評価するために行った実験の結果も提供される。

【００２１】

図６は、抗ＥＧＦＲ／抗ＭＥＴ二重特異性抗体のＢｓＩｇＧ収率に対するＣＤＲ－Ｌ１＋ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｌ２＋ＣＤＲ－Ｈ２およびＣＤＲ－Ｌ３＋ＣＤＲ－Ｈ３の寄与を評価するために行った実験の結果を提供する。

【００２２】

図７は、ＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３接触残基を強調する抗ＭＥＴ　Ｆａｂ（ＰＤＢ　４Ｋ３Ｊ）のＸ線構造を提供する。

【００２３】

図８Ａは、抗ＩＬ－１３抗体レブリキズマブ（Ｕｌｔｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　４２５：１３３０－１３３９を参照）（配列番号５）および抗ＩＬ－４抗体１９Ｃ１１（Ｓｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２８８：２６５：８３－９３を参照）（配列番号６）の軽鎖可変ドメイン（V_L）のアラインメントを提供する。Ｋａｂａｔの配列定義およびＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋの構造定義からのＣＤＲを網掛けで示す。

【００２４】

図８Ｂは、抗ＩＬ－１３抗体レブリキズマブ（配列番号７）および抗ＩＬ－４抗体１９Ｃ１１（配列番号８）の重鎖可変ドメイン（V_H）のアラインメントを提供する。アミノ酸残基はＫａｂａｔに従って番号付けする。Ｋａｂａｔの配列定義およびＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋの構造定義からのＣＤＲを網掛けで示す。

【００２５】

図９は、ＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３接触残基を強調する抗ＩＬ－１３　Ｆａｂ（ＰＤＢ　４Ｉ７７）のＸ線構造を提供する。

【００２６】

図１０Ａは、（ａ）抗ＣＤ３／抗ＨＥＲ２二重特異性抗体の抗ＣＤ３アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＭＥＴのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換すること；（ｂ）抗ＣＤ３／抗ＨＥＲ２二重特異性抗体の抗ＨＥＲ２アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＭＥＴのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換すること、（ｃ）抗ＣＤ３／抗ＨＥＲ２二重特異性抗体の抗ＣＤ３アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＩＬ－１３のＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換すること、（ｄ）抗ＣＤ３／抗ＨＥＲ２二重特異性抗体の抗ＨＥＲ２アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＩＬ－１３のＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換することの、ＢｓＩｇＧ収率に対する影響を評価するために行った実験の結果を提供する。

【００２７】

図１０Ｂは、（ａ）抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２二重特異性抗体の抗ＶＥＧＦＡアームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＭＥＴのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換すること；（ｂ）抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２二重特異性抗体の抗ＡＮＧ２アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＭＥＴのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３で置換すること、

（ｃ）抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２二重特異性抗体の抗ＶＥＧＦＡアームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＩＬ－１３のＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３で置換すること、（ｄ）抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２二重特異性抗体の抗ＡＮＧ２アームのＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３を抗ＩＬ－１３のＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３に置換することの、ＢｓＩｇＧ収率に対する効果を評価するために行った実験の結果を提供する。

【００２８】

図１１は、以下の二重特異性抗体のＢｓＩｇＧ収率に対する鎖間ジスルフィド結合の寄与を評価するために行った実験の結果を提供する：（１）抗ＨＥＲ２／抗ＣＤ３、（２）抗ＶＥＧＦＡ／抗ＶＥＧＦＣ、（３）抗ＥＧＦＲ／抗ＭＥＴ、および（４）抗ＩＬ１３／抗ＩＬ－４。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

二重特異性抗体は、その二重特異性により、例えば、標的部位へのペイロードの送達、２つのシグナル伝達経路の同時遮断、腫瘍細胞への免疫細胞の送達などが可能になるため、有望なクラスの治療剤である。しかしながら、二重特異性抗体（例えば、二重特異性ＩｇＧまたは「ＢｓＩｇＧ」）の産生は、単一細胞における２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖の共発現が、例えば、重鎖ホモ二量体化および重鎖／軽鎖対合のスクランブルを天然ではもたらし得るために、技術的課題のままである。本明細書に記載の方法は、優先的な抗体重鎖／抗体軽鎖が、ＣＤＲ－Ｈ３およびＣＤＲ－Ｌ３における特定のアミノ酸位置の残基によって強く影響され得るという出願人の知見に基づいている。さらに、出願人は、他の無関係な抗体の対応するアミノ酸位置へのそのような残基の転移が、多くの場合、正しく集合したＢｓＩｇＧの収率を上昇させることを見出した。

【００３０】

別段の定義がない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，ＤＩＣＴＩＯＮＡＲＹ　ＯＦ　ＭＩＣＲＯＢＩＯＬＯＧＹ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，２Ｄ　Ｅｄ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９４）およびＨａｌｅ＆Ｍａｒｇｈａｍ，ＴＨＥ　ＨＡＲＰＥＲ　ＣＯＬＬＩＮＳ　ＤＩＣＴＩＯＮＡＲＹ　ＯＦ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｈａｒｐｅｒ　Ｐｅｒｅｎｎｉａｌ，ＮＹ（１９９１）は、本発明で使用される多くの用語の一般的な辞書を当業者に提供している。本明細書中に記載されるのと同様または等価の任意の方法および材料もまた、本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をここに記載する。数値範囲は、範囲を定義する数を含む。別段示されない限り、核酸は、５’から３’方向に左から右に書かれ；アミノ酸配列は、それぞれアミノからカルボキシへの方向で左から右に書かれている。専門家は、当技術分野の定義および用語については、特にＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９およびＡｕｓｕｂｅｌ　ＦＭ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３を対象とする。本発明は、記載する特定の方法論、プロトコル、および試薬に限定されるものではなく、これらは変化し得ることを理解されたい。

【００３１】

数値範囲は、範囲を定義する数を含む。

【００３２】

別段示されない限り、核酸は、５’から３’方向に左から右に書かれ；アミノ酸配列は、それぞれアミノからカルボキシへの方向で左から右に書かれている。

【００３３】

本明細書で提供される見出しは、全体として本明細書を参照することによって有することができる様々な態様または実施形態の限定ではない。したがって、すぐ下に定義される用語は、全体として本明細書を参照することによってより完全に定義される。

定義

【００３４】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性（例えば、エピトープ結合活性）を示す限り、２つの重鎖および２つの軽鎖を含む任意の免疫グロブリン（Ｉｇ）分子、ならびにその任意の断片、変異体、バリアントまたは誘導体を指す。抗体の例としては、本明細書に記載のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片が挙げられる。抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および／または親和性成熟抗体であり得る。

【００３５】

参照フレームとして、本明細書で使用される場合、免疫グロブリンは、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の構造を指す。しかしながら、当業者は、任意の免疫グロブリンクラスの抗体が、本明細書中に記載される本発明の方法において利用され得ることを理解／認識するであろう。明確にするために、ＩｇＧ分子は、一対の重鎖（ＨＣ）および一対の軽鎖（ＬＣ）を含む。各ＬＣは、１つの可変ドメイン（V_L）および１つの定常ドメイン（C_L）を有し、各ＨＣは、１つの可変ドメイン（V_H）および３つの定常ドメイン（C_H1、C_H2、およびC_H3）を有する。C_H1およびC_H2ドメインは、ヒンジ領域によって連結されている。バイオマーカーは、当技術分野において周知である。

【００３６】

簡潔には、塩基性４鎖抗体単位は、２つの軽（Ｌ）鎖および２つの重（Ｈ）鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である（ＩｇＭ抗体は、Ｊ鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドと共に５つの塩基性ヘテロ四量体単位からなり、したがって１０個の抗原結合部位を含み、一方、分泌されるＩｇＡ抗体は、重合して、Ｊ鎖と共に２～５個の塩基性４鎖単位を含む多価集合体を形成することができる）。ＩｇＧの場合、４鎖単位は、一般的に、約１５０，０００ダルトンである。各Ｌ鎖は、１つのジスルフィド共有結合によってＨ鎖に連結されているが、一方で２つのＨ鎖は、Ｈ鎖アイソタイプに応じて１つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結されている。Ｈ鎖およびＬ鎖はそれぞれ、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋も有する。各Ｈ鎖は、Ｎ末端に可変ドメイン（V_H）を有し、続いてα鎖およびγ鎖のそれぞれについては３つの定常ドメイン（C_H）、ならびにμおよびεアイソタイプについては４つのC_Hドメインを有する。各Ｌ鎖は、Ｎ末端に可変ドメイン（V_L）を有し、続いてその反対側の端部に定常ドメイン（C_L）を有する。V_Lは、V_Hと整列しており、C_Lは、重鎖の第１の定常ドメイン（C_H1）と整列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。V_HとV_Lとが共に対合することにより、単一の抗原結合部位が形成される。様々なクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８ ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｄａｎｉｅｌ Ｐ．Ｓｔｉｔｅｓ，Ａｂｂａ Ｉ．Ｔｅｒｒ ａｎｄ Ｔｒｉｓｔｒａｍ Ｇ．Ｐａｒｓｌｏｗ（ｅｄｓ．），Ａｐｐｌｅｔｏｎ＆Ｌａｎｇｅ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ，１９９４，ｐａｇｅ ７１ ａｎｄ Ｃｈａｐｔｅｒ ６を参照されたい。

【００３７】

任意の脊椎動物種に由来するＬ鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる２つの明確に異なる種類の１つに割り当てられ得る。その重鎖（ＣＨ）の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。免疫グロブリンには５つのクラス：それぞれα、δ、γ、ε、μと指定された重鎖を有するＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭがある。γおよびαクラスは、C_Hの配列および機能の比較的軽微な違いに基づいて、さらにサブクラスに分けられ、例えば、ヒトは以下のサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２を発現する。

【００３８】

「C_Lドメイン」という用語は、例えばＫａｂａｔ位置約１０７Ａ～２１６（ＥＵ位置１０８～２１４（カッパ））から延びる免疫グロブリン軽鎖の定常領域ドメインを含む。カッパＣドメインのＥｕ／Ｋａｂａｔ変換表は、ｗｗｗ（ｄｏｔ）ｉｍｇｔ（ｄｏｔ）ｏ

ｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＫＣｎｂｅｒ．ｈｔｍｌでオンライン利用可能であり、ラムダＣドメインのＥｕ／Ｋａｂａｔ変換表は、ｗｗｗ（ｄｏｔ）ｉｍｇｔ（ｄｏｔ）ｏｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＬＣｎｂｅｒ．ｈｔｍｌでオンライン利用可能である。C_Lドメインは、V_Lドメインに隣接し、免疫グロブリン軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【００３９】

本明細書で使用される場合、ヒトＩｇＧの「C_H1ドメイン」という用語は、例えば、Ｋａｂａｔ番号付けシステムの約１１４～２２３の位置（ＥＵ位置１１８～２１５）から延びる免疫グロブリン重鎖の第１の（最もアミノ末端の）定常領域ドメインを含む。C_H1ドメインは、V_Hドメインおよび免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端に隣接し、免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の一部を形成せず、免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（すなわち、「ＣＬ」）と二量体化することができる。ＩｇＧ１重鎖のＥＵ／Ｋａｂａｔ変換表は、ｗｗｗ（ｄｏｔ）ｉｍｇｔ（ｄｏｔ）ｏｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＨＧｎｂｅｒ．ｈｔｍｌでオンライン利用可能である。

【００４０】

ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域の「C_H2ドメイン」という用語は、通常、ＥＵ番号付けシステムに従ってＩｇＧの残基約２３１～３４０を含む。C_H2ドメインは、他のドメインと密接に対に合していないという点で特有である。むしろ、２つのＮ－連結分岐炭水化物鎖が、インタクトなネイティブＩｇＧ分子の２つのC_H2ドメインの間に介在している。炭水化物は、ドメイン－ドメイン対合の代替物を提供し、C_H2ドメインの安定化を助け得ることが推測されている。Ｂｕｒｔｏｎ，Ｍｏｌ．ｌｍｍｕｎｏｌ．２２：１６１－２０６（１９８５）．

【００４１】

用語「C_H3ドメイン」は、Ｆｃ領域中のC_H2ドメインに対するＣ末端残基を含む（すなわち、ＥＵ番号付けシステムによるＩｇＧのアミノ酸残基約３４１～アミノ酸残基約４４７）。

【００４２】

本明細書中で使用される「Ｆｃ領域」という用語は、一般的に、免疫グロブリン重鎖のＣ末端ポリペプチド配列を含む二量体複合体を指し、Ｃ末端ポリペプチド配列は、インタクトな抗体のパパイン消化によって得ることができるものである。Ｆｃ領域は、ネイティブまたはバリアントＦｃ配列を含み得る。免疫グロブリン重鎖のＦｃ配列の境界は変動し得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ配列は、Ｆｃ配列の約２２６位のＣｙｓ、または約２３０位のＰｒｏから、カルボキシル末端までを含む。本明細書中で別段明記されない限り、Ｆｃ領域または定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，１９９１に記載される、ＥＵ番号付けシステム（ＥＵインデックスとも呼ばれる）に従っている。免疫グロブリンのＦｃ配列は、一般的に、２つの定常ドメイン、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含み、任意にC_H4ドメインを含む。本明細書中において「Ｆｃポリペプチド」とは、Ｆｃ領域、例えば単量体Ｆｃを構成する、ポリペプチドの１つを意味する。Ｆｃ領域は、ヒトＩｇＧ１　ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ等の任意の好適な免疫グロブリンから得ることができる。Ｆｃポリペプチドは、マウス、例えばマウスＩｇＧ２ａから得ることができる。Ｆｃ領域は、ジスルフィドによって共に保持された両方のＨ鎖のカルボキシ末端を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ領域における配列によって決定され；この領域はまた、特定の細胞種に見られるＦｃ受容体（ＦｃＲ）によって認識される部分でもある。いくつかの実施形態において、Ｆｃポリペプチドは、野生型ヒンジ配列の一部または全てを（一般に

、そのＮ末端に）含む。いくつかの実施形態において、Ｆｃポリペプチドは、機能的または野生型のヒンジ配列を含まない。

【００４３】

本明細書中で使用される「Ｆｃ構成要素」とは、Ｆｃ領域のヒンジ領域、C_H2ドメインまたはC_H3ドメインを指す。

【００４４】

特定の実施形態において、Ｆｃ領域は、好ましくは野生型ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域に由来するＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む。特定の実施形態において、Ｆｃ領域は、「野生型」マウスＩｇＧ、例えばマウスＩｇＧ２ａに由来する。「野生型」ヒトＩｇＧ　Ｆｃまたは「野生型」マウスＩｇＧ　Ｆｃとは、それぞれヒト集団またはマウス集団内で天然に生じるアミノ酸の配列を意味する。もちろん、Ｆｃ配列は個体間でわずかに異なり得るのと同様に、野生型配列に対して１つ以上の改変が行われてもよく、依然として本発明の範囲内にあり得る。例えば、Ｆｃ領域は、グリコシル化部位の突然変異または非天然アミノ酸の包含などの改変を含み得る。

【００４５】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれV_HおよびV_L）は、一般的に類似の構造を有しており、各ドメインは、４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と、３つの超可変領域（ＨＶＲ）とを含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６１ｓｔ　ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，ｐａｇｅ　９１（２００７）を参照されたい）。単一のV_HまたはV_Lドメインは、抗原結合特異性を付与するために充分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のV_HまたはV_Lドメインを使用して単離され、それぞれ、相補的V_LまたはV_Hドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【００４６】

本明細書中で使用する、「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列内で超可変性であり、抗原結合特異性を決定する、抗体可変ドメインの各領域、例えば「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）を意味する。

【００４７】

一般的に、抗体は６つのＣＤＲを含み：３つがV_H中（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、３つがV_L中にある（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）。本明細書における例示的なＣＤＲとしては：

【００４８】

（ａ）アミノ酸残基２６－３２（Ｌ１）、５０－５２（Ｌ２）、９１－９６（Ｌ３）、２６－３２（Ｈ１）、５３－５５（Ｈ２）および９６－１０１（Ｈ３）で生じる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））；

【００４９】

（ｂ）アミノ酸残基２４－３４（Ｌ１）、５０－５６（Ｌ２）、８９－９７（Ｌ３）、３１－３５ｂ（Ｈ１）、５０－６５（Ｈ２）および９５－１０２（Ｈ３）で生じるＣＤＲ（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））；および

【００５０】

（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ－３６（Ｌ１）、４６－５５（Ｌ２）、８９－９６（Ｌ３）、３０－３５ｂ（Ｈ１）、４７－５８（Ｈ２）および９３－１０１（Ｈ３）において生じ

る抗原接触部（ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６））が挙げられる。

【００５１】

別段示されない限り、ＣＤＲは、上記のＫａｂａｔらに従って決定される。当業者は、ＣＤＲ指定が、上記Ｃｈｏｔｈｉａ、上記ＭｃＣａｌｌｕｍ、または任意の他の科学的に許容された命名システムに従って決定され得ることを理解するであろう。

【００５２】

「フレームワーク」または「ＦＲ」は、相補性決定領域（ＣＤＲ）以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般的に４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４からなる。したがって、ＣＤＲおよびＦＲ配列は、一般的に、V_H（またはV_L）において、以下の順序：ＦＲ１－ＣＤＲ－Ｈ１（ＣＤＲ－Ｌ１）－ＦＲ２－ＣＤＲ－Ｈ２（ＣＤＲ－Ｌ２）－ＦＲ３－ＣＤＲ－Ｈ３（ＣＤＲ－Ｌ３）－ＦＲ４で現れる。

【００５３】

本明細書中で使用される「抗原結合アーム」、「標的分子結合アーム」、「標的結合アーム」という語句およびそれらの変形は、目的の標的に特異的に結合する能力を有する抗体（例えば二重特異性抗体）の構成部分を指す。一般的に、および好ましくは、抗原結合アームは、免疫グロブリンポリペプチド配列、例えば免疫グロブリン軽鎖および重鎖のＣＤＲおよび／または可変ドメイン配列の複合体である。

【００５４】

「標的」または「標的分子」は、抗体（例えば二重特異性抗体）の結合アームによって認識される部分を指す。例えば、抗体が多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）である場合、標的は、状況に応じて、単一分子もしくは異なる分子上のエピトープ、または病原体もしくは腫瘍細胞であり得る。当業者は、標的が標的結合アームの結合特異性によって決定され、異なる標的結合アームが異なる標的を認識し得ることを理解するであろう。標的は、好ましくは、（本明細書に記載の方法を含む、当技術分野で公知の方法によれば）１μＭ　Ｋｄより高い親和性で抗体（例えば、二重特異性抗体）に結合する。標的分子の例としては、血清可溶性タンパク質および／またはその受容体、例えばサイトカインおよび／またはサイトカイン受容体、アドヘシン、成長因子および／またはその受容体、ホルモン、ウイルス粒子（例えば、ＲＳＶ　Ｆタンパク質、ＣＭＶ、Ａ型ブドウ球菌、インフルエンザ、Ｃ型肝炎ウイルス）、微生物（例えば、細菌細胞タンパク質、真菌細胞）、アドヘシン、ＣＤタンパク質およびその受容体が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５５】

本明細書中で使用される「界面」という用語は、第１の抗体ドメイン中の１つ以上のアミノ酸と第２の抗体ドメインの１つ以上のアミノ酸との相互作用から生じる会合表面を指す。例示的な界面としては、例えば、C_H1／C_L、V_H／V_LおよびC_H3／C_H3が挙げられる。いくつかの実施形態において、界面は、例えば、界面を形成するアミノ酸間の水素結合、静電相互作用、または塩架橋を含む。

【００５６】

「インタクト」または「全長」抗体の一例は、抗原結合アームならびにC_Lならびに少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2、およびC_H3を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリアントであり得る。

【００５７】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集合から得られる抗体を指し、すなわち、その集合を構成する個々の抗体は、同一である、および／または同一のエピトープに結合するが、ただし、例えば、天然に存在する変異またはモノクローナル抗体製剤の製造中に生じる変異を含む、可能なバリアント抗体は例外であり、このようなバリアントは、通常少量で存在する。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクロー

ナル抗体製剤のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾詞「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集合から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするように構築されない。例えば、本発明によるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない種々の技術によって作製することができ、このような方法およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は本明細書に記載されている。

【００５８】

「ネイキッド抗体」とは、異種部分（例えば、細胞毒性部位）または放射性標識に結合していない抗体を指す。ネイキッド抗体は、医薬組成物中に存在し得る。

【００５９】

「ネイティブ抗体」は、種々の構造を有する天然に生じる免疫グロブリン分子を指す。例えば、ネイティブＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合されている２つの同一の軽鎖および２つの同一の重鎖から構成される約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端に向かって、各重鎖は、可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V_H）を有し、これに３つの定常重ドメイン（C_H1、C_H2、およびC_H3）が続く。同様に、Ｎ末端からＣ末端に向かって、各軽鎖は、可変軽ドメインまたは軽鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（V_L）を有し、これに定常軽（C_L）ドメインが続く。

【００６０】

「単一特異性」とは、１つのエピトープのみに結合する抗体の能力を指す。「二重特異性」は、２つの異なるエピトープに結合する抗体の能力を指す。「多重特異性」は、２つ以上のエピトープに結合する抗体の能力を指す。特定の実施形態において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体を含む。二重特異性および多重特異性抗体の場合、エピトープは同じ抗原上にあっても、または各エピトープは異なる抗原上にあってもよい。特定の実施形態において、二重特異性抗体は、２つの異なる抗原に結合する。特定の実施形態において、二重特異性抗体は、１つの抗原上の２つの異なるエピトープに結合する。特定の実施形態において、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）は、約１μＭ以下、約１００ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下、約０．１ｎＭ以下、約０．０１ｎＭ以下、または約０．００１ｎＭ以下（例えば、約10^{-8}Ｍ以下、例えば、約10^{-8}Ｍ～約10^{-13}Ｍ、例えば、約10^{-9}Ｍ～約10^{-13}Ｍ）の解離定数（Ｋｄ）で各エピトープに結合する。

【００６１】

本明細書中で使用する「多重特異性抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、２つ以上の抗原に結合することができる抗体を指す。特定の態様において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体、例えば、ヒト二重特異性抗体、ヒト化二重特異性抗体、キメラ二重特異性抗体、またはマウス二重特異性抗体を指す。

【００６２】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部、好ましくはインタクト抗体のV_HおよびV_Lを含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＳｃＦｖ、およびＦｖ断片：１アーム抗体、および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【００６３】

抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であり、鎖の残りが、他の種に由来する抗体または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにそのような抗体の断片の対応する配列と同一または相同であり、ただしそれらが所望の生物学的活性を示す「キメラ」抗体であり得る（米国特許第４，８１６，５６７号、およびＭｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：６８５１－６８５５（１９８４））。本明細書中の目的のキメラ抗体には、非

ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿等）に由来する可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む霊長類化抗体が含まれる。

【００６４】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの事例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに改良するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変ループの全てまたは実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、ＦＲのうちの全てまたは実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のＦＲである。ヒト化抗体はまた、場合によっては、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９（１９８８）、およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照のこと。

【００６５】

「医薬組成物」または「医薬製剤」という用語は、含まれる有効成分の生物学的活性が有効になるような形態をしており、かつ、前記医薬組成物が投与されるであろう対象に対して許容できないほど毒性のある追加の成分を含まない、調製物を指す。

【００６６】

「薬学的に許容され得る担体」は、有効成分以外の医薬組成物または製剤中の成分であって、対象にとって非毒性である成分を指す。薬学的に許容され得る担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【００６７】

本明細書中で使用される「複合体」または「複合体化された」とは、ペプチド結合ではない会合および／または力（例えば、ファンデルワールス力、疎水性力、親水性力）を介して互いに相互作用する２つ以上の分子の結合を指す。一実施形態において、複合体はヘテロ多量体である。本明細書中で使用される「タンパク質複合体」または「ポリペプチド複合体」という用語は、タンパク質複合体中のタンパク質に共役した非タンパク質実体を有する複合体（例えば、毒素または検出剤のような化学分子を含むが、これらに限定されない）を含むことは理解されるべきである。

【００６８】

「目的の抗原に結合する」抗体（例えば単一特異性または多重特異性抗体）は、タンパク質または前記タンパク質を発現する細胞もしくは組織を標的とする際の診断および／または治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように、十分な親和性で抗原、例えばタンパク質に結合する抗体である。そのような実施形態において、「非標的」タンパク質への抗体の結合の程度は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）分析または放射性免疫沈降（ＲＩＡ）またはＥＬＩＳＡによって決定される場合、その特定の標的タンパク質への抗体の結合の約１０％未満である。標的分子への抗体の結合に関して、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープに「特異的に結合する」または「特異的に結合する」または「特異的である」という用語は、非特異的相互作用と測定可能に異なる結合を意味する（例えば、非特異的相互作用は、ウシ血清アルブミンまたはカゼインへの結合であり得る）。特異的結合は、例えば、分子の結合を対照分子の結合と比較して決定することによって測定し得る。例えば、特異的結合は、標的に類似である対照分子、例えば、過剰な非標識標的との競合によって決定し得る。この場合、標識

した標的のプローブに対する結合が、過剰な非標識標的によって競合的に阻害される場合に、特異的結合が示される。本明細書中で使用される特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する、「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」という用語は、例えば、少なくとも約２００ｎＭ、あるいは少なくとも約１５０ｎＭ、あるいは少なくとも約１００ｎＭ、あるいは少なくとも約６０ｎＭ、あるいは少なくとも約５０ｎＭ、あるいは少なくとも約４０ｎＭ、あるいは少なくとも約３０ｎＭ、あるいは少なくとも約２０ｎＭ、あるいは少なくとも約１０ｎＭ、あるいは少なくとも約８ｎＭ、あるいは少なくとも約６ｎＭ、あるいは少なくとも約４ｎＭ、あるいは少なくとも約２ｎＭ、あるいは少なくとも約１ｎＭの標的に対するＫｄまたはそれを超える親和性を有する分子によって示すことができる。一実施形態において、「特異的結合」という用語は、多重特異性抗体が任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する場合の結合を指す。

【００６９】

「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体等の抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。別段示されない限り、本明細書で使用される、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の１：１相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、一般的に、解離定数（Ｋｄ）によって表され得る。例えば、Ｋｄは、約２００ｎＭ以下、約１５０ｎＭ以下、約１００ｎＭ以下、約６０ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約４０ｎＭ以下、約３０ｎＭ以下、約２０ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約８ｎＭ以下、約６ｎＭ以下、約４ｎＭ以下、約２ｎＭ以下、または約１ｎＭ以下であり得る。親和性は、本明細書に記載するものを含め、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定し得る。低親和性抗体は、一般的に、抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向にあるが、高親和性抗体は、一般的に、抗原と迅速に結合し、より長く結合したままの傾向にある。結合親和性の種々の測定方法が当技術分野で公知であり、これらはいずれも、本発明の目的のために使用することができる。

【００７０】

一実施形態において、「Ｋｄ」または「Ｋｄ値」は、表面プラズモン共鳴アッセイを使用することによって測定される。例えば、Ｋｄ値は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－２０００またはＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ．）を用いて２５°Ｃで、－１０応答単位（ＲＵ）の固定化標的（例えば、抗原）ＣＭ５チップを用いて決定することができる。簡潔に述べると、一例において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示に従って、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を用いて活性化させる。抗原を、ｐＨ４．８、１０ｍＭの酢酸ナトリウムによって、５μｇ／ｍｌ（約０．２μＭ）に希釈した後、５μｌ／分の流速で注入し、カップリングされたタンパク質のおよそ１０応答ユニット（ＲＵ）を達成する。抗原注入後、１Ｍのエタノールアミンを注入し、未反応基をブロックする。動態測定のために、Ｆａｂの二倍連続希釈物（例えば、０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）を、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０を含むＰＢＳ中（ＰＢＳＴ）中で、２５°Ｃで約２５μ／分の流速で注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、単純な１対１ラングミュア結合モデル（ＢＩＡＣＯＲＥ評価ソフトウェアバージョン３．２）を使用して、会合および解離センサーグラムを同時にフィッティングすることによって、算出する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、k_{off}/k_{on}比率として算出する。例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照のこと。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が$10^{6}M^{-1}s^{-1}$を超える場合、会合速度は、ストップフローを備えた分光光度計（Ａｖｉｖ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）または撹拌キュベットを有する８０００シリーズＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）等の分光

計で測定して、上昇する抗原濃度の存在下、２５℃で、ＰＢＳ、ｐＨ７．２中２０ｎＭの抗－抗原抗体（Ｆａｂ形態）の蛍光発光強度（励起＝２９５ｎｍ；発光＝３４０ｎｍ、１６ｎｍバンドパス）の増加または減少を測定する蛍光消光技術を使用して決定することができる。

【００７１】

本明細書で提供される方法に従って作製された抗体（例えば、修飾二重特異性抗体などの修飾抗体）、例えば抗体（例えば二重特異性抗体）、その断片または誘導体に関して「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的特性」は、特に明記しない限り、生物学的分子に結合する能力を有することを意味する。

【００７２】

「単離された」は、種々のヘテロ多量体ポリペプチドを記載するために使用される場合、それが発現される細胞または細胞培養物から分離および／または回収されたヘテロ多量体を意味する。その天然環境の混入成分は、ヘテロ多量体の診断的および治療的使用を妨害するであろう物質であり、これらとしては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質が挙げられ得る。特定の実施形態において、ヘテロ多量体は、（１）Ｌｏｗｒｙ法によって決定された場合に、タンパク質９５重量％超の、および最も好ましくは９９重量％超に、（２）回転カップ配列決定装置の使用によりＮ末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（３）クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用した還元もしくは非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均質になるように、精製される。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも１つの精製ステップにより調製される。

【００７３】

抗体（例えば二重特異性抗体）は、一般的に、実質的に均一になるまで精製される。「実質的に均質」、「実質的に均質な形態」および「実質的な均質性」という語句は、生成物が望ましくないポリペプチドの組合せ（例えば、重鎖ホモ二量体および／またはスクランブルされた重鎖／軽鎖対）に由来する副生成物を実質的に含まないことを示すために使用される。

【００７４】

純度の観点から表現すると、実質的な均質性とは、副生成物の量が１０重量％、９重量％、８重量％、７重量％、６重量％、４重量％、３重量％、２重量％もしくは１重量％を超えないか、または１％重量未満であることを意味する。一実施形態において、副生成物は５％未満である。

【００７５】

「生物学的分子」は、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびそれらの組合せを指す。一実施形態において、生物学的分子は自然界に存在する。

【００７６】

文脈により別段の指示がある場合を除き、用語「第１の」ポリペプチド（例えば、重鎖（ＨＣ１またはＨＣ$_1$）または軽鎖（ＬＣ１またはＬＣ$_1$））および「第２の」ポリペプチド（例えば、重鎖（ＨＣ２またはＨＣ$_2$）または軽鎖（ＬＣ２またはＬＣ$_2$））およびそれらの変形は、単に一般的な識別子であり、本明細書で提供される方法を使用して生成された抗体（例えば二重特異性抗体）の特異的または特定のポリペプチドまたは成分を同定するものと解釈されるべきではない。

【００７７】

実施例で言及した市販の試薬は、別段示されない限り、製造者の指示に従って使用した。以下の実施例および本明細書全体を通して、ＡＴＣＣアクセッション番号によって特定される細胞の供給源は、バージニア州マナッサスのＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎである。別段明記しない限り、本発明は、組換えＤＮＡ技術の標準的な手順、例えば本明細書の上記および以下の教科書に記載されている手順を使用する：前出のＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｇｒｅ

en Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989)、Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc., NY, 1990)、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988)、Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984)、Freshney, Animal Cell Culture, 1987、Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991。

【００７８】

本明細書中における値またはパラメータについての「約」の言及は、この技術分野の当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書中における、値またはパラメータについての「約」の言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする態様を含む（および記載する）。例えば、「約Ｘ」について言及する記載は、「Ｘ」の記載を含む。

【００７９】

本明細書に記載の本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態「を含む」、「からなる」、および「から本質的になる」を含むことが理解される。

【００８０】

特許出願および公報を含む、本明細書で引用される全ての参照文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

重鎖／軽鎖対合選択性を改善する方法

【００８１】

本出願は、優先的な重鎖／軽鎖対合において役割を果たす、（例えば、抗体軽鎖またはその断片の）V_Lおよび（例えば、抗体重鎖またはその断片の）V_Hのアミノ酸位置の残基の同定に基づく。

【００８２】

以下にさらに詳細に記載されるように、本明細書中に提供される方法は、重鎖および／または軽鎖ポリペプチドの可変ドメイン内、例えば、特にＣＤＲ配列内の特定の残基に１つ以上の置換を導入することを含む。当技術分野の当業者が理解するように、抗体可変領域配列内の特定のアミノ酸残基を指定するために、様々な番号付け規則を使用し得る。一般的に使用される番号付け規則としては、ＫａｂａｔおよびＥＵインデックス番号付け（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ., Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ, 5ｔｈ Ｅｄ, Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ, Ｂｅｔｈｅｓｄａ, ＭＤ（１９９１）を参照のこと）が挙げられる。可変ドメインについての修正または代替の番号付けシステムを含む他の規則としては、Ｃｈｏｔｈｉａ（Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ, Ｌｅｓｋ ＡＭ（１９８７）, Ｊ Ｍａｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１－９１７、Ｃｈｏｔｈｉａ, ｅｔ ａｌ.（１９８９）, Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３）, ＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ, ｅｔ ａｌ.（２００３）, Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７：５５－７７）およびＡＨｏ（Ｈｏｎｅｇｇｅｒ Ａ, Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ａ（２００１）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３０９：６５７－６７０）が挙げられる。これらの参照文献は、抗体配列の可変領域アミノ酸残基の位置を定義する免疫グロブリン可変領域についてのアミノ酸配列番号付けスキームを提供する。

【００８３】

本明細書中で別段明記しない限り、実施例および特許請求の範囲に現れる免疫グロブリン重鎖可変領域（すなわち、V_H）アミノ酸残基についての全ての言及（すなわち番号）、特に明記しない限り、V_L残基についての全ての言及と同様に、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに基づいている。実施例および特許請求の範囲に現れる免疫グロブリン重鎖定常領

域C_H1、C_H2およびC_H3残基についての全ての言及（すなわち、数）は、別段示されない限り、C_L残基についての全ての言及と同様に、ＥＵシステムに基づいている。Ｋａｂａｔまたは ＥＵインデックス番号付けによる残基番号の知識により、当業者は、任意の一般的に使用される番号付け規則に従って、本明細書中に記載のアミノ酸配列改変を特定することができる。

【００８４】

本明細書で提供される項目、構成要素、または要素（例えば「抗体」、「置換」、「置換変異」）は、単数形で記載または特許請求し得るが、単数形への限定が明示的に述べられていない限り、複数形はその範囲内にあると考えられる。

【００８５】

以下により詳細に記載されるように、V_Hおよび／またはV_Lに１つ以上の置換を導入することを含む、抗体（二重特異性抗体を含む）における正しい重鎖／軽鎖対合を改善する方法が本明細書中に提供される。抗体のV_Hおよび／またはV_Lに１つ以上の置換を導入することを含む抗体（例えば、正しく集合した二重特異性抗体）の収率を改善する方法も提供され、ここで、特定の方法（例えば、当技術分野で公知の方法）を使用して生成された置換を含む抗体（例えば、二重特異性抗体）の収率は、同じ方法を使用して生成された非置換抗体（例えば、二重特異性抗体）の収率よりも高い。以前の取り組みは、可変ドメインのフレームワーク領域に１つ以上のアミノ酸置換を導入することに集中していた。例えば、Ｆｒｏｎｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１７，２６：２０２１－３８．Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２０１５，２９０：７５３５－６２．Ｌｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１４，３２：１９１－２０２を参照のこと。

【００８６】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法は、抗体（例えば、二重特異性抗体）の２つの重鎖のヘテロ二量体化を促進するために、Ｆｃ領域に改変を導入することをさらに含む。

重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインにおける置換突然変異

【００８７】

軽鎖可変ドメイン（V_L）の９４位またはV_Lの９６位の少なくとも１つのアミノ酸（例えば、「元のアミノ酸」）を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換するステップを含む、抗体の重鎖と軽鎖との対合（例えば優先的対合）を改善する方法であって、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている方法が本明細書中に提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、９４位および９６位におけるアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）の両方を、非荷電残基から荷電残基、例えば、Ｄ、Ｒ、ＥまたはＫに置換するステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、上記の置換が導入された抗体を提供することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書の他の箇所に記載される１つ（または複数）の例示的な標的に結合する抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）を提供することを含む。

【００８８】

優先的対合は、対合が第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとの間で起こるのと同時に、１つ以上のさらなる別個のポリペプチド（例えば、さらなる重鎖および／または軽鎖）が存在する場合の、第１のポリペプチド（例えば重鎖）と第２のポリペプチド（例えば軽鎖）との対合パターンを記載する。いくつかの実施形態において、優先的な対合は、HC_1が少なくともLC_1およびLC_2と共発現しているとき、HC_1／LC_1重鎖－軽鎖の対合の量がHC_1／LC_2対合の量よりも多い場合、例えば抗体（例えば二重特異性抗体）のHC_1とLC_1との間で生じる。同様に、優先的な対合は、HC_2が少なくともLC_1およびLC_2と共発現している場合、HC_2／LC_2重鎖－軽鎖の対合の量がHC_2／LC_1対合の量よりも多い場合、例えば抗体（例えば二重特異性抗体）のHC_2とLC_2との間で生じる。HC_1／LC_1、HC_1／LC_2、HC_2／LC_1およびHC_2／Ｌ

C_2の対合は、本明細書中の他の箇所にさらに詳細に記載されているように、当技術分野で公知の方法、例えば液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）によって測定し得る。

【００８９】

いくつかの実施形態において、「元のアミノ酸」という用語は、例えば荷電アミノ酸（例えば、Ｄ、Ｒ、Ｅ、またはＫ）による置換の直前に、V_Lの特定の位置、例えば９４位および／または９６位に存在するアミノ酸を指す。いくつかの実施形態において、「非荷電アミノ酸」または「非荷電残基」という用語は、生理学的ｐＨ、例えば、約６．８～約７．５、約６．９～約７．３５５、または約６．９５～７．４５のｐＨで正電荷（例えば、プロトン化）も負電荷（例えば、脱プロトン化）も有さないアミノ酸を指す。いくつかの実施形態において、「荷電アミノ酸」は、生理学的ｐＨ、例えば、約６．８～約７．５、約６．９～約７．３５５、または約６．９５～７．４５のｐＨで正電荷（例えば、プロトン化されている）または負電荷（例えば、脱プロトン化されている）を有するアミノ酸を指す。いくつかの実施形態において、非荷電アミノ酸残基は、Ｄ、Ｒ、ＥまたはＫではないアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換される。いくつかの実施形態において、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＲに置換される。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＲに置換される。

【００９０】

いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）、およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換することをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換される。いくつかの実施形態において、V_Lの９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換され、V_Lの９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＲに置換され、V_Hの９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換される。

【００９１】

重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基からアスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換するステップを含む、抗体の重鎖と軽鎖の対合（例えば、同族対合、すなわち、同族$_H$およびV_L、Ｆａｂ、ならびにＨＣおよびＬＣの優先的対合）を改善する方法も提供され、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換される。

【００９２】

軽鎖可変ドメイン（V_L）の９１位、V_Lの９４位またはV_Lの９６位の少なくとも１つのアミノ酸（例えば、「元のアミノ酸」）を、非芳香族残基から、トリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基へと置換するステップを含む、抗体の重鎖と軽鎖との対合（例えば、同族対合）を改善する方法も本明細書中に提供され、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、９１位、９４位、または９６位の少なくとも２つのアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からＷ、Ｆ、およびＹから選択される芳香族残基に置換するステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、９４位および９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からＷ、ＦおよびＹから選択される芳香族残基に置換するステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、９１位、９４位置および９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）のそれぞれを非芳香族残基からＷ、Ｆ、およびＹから選択される芳香族残基に置換するステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、上記の置換が導入された抗体を提供することを含む

。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書の他の箇所に記載される１つ（または複数）の例示的な標的に結合する抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）を提供することを含む。

【００９３】

いくつかの実施形態において、「元のアミノ酸」は、芳香族アミノ酸（例えば、Ｗ、Ｆ、およびＹ）による置換の直前にV_Lの９１、９４および／または９６位に存在するアミノ酸（例えば、非芳香族アミノ酸）を指す。いくつかの実施形態において、「非芳香族アミノ酸」または「非芳香族残基」という用語は、芳香環を含まないアミノ酸を指す。いくつかの実施形態において、「非芳香族残基」は、Ｗ、ＦまたはＹではないアミノ酸残基を指す。

【００９４】

いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換される。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換される。いくつかの実施形態において、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換される。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換される。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換される。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換される。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換される。

【００９５】

いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を、非荷電残基から、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）、およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換することをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からトリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基に置換することをさらに含む。

【００９６】

いくつかの実施形態において、上記の１つ以上の置換は、抗体断片、例えば、V_LドメインおよびV_Hドメインを含む抗体断片に導入される。そのような抗体断片としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、単一特異性Ｆ（ａｂ’）$_2$、二重特異性Ｆ（ａｂ’）$_2$、１アーム抗体、ＳｃＦｖ、Ｆｖ等が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９７】

いくつかの実施形態において、上記の１つ以上の置換が導入される抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はカッパ軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗体はラムダ軽鎖を含む。特定の実施形態において、V_Lは、ＫＶ１またはＫＶ４ヒト生殖系列ファミリーのフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、V_Hは、ＨＶ２またはＨＶ３ヒト生殖系列ファミリーのフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、マウスＦｃ領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体はヒトＦｃ領域、例えばヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域、例えばヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３ｍまたはヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、単一特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。

【００９８】

特定の実施形態において、上記の１つ以上の置換が導入される抗体は、第１のV_H（V_L１）と対合する第１のV_L（V_L１）および第２のV_H（V_H２）と対合する第２のＶ

$_{L}$（$V_{L}2$）を含む二重特異性抗体であり、ここで、$V_{L}1$はＱ３８Ｋ置換変異を含み、$V_{H}1$はＱ３９Ｅ置換変異を含み、$V_{L}2$はＱ３８Ｅ置換変異を含み、$V_{H}2$はＱ３９Ｋ置換変異を含み、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、$V_{L}1$は、Ｑ３８Ｅ置換変異を含み、$V_{H}1$は、Ｑ３９Ｋ置換変異を含み、$V_{L}2$は、Ｑ３８Ｋ置換変異を含み、$V_{H}2$は、Ｑ３９Ｅ置換変異を含み、アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔに従っている。「$V_{L}1$」、「$V_{H}1$」、「$V_{L}2$」、および「$V_{H}2$」という用語は任意の呼称であり、例えば、本明細書中の実施形態のいずれかにおける「$V_{L}1$」および「$V_{L}2$」は逆にすることができることが当業者には明らかであろう。

【００９９】

加えて、または、代替的に、いくつかの実施形態において、上記の１つ以上の置換が導入される抗体は、第１の$C_{H}1$ドメイン（$C_{H}1_{1}$）を含む第１の重鎖（HC_{1}）と、第１のC_{L}ドメイン（$C_{L}1$）を含む第１の軽鎖（LC_{1}）と、第２の$C_{H}1$ドメイン（$C_{H}1_{2}$）を含む第２の重鎖（HC_{2}）と、第１のC_{L}ドメイン（$C_{L}2$）を含む第２の軽鎖（LC_{2}）とを含む二重特異性抗体である。「HC_{1}」、「HC_{2}」、「LC_{1}」、「LC_{2}」等の用語は任意の名称であり、例えば、本明細書中の実施形態のいずれかにおける「HC_{1}」および「HC_{2}」は逆にすることができることは当業者には明らかであろう。すなわち、Ｈ１の$C_{H}1$ドメインおよびＬ１のC_{L}ドメイン中にあると上に記載された突然変異のいずれかは、あるいは、Ｈ２の$C_{H}1$ドメインおよびＬ２のC_{L}ドメイン中にあってもよい。いくつかの実施形態において、本方法は、$C_{H}1_{1}$中のＳ１８３をＥで置換し、$C_{L}1$中のＶ１３３をＫで置換し、$C_{H}1_{2}$中のＳ１８３をＫで置換し、$C_{L}2$中のＶ１３３をＥで置換することをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＥＵインデックスに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、$C_{H}1_{1}$中のＳ１８３をＫに置換し、$C_{L}1$中のＶ１３３をＥに置換し、$C_{H}1_{2}$中のＳ１８３をＥに置換し、$C_{L}2$中のＶ１３３をＫに置換することをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＥＵインデックスに従っている。例えば、Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）ＭＡＢＳ　９（２）：２１３－２３０および国際公開第２０１６／１７２４８５号を参照のこと。いくつかの実施形態において、HC_{1}は、第１の$C_{H}2$（$C_{H}2_{1}$）ドメインおよび／または第１の$C_{H}3$（$C_{H}3_{1}$）ドメインをさらに含む。追加的または代替的に、いくつかの実施形態において、HC_{2}は、第２の$C_{H}2$（$C_{H}2_{2}$）ドメインおよび／または第２の$C_{H}3$（$C_{H}3_{2}$）ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、$C_{H}3_{2}$は、$C_{H}3_{1}$／　$C_{H}3_{2}$界面内で、１つ以上の　アミノ酸残基がより大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基に置換され、それにより、$C_{H}3_{1}$と相互作用する$C_{H}3_{2}$の表面上に突起が生成されるように変更され、かつ、$C_{H}3_{1}$は、$C_{H}3_{1}$／　$C_{H}3_{2}$界面内で、１つ以上のアミノ酸残基がより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それにより、$C_{H}3_{2}$と相互作用する$C_{H}3_{1}$の表面上に空洞が生成されるように変更される。いくつかの実施形態において、$C_{H}3_{1}$は、$C_{H}3_{1}$／$C_{H}3_{2}$界面内で、１つ以上のアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する１つ以上のアミノ酸残基に置換され、それにより、$C_{H}3_{2}$と相互作用する$C_{H}3_{1}$の表面上に突起が生成されるように変更され、かつ、$C_{H}3_{2}$は、／$C_{H}3_{1}$／$C_{H}3_{2}$　界面内で、１つ以上のアミノ酸残基がより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換され、それにより、$C_{H}3_{1}$と相互作用する$C_{H}3_{2}$の表面上に空洞が生成されるように変更される。いくつかの実施形態において、突起は、ノブ変異、例えばＴ３６６Ｗを含むノブ変異であり、ここで、アミノ酸番号付けはＥＵインデックスに従っている。いくつかの実施形態において、空洞は、ホール変異、例えば、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖの少なくとも１つ、少なくとも２つまたは３つ全てを含むホール変異であり、ここで、アミノ酸番号付けは、ＥＵインデックスに従っている。ノブ・イン・ホール変異に関するさらなる詳細は、例えば、米国特許第５，７３１，１６８号、米国特許第５，８０７，７０６号、米国特許第７，１８３，０７６号に提供されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体のHC_{1}／LC_{1}対は第１の抗原に結合し、二重特異性抗体のHC_{2}／LC_{2}対は第２の抗原に結合する。いくつかの実施形態におい

て、二重特異性抗体のＨＣ$_1$／ＬＣ$_1$対は第１の抗原の第１のエピトープに結合し、二重特異性抗体のＨＣ$_2$／ＬＣ$_2$対は第１の抗原の第２のエピトープに結合する。

【０１００】

軽鎖可変ドメイン（Ｖ$_L$）の９４位および／またはＶ$_L$の９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基からアスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることを含む、優先的な重鎖／軽鎖対合が改善された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るための、抗体（例えば、二重特異性抗体）の作製（例えば、改変または操作）方法が提供され、ここで、アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、９４位および９６位の少なくとも両方のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基から荷電残基、例えばＤ、Ｒ、ＥまたはＫに置換して、改変抗体（例えば、二重特異性抗体）を得るステップを含む。いくつかの実施形態において、改変された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、本明細書の他の箇所に記載される例示的な標的に結合する。多くの場合、そのような標的に結合する抗体の重鎖および軽鎖の配列は公的に入手可能であり、Ｋａｂａｔ番号付けスキームにアラインおよびマッピングし、次いでＫａｂａｔ配列データベースに対してスキャンして、置換される位置を特定することができる。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＲに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＲに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（Ｖ$_H$）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基からアスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＤに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、Ｖ$_L$の９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＤに置換され、Ｖ$_L$の９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＲに置換され、Ｖ$_H$の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＤに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。

【０１０３】

重鎖可変ドメイン（Ｖ$_H$）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基からアスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることを含む、優先的な重鎖／軽鎖の対合が改善された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るための、抗体（例えば、二重特異性抗体）の作製（例えば、改変または操作）方法も提供され、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＤに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。

【０１０４】

軽鎖可変ドメイン（Ｖ$_L$）の９１位、Ｖ$_L$の９４位、および／またはＶ$_L$の９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からトリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることを含む、優先的な重鎖／軽鎖対合が改善された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るための、抗体（例えば、二重特異性抗体）

の作製（例えば、改変または操作）方法も提供され、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、９１位、９４位、または９６位の少なくとも２つのアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からＷ、Ｆ、およびＹから選択される芳香族残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、９４位および９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からＷ、ＦおよびＹから選択される芳香族残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るステップを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、９１位、９４位、および９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）のそれぞれを、非芳香族残基からＷ、Ｆ、およびＹから選択される芳香族残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得るステップを含む。いくつかの実施形態において、改変された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、本明細書の他の箇所に記載される例示的な標的に結合する。

【０１０５】

いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）がＷで置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換されて、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。いくつかの実施形態において、９１位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９４位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＹに置換され、９６位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）はＷに置換され、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が得られる。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非荷電残基からアスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることをさらに含み、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、本方法は、重鎖可変ドメイン（V_H）の９５位のアミノ酸（例えば、元のアミノ酸）を非芳香族残基からトリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）、およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基に置換して、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることをさらに含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、抗体（例えば、二重特異性抗体）を作製する（例えば、改変または操作する）方法は、例えば、上記の置換の１つ以上をV_Hおよび／またはV_Lに導入することによって、V_Hおよび／またはV_Lを改変して、改変V_Hおよび／または改変V_Lを得、改変V_Hおよび／または改変V_Lを抗体（例えば、二重特異性抗体）にグラフトして、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を得ることを含む。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される方法に従って置換、改変および／または操作されたV_H／V_L対は、少なくとも１つの親和性成熟ステップ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０を超える親和性成熟ステップ）に供される。親和性成熟は、例えば、本明細書中に記載される方法によって得られる抗体の重鎖／軽鎖対を、標的（例えば、以下にさらに詳細に記載されるような標的リガンドまた

は標的抗原）に対する親和性の上昇を選択するスキームに供するプロセスである（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９５，６０３７－４２を参照）。抗体の親和性成熟に関する詳細は、例えばＭｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１１０（３２）：Ｅ２９８７－９６、Ｊｕｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ．７：４５２５９、Ｔｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：９８６、Ｋｏｅｎｉｇ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１１４（４）：Ｅ４８６－Ｅ４９５、Ｙａｍａｓｈｉｔａ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ．２７，５１９－５２７、Ｐａｙａｎｄｅｈ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２０：９４０－９５０、Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１９）ｍＡｂｓ．１１（１）：１６６－１７７、および Ｃｉｓｎｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｍｏｌ．Ｓｙｓｔ．Ｄｅｓ．Ｅｎｇ．４：７３７－７４６にも詳細に記載されている。特定の実施形態において、本明細書中の方法によって得られる重鎖／軽鎖対のＶ$_{H}$および／またはＶ$_{L}$中の１つ以上のアミノ酸位置をランダム化して（すなわち、上記、すなわち、Ｖ$_{L}$の９１位、９４位、および／または９６位、ならびに任意選択的に、Ｖ$_{H}$の９５位以外の位置）、重鎖／軽鎖バリアントのライブラリを作製する。次いで、Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアントのライブラリをスクリーニングして、標的に対する所望の親和性を有するそれらのバリアントを同定する。したがって、特定の実施形態において、本明細書中に記載される方法は、（ａ）本明細書中の方法によって得られる重鎖／軽鎖対のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２および／またはＣＤＲ－Ｌ３を１つ以上の位置において変異誘発またはランダム化して、Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアントのライブラリを作製すること、（ｂ）Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアントのライブラリを標的（例えば、標的リガンドまたは標的抗原）と接触させること、（ｃ）Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアントに対する標的の結合を検出すること、および（ｄ）標的に特異的に結合するＶ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアントを得ることをさらに含む。上記のように、抗原結合ドメインバリアント中のＶ$_{L}$の９１位、９４位および／または９６位、ならびに任意選択的に、Ｖ$_{H}$中の９５位は、さらなるランダム化の標的とされない。抗体（またはその断片抗原結合断片）のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２および／またはＣＤＲ－Ｌ３を変異誘発する方法は当技術分野で公知であり、本明細書の他の箇所で論じられる。ライブラリおよびライブラリスクリーニングに関する詳細は、本明細書の他の箇所に提供される。

【０１０９】

特定の実施形態において、本明細書中に記載の方法は、（ｅ）標的に特異的に結合するＶ$_{H}$／Ｖ$_{L}$バリアント（すなわち、親和性成熟Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$対）の核酸配列を決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される方法は、（ｆ）親和性成熟Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$対を、抗体（例えば、二重特異性抗体）上にグラフトし、親和性成熟改変抗体（例えば、親和性成熟改変二重特異性抗体）とするステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される方法は、（ｇ）親和性成熟Ｖ$_{H}$／Ｖ$_{L}$対が、例えば、下記の方法を使用して、優先的対合／優先的集合を示す程度を評価するステップをさらに含む。

【０１１０】

上記の方法のいずれか１つまたは組合せに従って産生された抗体（例えば、単一特異性、二重特異性または多重特異性抗体）または抗体断片もまた本明細書で提供される。

抗体重鎖および軽鎖の優先的対合／優先的集合

【０１１１】

上記のように、優先的対合は、第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとの間で対合が起こる際に、１つ以上のさらなる別個のポリペプチド（例えば、さらなる重鎖および／または軽鎖）が同時に存在する場合の、第１のポリペプチド（例えば、重鎖）と第２のポリペプチド（例えば、軽鎖）との対合パターンを表す。優先的対合（例えば、同族対合）は、ＨＣ$_{1}$を少なくともＬＣ$_{1}$およびＬＣ$_{2}$と共発現させた場合の、ＨＣ$_{1}$／ＬＣ$_{1}$重鎖

－軽鎖の対合の量がＨＣ$_1$／ＬＣ$_2$の対合の量よりも多い場合、例えば抗体（例えば二重特異性抗体）のＨＣ$_1$とＬＣ$_1$との間で生じる。同様に、優先的対合（例えば、同族対合）は、ＨＣ$_2$が少なくともＬＣ$_1$およびＬＣ$_2$と共発現している場合に、ＨＣ$_2$／ＬＣ$_2$重鎖－軽鎖の対合の量がＨＣ$_2$／ＬＣ$_1$対合の量よりも多い場合、例えば多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）のＨＣ$_2$とＬＣ$_2$との間で生じる。ＨＣ$_1$／ＬＣ$_1$、ＨＣ$_1$／ＬＣ$_2$、ＨＣ$_2$／ＬＣ$_1$およびＨＣ$_2$／ＬＣ$_2$の対合は、本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されているように、当技術分野で公知の方法、例えば液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）によって測定し得る。

【０１１２】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法は、ＨＣ$_1$がＬＣ$_1$と優先的に対合する抗体（例えば二重特異性抗体）を生成する（例えば、産生する）ために使用される。追加的または代替的に、本明細書中に提供される方法は、ＨＣ$_2$がＬＣ$_2$と優先的に対合する抗体（例えば二重特異性抗体）を生成する（例えば、産生する）ために使用される。特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法は、ＨＣ$_1$がＬＣ$_1$と優先的に対合し、ＨＣ$_2$がＬＣ$_2$と優先的に対合する抗体（例えば二重特異性抗体）を生成する（例えば、産生する）ために使用される。特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法によって生成された抗体（例えば二重特異性抗体）のＨＣ$_1$が、ＨＣ$_2$、ＬＣ$_1$およびＬＣ$_2$と共発現される場合、所望の対合（例えば、ＨＣ$_1$／ＬＣ$_1$およびＨＣ$_2$／ＬＣ$_2$）を含む二重特異性抗体が、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９９％または約９９％超の相対的収率で産生され、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。所望の対合（例えば、ＨＣ$_1$／ＬＣ$_1$およびＨＣ$_2$／ＬＣ$_2$）を含む二重特異性抗体の相対的収率は、実施例に記載されるように、例えば質量分析を使用して決定し得る。

【０１１３】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して生成される抗体（例えば、二重特異性抗体）の発現ポリペプチドは、誤対合した重鎖および軽鎖の生成を減少させるために改善された特異性で集合する。特定の実施形態において、本明細書中に提供される抗体（例えば、二重特異性抗体）のＣ$_H$１のＶ$_H$ドメインは、産生中にＬＣ$_1$のＶ$_L$ドメインと集合する（例えば、優先的に集合する）。

正しい対合／優先的対合／優先的集合を評価する方法

【０１１４】

本明細書中に記載の方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）のＬＣ$_1$とのＨＣ$_1$の優先的対合、正しい対合および／または優先的集合は、当技術分野の当業者に周知の種々の方法のいずれか１つを使用して決定し得る。例えば、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）におけるＨＣ$_1$とＬＣ$_1$との優先的対合の程度は、軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）によって決定し得る。２０１３年１０月３日に出願された国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０６３３０６は、ＬＣＣＡの種々の実施形態を記載しており、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。この方法は、共発現されたタンパク質の混合物内における、重鎖と特定の軽鎖との対合の定量的分析を可能にし、重鎖と軽鎖が共発現されたときに、１つの特定の免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖のいずれかと選択的に会合するかどうかを決定するために使用し得る。この方法を以下のように簡単に説明する：少なくとも１つの重鎖および２つの異なる

軽鎖が、重鎖が制限対合反応物質であるような比率で細胞中に共発現され、任意選択的に、分泌されたタンパク質を細胞から分離し、重鎖に結合した免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドを分泌されたタンパク質の残りから分離して、単離された重鎖対合分画を生成し、単離された重鎖画分中の異なる軽鎖のそれぞれの量を検出し、単離された重鎖画分中の異なる軽鎖のそれぞれの相対量を分析して、少なくとも１つの重鎖が軽鎖の１つと選択的に対合する能力を決定する。

【０１１５】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性または多重特異性抗体）のＬＣ$_1$とＨＣ$_1$との優先的対合は、質量分析（例えば、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）、ネイティブ質量分析、酸性質量分析などである。）によって測定される。質量分析を使用して、分子量の差を使用して各軽鎖を含む相対的なヘテロ二量体集団を定量し、それぞれの異なる種を同定する。特定の実施形態において、正しいまたは優先的な対合は、本明細書中に記載のＬＣ－ＭＳによって決定される。特定の実施形態において、ＦｖまたはＦａｂの正しいまたは優先的な対合が測定される。

多重特異性抗体フォーマット

【０１１６】

本明細書中で提供される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）は、当技術分野で公知の種々の二重特異性または多重特異性抗体フォーマットのいずれか１つと共に使用することができる。複数の結合特異性を有する分子によってもたらされる治療機会に対処するために、多数のフォーマットが当技術分野で開発されている。特定の抗体軽鎖または断片が特定の抗体重鎖または断片と対合する二重特異性抗体を調製するためのいくつかのアプローチが記載されている。

【０１１７】

例えば、同族ＦａｂまたはＨＣとＬＣとの対合の選択的対合を促進するＣ$_H$１／Ｃ$_L$界面における突然変異は、Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０１７）ＭＡＢＳ ９（２）：２１３－２３０および国際公開第２０１６／１７２４８５号に記載されており、その内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０１１８】

ノブ・イントゥ・ホールは、抗体のＣ$_H$３ドメインについてのヘテロ二量体化技術である。これまで、ノブ・イントゥ・ホール技術は、単一の共通軽鎖（ＬＣ）を有するヒト全長二重特異性抗体の産生に適用されてきた（Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ.「Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｒｏｕｔｅ ｔｏ ｈｕｍａｎ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ.」Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９８；１６：６７７－８１、Ｊａｃｋｍａｎ ｅｔ ａｌ.「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｔｗｏ－ｐａｒｔ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｔｏ ｉｄｅｎｔｉｆｙ ａ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｈｕｍａｎ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｈａｔ ｉｎｈｉｂｉｔｓ ＩｇＥ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ.」Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２０１０；２８５：２０８５０－９）。国際公開第１９９６０２７０１１号もまた参照されたく、これはあらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０１１９】

本明細書中で提供される方法を使用して生成された抗体（例えば、二重特異性抗体）は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体を形成することに対して強い優先性を有する他のヘテロ二量体化ドメインを含むようにさらに改変することができる。例示的な例としては、例えば、国際公開第２００７１４７９０１号（Ｋｊａｅｒｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．－Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ：イオン相互作用を記載）；国際公開第２００９０８９００４号（Ｋａｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．－Ａｍｇｅｎ：静電ステアリング効果を記載）、国際公開第２０１０／０３４６０５号（Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．－Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、コイルドコイルを記載）。例えば、ロイシンジッパーを記載しているＰａｃｋ，Ｐ．＆Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３１，１５７９－１５８４（１

９９２）、またはヘリックス－ターン－ヘリックスモチーフを記載しているＰａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１１，１２７１－１２７７（１９９３）も参照のこと。「ヘテロ多量体化ドメイン」および「ヘテロ二量体化ドメイン」という語句は、本明細書で同義に使用される。特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して産生される抗体（例えば、二重特異性抗体）は、１つ以上のヘテロ二量体化ドメインを含む。

【０１２０】

米国特許出願公開第２００９／０１８２１２７号（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ，Ｉｎｃ．）は、一方の対の軽鎖が他方の対の重鎖と相互作用する能力を低下させる、軽重鎖対のＦｃ界面およびC_H1：C_L界面のアミノ酸残基を改変することによる、二重特異性抗体の生成を記載している。

【０１２１】

多重特異性抗体を作製するための技術としては、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え共発現（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ　３０５：５３７（１９８３）を参照）および「ノブ・イン・ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号およびＡｔｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７０：２６－３５（１９９７）を参照）が挙げられるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果を操作すること（例えば、国際公開第２００９／０８９００４号を参照）；２つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号およびＢｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照）；および、二重特異性抗体を作製するためにロイシンジッパーを使用すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）および国際公開第２０１１／０３４６０５号を参照）によっても作製し得る。

【０１２２】

多重特異性抗体はまた、同一の抗原特異性の１つ以上の結合アームにドメインクロスオーバーを持つ非対称形態で、すなわちV_H／V_Lドメイン（例えば、国際公開第２００９／０８０２５２号および国際公開第２０１５／１５０４４７号を参照）、C_H1／$C_)$ドメイン（例えば、国際公開第２００９／０８０２５３号を参照）または完全なＦａｂアーム（例えば、国際公開第２００９／０８０２５１号、国際公開第２０１６／０１６２９９号を参照、Ｓｃｈａｅｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ，１０８（２０１１）１１８７－１１９１、およびＫｌｅｉｎ　ａｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ　８（２０１６）１０１０－２０も参照）を交換することによっても提供され得る。一態様において、多重特異性抗体はクロス－Ｆａｂ断片を含む。「クロス－Ｆａｂ断片」または「ｘＦａｂ断片」または「クロスオーバーＦａｂ断片」という用語は、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されているＦａｂ断片を指す。クロスＦａｂ断片は、軽鎖可変領域（V_L）と重鎖定常領域１（C_H1）とで構成されるポリペプチド鎖、および重鎖可変領域（V_H）と軽鎖定常領域（C_L）とで構成されるポリペプチド鎖を含む。非対称Ｆａｂアームは、荷電または非荷電アミノ酸変異をドメイン界面に導入して、正しいＦａｂ対合に向かわせることによって操作することもできる。例えば、国際公開第２０１６／１７２４８５号を参照のこと。

【０１２３】

種々の二重特異性および多重特異性抗体フォーマットの総説は、Ｋｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１２）ｍＡｂｓ　４：６，６５３－６６３およびＳｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）“Ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｆｏｒｍａｔｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．”　Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６７（２０１５）９５－１０６に提供されている。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法によって作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）は、正しい重鎖／軽鎖の対合をさらに確実にするために、上記の多重特異性抗体フォーマットのいずれかに再フォーマットされる。

抗体の産生および精製

宿主細胞の培養

【０１２５】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性または多重特異性抗体）は、（ａ）HC_1、HC_2、LC_1およびLC_2をコードするポリヌクレオチドのセットを宿主細胞に導入すること；および（ｂ）前記宿主細胞を培養して、抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）を産生することによって産生し得る。特定の実施形態において、LC_1およびLC_2をコードするポリヌクレオチドを、所定の比率（例えば、モル比または重量比）で宿主細胞に導入する。一定の実施形態において、LC_1およびLC_2をコードするポリヌクレオチドは、LC_1：LC_2の比（例えば、モル比または重量比）が約１：１、約１：１．５、約１：２、約１：２．５、約１：３、約１：３．５、約１：４、約１：４．５、約１：５、約１：５．５、約１．５：１、約２：１、約２．５：１、約３：１、約３．５：１、約４：１、約４．５：１、約５：１または約５．５：１になるように導入され、ここで、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。特定の実施形態において、比はモル比である。特定の実施形態において、比は重量比である。特定の実施形態において、HC_1およびHC_2をコードするポリヌクレオチドは、所定の比（例えば、モル比または重量比）で宿主細胞に導入される。一定の実施形態において、HC_1およびHC_2をコードするポリヌクレオチドは、HC_1：HC_2　の比（例えば、モル比または重量比）が約１：１、約１：１．５、約１：２、約１：２．５、約１：３、約１：３．５、約１：４、約１：４．５、約１：５、約１：５．５、約１．５：１、約２：１、約２．５：１、約３：１、約３．５：１、約４：１、約４．５：１、約５：１または約５．５：１になるように宿主細胞に導入され、ここで、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。特定の実施形態において、比はモル比である。特定の実施形態において、比は重量比である。特定の実施形態において、HC_1、HC_2、LC_1およびLC_2をコードするポリヌクレオチドは、所定の比（例えば、モル比または重量比）で宿主細胞に導入される。一定の実施形態において、HC_1、HC_2、LC_1およびLC_2をコードするポリヌクレオチドは、HC_1＋HC_2：LC_1、＋LC_2の比（例えば、モル比または重量比）が約５：１、約５：２、約５：３、約５：４、約１：１、約４：５、約３：５、約２：５または約１：５になるように宿主細胞に導入され、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。特定の実施形態において、LC_1、LC_2、HC_1およびHC_2をコードするポリヌクレオチドは、LC_1＋LC_2：HC_1、＋HC_2の比（例えば、モル比または重量比）が約１：１：１：１、約２．８：１：１：１、約１．４：１：１：１、約１：１．４：１：１、約１：２．８：１：１、約１：１：２．８：１、約１：１：１．４：１、約１：１：１：２．８または約１：１：１：１．４になるように宿主細胞に導入され、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。特定の実施形態において、比はモル比である。特定の実施形態において、比は重量比である。

【０１２６】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性または多重特異性抗体）を産生することは、細胞への導入のためのポリヌクレオチドの最適比を決定することをさらに含む。特定の実施形態において、質量分析を使用して抗体収率（例えば、二重特異性抗体収率）を決定し、最適な鎖比を調整してタンパク質収率（例えば、二重特異性抗体収率）を最大化する。特定の実施形態において、本明細書中に提供した方法に従って生成された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）を産生することは、細胞培養物から抗体を採取または回収することをさらに含む。特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法に従って生成される抗体（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体）を産生することは、採取または回収された抗体を精製することをさらに含む。

【０１２７】
本明細書で提供される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養し得る。市販の培地、例えば、ハムＦ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、およびダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）が、宿主細胞の培養に好適である。さらにＨａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９），Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０），、米国特許第４，７６７，７０４号、米国特許第４，６５７，８６６号、米国特許第４，９２７，７６２号、米国特許第４，５６０，６５５号、または米国特許第５，１２２，４６９号、国際公開第９０／０３４３０号、国際公開第８７／００１９５号、または米国再特許第３０，９８５号に記載される培地のいずれも、宿主細胞の培養培地として使用し得る。これらの培地のうちのいずれかには、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬物）、微量元素（通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、ならびにグルコースまたは等価エネルギー源を補充し得る。任意の他の必要な補充物も当技術分野の当業者に公知であろう適切な濃度で含まれ得る。培養条件、例えば、温度、ｐＨ等は、発現のために選択された宿主細胞で既に使用したものであり、当業者には明らかであろう。

抗体の採取または回収および精製

【０１２８】
関連する態様において、本明細書中に記載される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を産生することは、上記の宿主細胞を、改変抗体の発現を可能にする条件下で培養すること、および改変抗体を回収する（例えば、採取する）ことを含む。特定の実施形態において、本明細書中に記載される方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を産生することは、例えば、さらなるアッセイおよび使用のために、実質的に均一な調製物を得るために、採取された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）を精製することをさらに含む。

【０１２９】
本明細書に記載の方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）は、細胞内で産生されても、または培地中に直接分泌されてもよい。かかる改変抗体が細胞内で産生される場合、第１のステップとして、微粒子残渣、宿主細胞または溶解断片のいずれかが、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。本明細書中に記載の方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）が培地に分泌される場合、そのような発現系からの上清は、一般的に、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えばＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、ＰＭＳＦ等のプロテアーゼ阻害剤が前述のステップのいずれかに含まれていてもよく、外来性混入物の増殖を防止するために、抗生物質が含まれていてもよい。

【０１３０】
当技術分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を使用して、本明細書中に記載の方法に従って作製された改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）の実質的に均一な調製物を細胞から得ることができる。以下の手順は、好適な精製手順の例である：免疫親和性またはイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカまたは陽イオン交換樹脂、例えば、ＤＥＡＥ等上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、および、例えばＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－７５を使用したゲル濾過。

【０１３１】
追加的または代替的に、本明細書中に記載される方法を使用して作製された改変抗体（

例えば、改変二重特異性抗体）は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析および親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技術である。

【０１３２】

特定の態様において、上記の細胞培養培地に由来する調製物を固相に固定化したプロテインＡ上に適用して、プロテインＡへの改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）の特異的結合を可能にする。次いで、固相を洗浄し、固相に非特異的に結合した混入物を除去する。改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）は、カオトロピック剤または中性洗剤を含む溶液への溶出によって固相から回収される。例示的なカオトロピック剤および中性洗剤としては、グアニジン－ＨＣｌ、尿素、過塩素酸リチウム、アルギニン、ヒスチジン、ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）、Ｔｗｅｅｎ、Ｔｒｉｔｏｎ、およびＮＰ－４０が含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらは全て市販されている。

【０１３３】

プロテインＡの親和性リガンドとしての好適性は、抗体（例えば、二重特異性抗体）中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するために使用し得る（Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３（１９８３））。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプおよびヒトγ３に対して推奨される（（Ｇｕｓｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．５：１５６７１５７５（１９８６））。親和性リガンドが結合するマトリックスは、ほとんどの場合、アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定なマトリックスにより、アガロースで達成され得るよりも速い流速および短いプロセシング時間が可能になる。改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）がC_H3ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，ＮＪ）は、精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上でのヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈殿も、回収される抗体（例えば、二重特異性抗体）に応じて利用可能である。

【０１３４】

任意の予備精製ステップ後、改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）および混入物を含む混合物は、約２．５～４．５のｐＨの溶出緩衝液を使用して、好ましくは、低塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍの塩）で行われる、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに供され得る。改変抗体（例えば、改変二重特異性抗体）の産生は、（前述の特定の方法のいずれかに対して）代替的または追加的に、ポリペプチドの混合物を含む溶液を透析することを含み得る。

ライブラリおよびライブラリスクリーニング

【０１３５】

優先的対合を示す重鎖／軽鎖対（またはその抗原結合断片）のライブラリも本また明細書中に提供される。

【０１３６】

例えば、複数の抗原結合ドメインバリアントであって、それぞれが、異なる抗体重鎖ドメイン（V_H）および異なる抗体軽鎖ドメイン（V_L）を含む抗原結合ドメインバリアントを含むライブラリが本明細書中に提供され、ここで、各V_Hは、異なるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２およびＣＤＲ－Ｈ３配列を含み、各V_Lは、異なるＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２およびＣＤＲ－Ｌ３配列を含み、各V_Lの９４位または各V_Lの９６位の少なくとも１つのアミノ酸は、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）、およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基であり、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、各V_Lの９４位および９６位置における２つアミ

ノ酸は共に、Ｄ、Ｒ、ＥおよびＫから独立して選択される荷電残基である。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９４位におけるアミノ酸は、Ｄである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９６位におけるアミノ酸は、Ｒである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＤであり、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸は、Ｒである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｈ$の９５位におけるアミノ酸は、Ｄ、Ｒ、ＥおよびＫから選択される荷電残基である。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｈ$の９５位のアミノ酸はＤである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＤであり、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸はＲであり、各$Ｖ_Ｈ$の９５位のアミノ酸はＤである。

【０１３７】

複数の抗原結合ドメインバリアントであって、それぞれが異なる抗体重鎖ドメイン（$Ｖ_Ｈ$）および異なる抗体軽鎖ドメイン（$Ｖ_Ｌ$）を含む抗原結合ドメインバリアントを含むライブラリも本明細書中に提供され、ここで、各$Ｖ_Ｈ$は、異なるＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２およびＣＤＲ－Ｈ３配列を含み、各$Ｖ_Ｌ$は、異なるＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３配列を含み、各$Ｖ_Ｌ$の９１位、各$Ｖ_Ｌ$の９４位、または各$Ｖ_Ｌ$の９６位の少なくとも１つのアミノ酸は、トリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基であり、ここで、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９１位、９４位、または９６位の少なくとも２つのアミノ酸（例えば、９１位および９４、９１位および９６位、または９４位および９６位）は、Ｗ、ＦおよびＹから選択される芳香族残基である。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９１位のアミノ酸はＹである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＹである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸はＷである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９１位のアミノ酸はＹであり、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＹである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９１位のアミノ酸はＹであり、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸はＷである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＹであり、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸はＷである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｌ$の９１位のアミノ酸はＹであり、各$Ｖ_Ｌ$の９４位のアミノ酸はＹであり、各$Ｖ_Ｌ$の９６位のアミノ酸はＷである。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｈ$の９５位のアミノ酸は、アスパラギン酸（Ｄ）、アルギニン（Ｒ）、グルタミン酸（Ｅ）、およびリジン（Ｋ）から選択される荷電残基であり、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔにしたがっている。いくつかの実施形態において、各$Ｖ_Ｈ$の９５位のアミノ酸は、トリプトファン（Ｗ）、フェニルアラニン（Ｆ）、およびチロシン（Ｙ）から選択される芳香族残基である。

【０１３８】

特定の実施形態において、ライブラリは、ポリペプチドライブラリ（例えば、本明細書中に記載される任意の複数のポリペプチド）である。特定の実施形態において、本明細書中に提供されるポリペプチドライブラリは、ポリペプチドディスプレイライブラリである。そのようなポリペプチドディスプレイライブラリをスクリーニングして、治療、予防、獣医学、診断、試薬または材料用途を含むがこれらに限定されない多種多様な有用性について所望の特性を有する結合タンパク質を選択および／または進化させることができる。特定の実施形態において、ライブラリは、核酸ライブラリ（本明細書に記載の核酸のいずれかの複数など）であり、ここで、各核酸（または核酸の群）が本明細書中に記載の異なる抗原ドメイン結合バリアントをコードする。いくつかの実施形態において、ライブラリは、それぞれが異なる核酸（または核酸の群）を含む（および、例えば、発現する）複数の宿主細胞（例えば、原核宿主細胞または真核宿主細胞）であり、ここで、それぞれの異なる核酸（または核酸の群）は、本明細書中に記載の異なる抗原ドメイン結合バリアントをコードする。

【０１３９】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、少なくとも２、３、４、５、１０、３０、１００、２５０、５００、７５０、１０００、２５００、５０００、７５００、１００００、２５０００、５００００、７５０００、１０００００、２５０

０００、５０００００、７５００００、１０００００００、２５０００００、５０００００００、７５０００００、１００００００００または１００００００００超の異なる抗原結合ドメイン含み、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、約２、約５、約１０、約５０、約１００、約２５０、約５００、約７５０、約10^3、約10^4、約10^5、約10^6、約10^7、約10^8、約10^9、約10^{10}、約10^{11}、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、または約10^{14}超（例えば、約10^{15}または約10^{16}）の配列多様性を有し、これらの値の間の任意の範囲も含まれる。

【０１４０】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、遺伝子工学によって作製される。突然変異誘発およびその後のライブラリ構築のための種々の方法が以前に（スクリーニングまたは選択のための適切な方法と共に）記載されている。そのような突然変異誘発方法としては、例えば、エラープローンＰＣＲ、ループシャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指向突然変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入、または組換え前の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法に関するさらなる詳細は、例えば、Ａｂｏｕ－Ｎａｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｂｕｇｓ １，３３７－３４０、Ｆｉｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２１，３３１４－３３１５、Ｃｉｒｉｎｏ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２３１，３－９、Ｐｉｒａｋｉｔｉｋｕｌｒ（２０１０）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ １９，２３３６－２３４６、Ｓｔｅｆｆｅｎｓ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ Ｔｅｃｈ １８，１４７－１４９、およびその他に記載されている。したがって、特定の実施形態において、遺伝子工学技術を介して作製された多重特異性抗原結合タンパク質ライブラリが提供される。

【０１４１】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、インビトロ翻訳によって作製される。簡潔には、インビトロ翻訳は、タンパク質コード配列を、プロモーターを含有するベクターにクローニングすること、クローニングされた配列をＲＮＡポリメラーゼを用いて転写することによってｍＲＮＡを産生すること、および例えば無細胞抽出物を使用してインビトロでこのｍＲＮＡを翻訳することによってタンパク質を合成することを伴う。所望の変異タンパク質は、クローニングされたタンパク質コード配列を変更するだけで生成することができる。多くのｍＲＮＡは、小麦胚芽抽出物またはウサギ網状赤血球溶解物において効率的に翻訳し得る。インビトロ翻訳に関するさらなる詳細は、例えば、Ｈｏｐｅ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｃｅｌｌ ４３，１７７－１８８、Ｈｏｐｅ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｃｅｌｌ ４６，８８５－８９４、Ｈｏｐｅ ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６，２７８１－２７８４、Ｈｏｐｅ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３３，６３５－６４０、および Ｍｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１２，７０５７－７０７０に記載されている。

【０１４２】

したがって、本明細書中に記載のポリペプチドディスプレイライブラリをコードする複数の核酸分子が提供される。複数の核酸分子に作動可能に連結された発現ベクターもまた本明細書中に提供される。本明細書中に記載の複数の抗原結合ドメインをコードする複数の核酸を提供し、核酸を発現させることによって、本明細書中に提供されるライブラリを作製する方法も提供される。

【０１４３】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、化学合成によって作製される。固相および液相ペプチド合成の方法は当技術分野で周知であり、例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３５，Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，（Ｍ．Ｗ．Ｐｅｎｎｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｂ．Ｍ．Ｄｕｎｎ Ｅｄｓ），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，１９９４、Ｗｅｌｓｃｈ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ １４，１－１５、Ｍｅｔｈｏｄｓ

of Enzymology, 289, Solid Phase Peptide Synthesis, (G. B. Fields Ed.), Academic Press, 1997、Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, (P. Lloyd-Williams, F. Albericio, and E. Giralt Eds), CRC Press, 1997、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, (W. C. Chan, P. D. White Eds), Oxford University Press, 2000、Solid Phase Synthesis, A Practical Guide, (S. F. Kates, F Albericio Eds), Marcel Dekker, 2000、P. Seneci, Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies, John Wiley & Sons, 2000、Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (M. Goodman, Editor-in-chief, A. Felix, L. Moroder, C. Tmiolo Eds), Thieme, 2002、N. L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, 2005、Methods in Molecular Biology, 298, Peptide Synthesis and Applications, (J. Howl Ed) Humana Press, 2005、およびAmino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 3, Building Blocks, Catalysts and Coupling Chemistry, (A. B. Hughs, Ed.) Wiley-VCH, 2011に記載されている。したがって、特定の実施形態において、化学合成技術によって作製された多重特異性抗原結合タンパク質ライブラリが提供される。

【0144】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、ディスプレイライブラリである。特定の実施形態において、ディスプレイライブラリは、ファージディスプレイライブラリ、ファージミドディスプレイライブラリ、ウイルスディスプレイライブラリ、細菌ディスプレイライブラリ、酵母ディスプレイライブラリ、λgt11ライブラリ、CISディスプレイライブラリおよびインビトロ区画化ライブラリ、またはリボソームディスプレイライブラリである。そのようなディスプレイライブラリを作製およびスクリーニングする方法は当技術分野の当業者に周知であり、例えばMolek et al. (2011) Molecules 16, 857-887、Boder et al., (1997) Nat Biotechnol 15, 553-557、Scott et al. (1990) Science 249, 386-390、Brisette et al. (2007) Methods Mol Biol 383, 203-213、Kenrick et al. (2010) Protein Eng Des Sel 23, 9-17、Freudl et al. (1986) J Mol Biol 188, 491-494、Getz et al. (2012) Methods Enzymol 503, 75-97、Smith et al. (2014) Curr Drug Discov Technol 11, 48-55、Hanes, et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94, 4937-4942、Lipovsek et al., (2004) J Imm Methods 290, 51-67、Ullman et al. (2011) Brief. Funct. Genomics, 10, 125-134、Odegrip et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 2806-2810、およびMiller et al. (2006) Nat Methods 3, 561-570に記載されている。

【0145】

特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、例えば、Szost

ａｋ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第６２５８５５８号、米国特許第６２６１８０４号、米国特許第５６４３７６８号および米国特許第５６５８７５４号に記載される技術によって作製されるＲＮＡ－タンパク質融合ライブラリである。特定の実施形態において、本明細書中に提供されるライブラリは、例えば、米国特許第６４１６９５０号に記載されるようなＤＮＡ－タンパク質ライブラリである。

スクリーニング方法

【０１４６】

本明細書中で提供されるライブラリをスクリーニングして、目的の標的（例えば、抗原）に対して高い親和性を有する抗原結合バリアントを同定することができる。したがって、目的の標的（例えば、本明細書の他の箇所に記載されている目的の標的）に結合する抗原結合バリアントを得る方法が本明細書中に提供される。

【０１４７】

特定の実施形態において、本方法は、ａ）目的の標的と、前記標的に特異的に結合するライブラリ中の抗原結合ドメインバリアントとの結合を可能にする条件下で、本明細書中に記載するライブラリを接触させること、ｂ）標的と、前記標的に特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントとの結合を検出すること（例えば、前記標的と、前記標的に特異的に結合する前記抗原結合ドメインバリアントとを含む複合体を検出すること）、およびｃ）標的に特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントを得ることを含む。いくつかの実施形態において、方法は、このようにして同定された抗原結合ドメインバリアントを少なくとも１つの親和性成熟ステップに供することをさらに含み、ここで、抗原結合ドメインバリアントのV_Lにおける９１位、９４位および／または９６位のアミノ酸はランダム化のために選択されない。いくつかの実施形態において、V_H中の９５位のアミノ酸は、ランダム化のために選択されない。

【０１４８】

いくつかの実施形態において、本方法は、目的の標的に結合する抗原結合ドメインバリアント（例えば、目的の標的に結合する親和性成熟抗原結合ドメインバリアント）を含む抗体（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体）を作製することをさらに含む。

【０１４９】

特定の実施形態において、標的と、標的に特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントとを含む複合体が提供される。特定の実施形態において、本方法は、抗原結合ドメインバリアントのV_Hおよび／またはV_Lの核酸配列を決定することをさらに含む。

【０１５０】

親和性成熟は、抗原結合ドメインバリアントが、標的（例えば、標的リガンドまたは標的抗原）に対する親和性の上昇を選択するスキームに供されるプロセスである（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９５，６０３７－４２参照）。特定の実施形態において、第１の標的リガンドに特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントは、ライブラリスクリーニングからの同定後にさらにランダム化される（すなわち、上記の位置すなわち、V_Lの９１位、９４位、および／または９６位、ならびに任意選択で、V_Hの９５位以外の位置）。例えば、特定の実施形態において、第１の標的リガンドに特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントを得る方法は、（ｅ）さらなる抗原結合ドメインバリアントを作製するために、以前に同定された抗原結合ドメインバリアントのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２および／またはＣＤＲ－Ｌ３を突然変異誘発またはランダム化すること、（ｆ）第１の標的リガンドをさらなるランダム化抗原結合ドメインバリアントと接触させること、（ｇ）さらなるランダム化抗原結合ドメインバリアントに対する標的の結合を検出すること、ならびに（ｈ）標的に特異的に結合するさらなるランダム化抗原結合ドメインバリアントを得ることをさらに含む。上記のように、抗原結合ドメインバリアント中のV_L中の９１位、９４位および／または９６位、ならびに任意選択的に、V_H中の９５位は、さらなるランダム化の標的とされない。抗原結合ドメインのＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２および／またはＣＤＲ－Ｌ３を変異誘発する方

法は当技術分野で公知であり、例えば、ランダム変異誘発、ＣＤＲウォーキング変異誘発または逐次並行最適化、構造ベースの合理的設計による変異誘発、部位特異的変異誘発、酵素ベースの変異誘発、化学ベースの変異誘発、および合成抗体遺伝子産生のための遺伝子合成方法が挙げられる。例えば、ｅ．ｇ．，Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９５，ＣＤＲ Ｗａｌｋｉｎｇ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｍｕｔａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｐｏｔｅｎｔ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉ－ＨＩＶ－１ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎｔｏ ｔｈｅ Ｐｉｃｏｍｏｌａｒ Ｒａｎｇｅ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５４：３９２－４０、およびＬｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１９，Ｒｅｖｉｅｗ：Ｃｏｇｎｉｚａｎｃｅ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｕｔａｇｅｎｉｃ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ ｆｏｒ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｓｃｉ，２０：１８６１を参照されたく、その内容はいずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【０１５１】

特定の実施形態において、本方法は、（ｉ）標的に特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントの核酸配列を決定することをさらに含む。

【０１５２】

特定の実施形態において、さらなるランダム化された抗原結合ドメインバリアントは、第１のライブラリにおいて以前にランダム化されていない少なくとも１つまたは少なくとも２つのランダム化ＣＤＲを含む。標的に対して十分な親和性を有する抗原結合ドメインバリアントが得られるまで、複数回のランダム化（すなわち、V_L内の９１位、９４位、および／または９６位、ならびに任意選択的に、V_H内の９５位以外）、スクリーニングおよび選択を行うことができる。したがって、特定の実施形態において、ステップ（ｅ）～（ｈ）またはステップ（ｅ）～（ｉ）を、第１の標的リガンドに特異的に結合する抗原結合ドメインバリアントを同定するために、１回、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回または１０回超繰り返す。いくつかの実施形態において、２回以上のランダム化、スクリーニングおよび選択を受けた抗原結合ドメインバリアントは、１回のランダム化、スクリーニングおよび選択を受けた抗原結合ドメインバリアントの親和性と少なくとも同程度の親和性で標的に結合する。

【０１５３】

本明細書中に記載の抗原結合ドメインバリアントのライブラリは、標的リガンドに特異的に結合する新規または改善された結合タンパク質を進化させるために、当技術分野で公知の任意の技術によってスクリーニングし得る。特定の実施形態において、標的リガンドを固体支持体（例えば、カラム樹脂またはマイクロタイタープレートウェル）に固定化し、標的リガンドを、候補多重特異性抗原結合タンパク質のライブラリ（例えば、本明細書中に記載の任意のライブラリ）と接触させる。選択技術は、例えば、ファージディスプレイ（Ｓｍｉｔｈ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８，１３１５－１３１７）、ｍＲＮＡディスプレイ（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９８：３７５０－３７５５）細菌ディスプレイ（Ｇｅｏｒｇｉｏｕ，ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １５：２９－３４．）、酵母ディスプレイ（Ｂｏｄｅｒ ａｎｄ Ｗｉｔｔｒｕｐ（１９９７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３－５５７７）またはリボソームディスプレイ（Ｈａｎｅｓ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（１９９７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９４：４９３７－４９４２および国際公開第２００８／０６８６３７号）であり得る。

【０１５４】

特定の実施形態において、抗原結合ドメインバリアントのライブラリはファージディスプレイライブラリである。特定の実施形態において、本明細書中に記載の抗原結合ドメインバリアントを提示するファージ粒子が提供される。特定の実施形態において、標的リガンドに結合することができる本明細書中に記載の抗原結合ドメインバリアントを提示するファージ粒子が提供される。

【０１５５】
ファージディスプレイは、複数の多重特異性抗原結合タンパク質バリアントを、バクテリオファージ粒子表面のコートタンパク質との融合タンパク質として提示する技術である（Ｓｍｉｔｈ，Ｇ．Ｐ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２８：１３１５－７、Ｓｃｏｔｔ，Ｊ．Ｋ．ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｇ．Ｐ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６、Ｓｅｒｇｅｅｖａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．（２００６）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５８：１６２２－５４）。ファージディスプレイの有用性は、ランダム化されたタンパク質バリアントの大きいライブラリが標的抗原に高親和性で結合する配列のために迅速かつ効率的に選別され得るという事実にある。

【０１５６】
ファージ上のペプチド（Ｃｗｉｒｌａ，Ｓ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：６３７８）またはタンパク質（Ｌｏｗｍａｎ，Ｈ．Ｂ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３０：１０８３２、Ｃｌａｃｋｓｏｎ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４、Ｍａｒｋｓ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９１），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１、Ｋａｎｇ，Ａ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：８３６３）ライブラリの提示は、特異的結合特性を有するものについて数百万のポリペプチドまたはオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されてきた（Ｓｍｉｔｈ，Ｇ．Ｐ．（１９９１）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２：６６８、Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．Ｍａｙ ９５，６０３７－４２）。多価ファージディスプレイ法は、線維状ファージの遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩのいずれかへの融合によりランダム小ペプチドおよび小タンパク質を提示するために使用されている（Ｗｅｌｌｓ ａｎｄ Ｌｏｗｍａｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，３：３５５－３６２（１９９２）、およびそこに引用されている参照文献）。一価ファージディスプレイにおいて、タンパク質またはペプチドライブラリは、遺伝子ＩＩＩまたはその一部に融合され、野生型遺伝子ＩＩＩタンパク質の存在下で、低レベルで発現され、これにより、ファージ粒子が融合タンパク質を１コピー提示するか、または全く提示しないようになっている。結合力効果は、選別が内因性リガンド親和性に基づくように多価ファージに対して低減され、ファージミドベクターが使用され、これにより、ＤＮＡ操作が簡略化される（Ｌｏｗｍａｎ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ａ ｃｏｍｐａｎｉｏｎ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，３：２０５－０２１６（１９９１）．）。

【０１５７】
抗原結合ドメインバリアントのファージライブラリの選別は、多数のバリアントの構築および増殖、標的リガンドを使用した親和性精製の手順、および結合富化の結果を評価する手段を必要とする（例えば、米国特許第５２２３４０９号、米国特許第５４０３４８４号、米国特許第５５７１６８９号書、および米国特許第５６６３１４３号を参照のこと）。

【０１５８】
ほとんどのファージディスプレイ法は、繊維状ファージ（例えば、Ｍ１３ファージ）を使用する。ラムドイドファージディスプレイシステム（国際公開第１９９５／３４６８３号、米国特許第５６２７０２４号参照）、Ｔ４ファージディスプレイシステム（Ｒｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｇｅｎｅ ２１５：４３９、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５８：３２０９－３２１４、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ＆Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，６５：４７７０－４７７７、Ｒｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｇｅｎｅ，１９５：３０３－３１１、Ｒｅｎ（１９９６）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．，５：１８３３、Ｅｆｉｍｏｖ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ，１０：１７３）およびＴ７ファージディスプレイシステム（Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｓｃｏｔｔ（１９９３）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２１７：２２８－２５７、米国特許第５７６６９０５号）も公知である。

【０１５９】
基本的なファージディスプレイ概念の他の多くの改善および変形が現在開発されている。これらの改善は、ディスプレイシステムが、選択された標的分子に結合するためのペプチドライブラリをスクリーニングし、所望の特性についてこれらのタンパク質をスクリーニングする可能性を有する機能性タンパク質を提示する能力を高める。ファージディスプレイ反応のためのコンビナトリアル反応デバイスが開発され（国際公開第１９９８／１４２７７号）、ファージディスプレイライブラリを使用して、二分子相互作用（国際公開第１９９８／２０１６９号、国際公開第１９９８／２０１５９号）および拘束ヘリカルペプチドの特性（国際公開第１９９８／２００３６号）が分析および制御されている。国際公開第１９９７／３５１９６号は、ファージディスプレイライブラリを、リガンドが標的分子に結合する１の溶液および親和性リガンドが標的分子に結合しない第２の溶液と接触させて、結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドを単離する方法を記載している。国際公開第１９９７／４６２５１号は、親和性精製抗体を用いてランダムファージディスプレイライブラリをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートウェルを使用してマイクロパニングプロセスを行って高親和性結合ファージを単離する方法を記載している。そのような方法は、本明細書中に開示される抗原結合ドメインバリアントのライブラリに適用され得る。親和性タグとして黄色ブドウ球菌プロテインＡを使用することも報告されている（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｍｏｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：１８７）。国際公開第１９９７／４７３１４号は、ファージディスプレイライブラリであり得るコンビナトリアルライブラリを使用して酵素特異性を区別するための基質減算ライブラリの使用を記載している。特異的結合タンパク質を選択するさらなる方法は、米国特許第５４９８５３８号、米国特許第５４３２０１８号および国際公開第１９９８／１５８３３号に記載されている。ペプチドライブラリを作製し、これらのライブラリをスクリーニングする方法は、米国特許第５７２３２８６号、米国特許第５４３２０１８号、米国特許第５５８０７１７号、米国特許第５４２７９０８号、米国特許第５４９８５３０号、米国特許第５７７０４３４号、米国特許第５７３４０１８号、米国特許第５６９８４２６号、米国特許第５７６３１９２号および米国特許第５７２３３２３号にも開示されている。

例示的な抗原／標的分子

【０１６０】
本明細書中に提供される方法を使用して産生される抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）によって標的化され得る分子の例としては、可溶性血清タンパク質およびその受容体ならびに他の膜結合タンパク質（例えば、アドヘシン）が含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態において、本明細書中に提供される多重特異性抗原結合タンパク質は、８ＭＰＩ、８ＭＰ２、８ＭＰ３８（ＧＤＦＩＯ）、８ＭＰ４、８ＭＰ６、８ＭＰ８、ＣＳＦＩ（Ｍ－ＣＳＦ）、ＣＳＦ２（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＣＳＦ３（Ｇ－ＣＳＦ）、ＥＰＯ、ＦＧＦ１（αＦＧＦ）、ＦＧＦ２（βＦＧＦ）、ＦＧＦ３（ｉｎｔ－２）、ＦＧＦ４（ＨＳＴ）、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６（ＨＳＴ－２）、ＦＧＦ７（ＫＧＦ）、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１２Ｂ、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２３、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、ＩＦＮＡ１、ｇ１

【０１６１】
ＩＦＮＡ２、ＩＦＮＡ４、ＩＦＮＡ５、ＩＦＮＡ６、ＩＦＮＡ７、ＩＦＮ８１、ＩＦＮＧ、ＩＦＮＷＩ、ＦＥＬ１、ＦＥＬ１（ＥＰＳＥＬＯＮ）、ＦＥＬ１（ＺＥＴＡ）、ＩＬ１Ａ、ＩＬ　１Ｂ、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ　１１、ＩＬ　１２Ａ、ＩＬ　１２Ｂ、ＩＬ　１３、ＩＬ　１４、ＩＬ１５、ＩＬ　１６、ＩＬ　１７、ＩＬ　１７Ｂ、ＩＬ　１８、ＩＬ　１９、ＩＬ２０、ＩＬ２２、ＩＬ２３、ＩＬ２４、ＩＬ２５、ＩＬ２６、ＩＬ２７、ＩＬ２８Ａ、ＩＬ２８Ｂ、ＩＬ２９、ＩＬ３０、ＰＤＧＦＡ、ＰＤＧＦＢ、ＴＧＦＡ、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢｂ３、ＬＴＡ（ＴＮＦ－β）、ＬＴＢ、ＴＮＦ（ＴＮＦ－α）、ＴＮＦＳＦ４（

ＯＸ４０リガンド）、ＴＮＦＳＦ５（ＣＤ４０リガンド）、ＴＮＦＳＦ６（ＦａｓＬ）、ＴＮＦＳＦ７（ＣＤ２７リガンド）、ＴＮＦＳＦ８（ＣＤ３０リガンド）、ＴＮＦＳＦ９（４－１　ＢＢリガンド）、ＴＮＦＳＦ１０（ＴＲＡＩＬ）、ＴＮＦＳＦ１１（ＴＲＡＮＣＥ）、ＴＮＦＳＦ１２（ＡＰＯ３Ｌ）、ＴＮＦＳＦ１３（Ａｐｒｉｌ）、ＴＮＦＳＦ１３Ｂ、ＴＮＦＳＦ１４（ＨＶＥＭ－Ｌ）、ＴＮＦＳＦ１５（ＶＥＧＩ）、ＴＮＦＳＦ１８、ＨＧＦ（ＶＥＧＦＤ）、ＶＥＧＦ、ＶＥＦＧＡ、ＶＥＧＦＢ、ＶＥＧＦＣ、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ１ＲＬ１、ＩＬ１ＲＬ２、ＩＬ２ＲＡ、ＩＬ２ＲＢ、ＩＬ２ＲＧ、ＩＬ３ＲＡ、ＩＬ４Ｒ、ＩＬ５ＲＡ、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ８ＲＡ、ＩＬ８ＲＢ、ＩＬ９Ｒ、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＩＬ１１ＲＡ、ＩＬ１２ＲＢ１、ＩＬ１２ＲＢ２、ＩＬ１３ＲＡ１、ＩＬ１３ＲＡ２、ＩＬ１５ＲＡ、ＩＬ１７Ｒ、ＩＬ１８Ｒ１、ＩＬ２０ＲＡ、ＩＬ２１Ｒ、ＩＬ２２Ｒ、ＩＬ１ＨＹ１、ＩＬ１ＲＡＰ、ＩＬ１ＲＡＰＬ１、ＩＬ１ＲＡＰＬ２、ＩＬ１ＲＮ、ＩＬ６ＳＴ、ＩＬ１８ＢＰ、ＩＬ１８ＲＡＰ、ＩＬ２２ＲＡ２、ＡＩＦ１、ＨＧＦ、ＬＥＰ（レプチン）、ＰＴＮ、およびＴＨＰＯからなる群から選択される１つ、２つまたはそれより多くのサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質およびサイトカイン受容体に結合することができる。

【０１６２】

他の実施形態において、標的分子は、ＣＣＬＩ（１－３０９）、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１／ＭＣＡＦ）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－Ｉβ）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＣＬ７（ＭＣＰ－３）、ＣＣＬ８（ｍｃｐ－２）、ＣＣＬ１１（エオタキシン）、ＣＣＬ１３（ＭＣＰ－４）、ＣＣＬ１５（ＭＩＰ－Ｉδ）、ＣＣＬ　１６（ＨＣＣ－４）、ＣＣＬ１７（ＴＡＲＣ）、ＣＣＬ１８（ＰＡＲＣ）、ＣＣＬ１９（ＭＤＰ－３ｂ）、ＣＣＬ２０（ＭＩＰ－３α）、ＣＣＬ２１（ＳＬＣ／ｅｘｏｄｕｓ－２）、ＣＣＬ２２（ＭＤＣ／ＳＴＣ－１）、ＣＣＬ２３（ＭＰＩＦ－１）、ＣＣＬ２４（ＭＰＩＦ－２／エオタキシン－２）、ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）、ＣＣＬ２６（エオタキシン－３）、ＣＣＬ２７（ＣＴＡＣＫ／ＩＬＣ）、ＣＣＬ２８、ＣＸＣＬＩ（ＧＲＯＩ）、ＣＸＣＬ２（ＧＲ０２）、ＣＸＣＬ３（ＧＲ０３）、ＣＸＣＬ５（ＥＮＡ－７８）、ＣＸＣＬ６（ＧＣＰ－２）、ＣＸＣＬ９（ＭＩＧ）、ＣＸＣＬ１０（ＩＰ１０）、ＣＸＣＬ１１（１－ＴＡＣ）、ＣＸＣＬ１２（ＳＤＦＩ）、ＣＸＣＬ１３、ＣＸＣＬ１４、ＣＸＣＬ１６、ＰＦ４（ＣＸＣＬ４）、ＰＰＢＰ（ＣＸＣＬ７）、ＣＸ３ＣＬ　１（ＳＣＹＤＩ）、ＳＣＹＥＩ、ＸＣＬＩ（リンホタクチン）、ＸＣＬ２（ＳＣＭ－Ｉβ）、ＢＬＲＩ（ＭＤＲ１５）、ＣＣＢＰ２（Ｄ６／ＪＡＢ６１）、ＣＣＲＩ（ＣＫＲＩ／ＨＭ１４５）、ＣＣＲ２（ｍｃｐ－ＩＲＢ　ＩＲＡ）、ＣＣＲ３（ＣＫＲ３／ＣＭＫＢＲ３）、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５（ＣＭＫＢＲ５／ＣｈｅｍＲ１３）、ＣＣＲ６（ＣＭＫＢＲ６／ＣＫＲ－Ｌ３／ＳＴＲＬ２２／ＤＲＹ６）、ＣＣＲ７（ＣＫＲ７／ＥＢＩＩ）、ＣＣＲ８（ＣＭＫＢＲ８／ＴＥＲ１／ＣＫＲ－Ｌ１）、ＣＣＲ９（ＧＰＲ－９－６）、ＣＣＲＬ１（ＶＳＨＫ１）、ＣＣＲＬ２（Ｌ－ＣＣＲ）、ＸＣＲ１（ＧＰＲ５／ＣＣＸＣＲ１）、ＣＭＫＬＲ１、ＣＭＫＯＲ１（ＲＤＣ１）、ＣＸ３ＣＲ１（Ｖ２８）、ＣＸＣＲ４、ＧＰＲ２（ＣＣＲ１０）、ＧＰＲ３１、ＧＰＲ８１（ＦＫＳＧ８０）、ＣＸＣＲ３（ＧＰＲ９／ＣＫＲ－Ｌ２）、ＣＸＣＲ６（ＴＹＭＳＴＲ／ＳＴＲＬ３３／Ｂｏｎｚｏ）、ＨＭ７４、ＩＬ８ＲＡ（ＩＬ８Ｒα）、ＩＬ８ＲＢ（ＩＬ８Ｒβ）、ＬＴＢ４Ｒ（ＧＰＲ１６）、ＴＣＰ１０、ＣＫＬＦＳＦ２、ＣＫＬＦＳＦ３、ＣＫＬＦＳＦ４、ＣＫＬＦＳＦ５、ＣＫＬＦＳＦ６、ＣＫＬＦＳＦ７、ＣＫＬＦＳＦ８、ＢＤＮＦ、Ｃ５Ｒ１、ＣＳＦ３、ＧＲＣＣ１０（Ｃ１０）、ＥＰＯ、ＦＹ（ＤＡＲＣ）、ＧＤＦ５、ＨＤＦ１、ＨＤＦ１α、ＤＬ８、ＰＲＬ、ＲＧＳ３、ＲＧＳ１３、ＳＤＦ２、ＳＬＩＴ２、ＴＬＲ２、ＴＬＲ４、ＴＲＥＭ１、ＴＲＥＭ２、およびＶＨＬからなる群から選択される、ケモカイン、ケモカイン受容体、またはケモカイン関連タンパク質である。

【０１６３】

他の実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して産生される抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、ＡＢＣＦ１；ＡＣＶＲ１；ＡＣＶＲ１Ｂ；ＡＣＶＲ２；ＡＣＶＲ２Ｂ；ＡＣＶＲＬ１；ＡＤＯＲＡ２Ａ；アグリカン；ＡＧＲ２；ＡＩ

ＣＤＡ；ＡＩＦ１；ＡＩＧ１；ＡＫＡＰ１；ＡＫＡＰ２；ＡＭＨ；ＡＭＨＲ２；ＡＮＧＰＴＬ；ＡＮＧＰＴ２；ＡＮＧＰＴＬ３；ＡＮＧＰＴＬ４；ＡＮＰＥＰ；ＡＰＣ；ＡＰＯＣ１；ＡＲ；ＡＺＧＰ１（亜鉛－ａ－糖タンパク質）；Ｂ７．１；Ｂ７．２；ＢＡＤ；ＢＡＦＦ（ＢＬｙｓ）；ＢＡＧ１；ＢＡＩ１；ＢＣＬ２；ＢＣＬ６；ＢＤＮＦ；ＢＬＮＫ；ＢＬＲＩ（ＭＤＲ１５）；ＢＭＰ１；ＢＭＰ２；ＢＭＰ３Ｂ（ＧＤＦ１０）；ＢＭＰ４；ＢＭＰ６；ＢＭＰ８；ＢＭＰＲ１Ａ；ＢＭＰＲ１Ｂ；ＢＭＰＲ２；ＢＰＡＧ１（プレクチン）；ＢＲＣＡ１；Ｃ１９ｏｒｆ１０（ＩＬ２７ｗ）；Ｃ３；Ｃ４Ａ；Ｃ５；Ｃ５Ｒ１；ＣＡＮＴ１；ＣＡＳＰ１；ＣＡＳＰ４；ＣＡＶ１；ＣＣＢＰ２（Ｄ６／ＪＡＢ６１）；ＣＣＬ１（１－３０９）；ＣＣＬ１１（エオタキシン）；ＣＣＬ１３（ＭＣＰ－４）；ＣＣＬ１５（ＭＩＰ１δ）；ＣＣＬ１６（ＨＣＣ－４）；ＣＣＬ１７（ＴＡＲＣ）；ＣＣＬ１８（ＰＡＲＣ）；ＣＣＬ１９（ＭＩＰ－３β）；ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）；ＭＣＡＦ；ＣＣＬ２０（ＭＩＰ－３α）；ＣＣＬ２１（ＭＴＰ－２）；ＳＬＣ；ｅｘｏｄｕｓ－２；ＣＣＬ２２（ＭＤＣ／ＳＴＣ－１）；ＣＣＬ２３（ＭＰＩＦ－１）；ＣＣＬ２４（ＭＰＩＦ－２／エオタキシン－２）；ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）；ＣＣＬ２６（ｅｏｔａｘｉｎ－３）；ＣＣＬ２７（ＣＴＡＣＫ／ＩＬＣ）；ＣＣＬ２８；ＣＣＬ３（ＭＴＰ－Ⅰα）；ＣＣＬ４（ＭＤＰ－Ⅰβ）；ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）；ＣＣＬ７（ＭＣＰ－３）；ＣＣＬ８（ｍｃｐ－２）；ＣＣＮＡ１；ＣＣＮＡ２；ＣＣＮＤ１；ＣＣＮＥ１；ＣＣＮＥ２；ＣＣＲ１（ＣＫＲＩ　／ＨＭ１４５）；ＣＣＲ２（ｍｃｐ－ＩＲβ／ＲＡ）；ＣＣＲ３（ＣＫＲ／　ＣＭＫＢＲ３）；ＣＣＲ４；ＣＣＲ５（ＣＭＫＢＲ５／ＣｈｅｍＲ１３）；ＣＣＲ６（ＣＭＫＢＲ６／ＣＫＲ－Ｌ３／ＳＴＲＬ２２／ＤＲＹ６）；ＣＣＲ７（ＣＫＢＲ７／ＥＢＩ１）；ＣＣＲ８（ＣＭＫＢＲ８／ＴＥＲ１／ＣＫＲ－Ｌ１）；ＣＣＲ９（ＧＰＲ－９－６）；ＣＣＲＬ１（ＶＳＨＫ１）；ＣＣＲＬ２（Ｌ－ＣＣＲ）；ＣＤ１６４；ＣＤ１９；ＣＤ１Ｃ；ＣＤ２０；ＣＤ２００；ＣＤ２２；ＣＤ２４；ＣＤ２８；ＣＤ３；ＣＤ３７；ＣＤ３８；ＣＤ３Ｅ；ＣＤ３Ｇ；ＣＤ３Ｚ；ＣＤ４；ＣＤ４０；ＣＤ４０Ｌ；ＣＤ４４；ＣＤ４５ＲＢ；ＣＤ５２；ＣＤ６９；ＣＤ７２；ＣＤ７４；ＣＤ７９Ａ；ＣＤ７９Ｂ；ＣＤＳ；ＣＤ８０；ＣＤ８１；ＣＤ８３；ＣＤ８６；ＣＤＨ１（Ｅ－カドヘリン）；ＣＤＨ１０；ＣＤＨ１２；ＣＤＨ１３；ＣＤＨ１８；ＣＤＨ１９；ＣＤＨ２０；ＣＤＨ５；ＣＤＨ７；ＣＤＨ８；ＣＤＨ９；ＣＤＫ２；ＣＤＫ３；ＣＤＫ４；ＣＤＫ５；ＣＤＫ６；ＣＤＫ７；ＣＤＫ９；ＣＤＫＮ１Ａ（ｐ２１／ＷＡＦ１／Ｃｉｐ１）；ＣＤＫＮ１Ｂ（ｐ２７／Ｋｉｐ１）；ＣＤＫＮ１Ｃ；ＣＤＫＮ２Ａ（Ｐ１６ＩＮＫ４ａ）；ＣＤＫＮ２Ｂ；ＣＤＫＮ２Ｃ；ＣＤＫＮ３；ＣＥＢＰＢ；ＣＥＲ１；ＣＨＧＡ；ＣＨＧＢ；Ｃｈｉｔｉｎａｓｅ；ＣＨＳＴ１０；ＣＫＬＦＳＦ２；ＣＫＬＦＳＦ３；ＣＫＬＦＳＦ４；ＣＫＬＦＳＦ５；ＣＫＬＦＳＦ６；ＣＫＬＦＳＦ７；ＣＫＬＦＳＦ８；ＣＬＤＮ３；ＣＬＤＮ７（クローディン－７）；ＣＬＮ３；ＣＬＵ（クラスタリン）；ＣＭＫＬＲ１；ＣＭＫＯＲ１（ＲＤＣ１）；ＣＮＲ１；ＣＯＬ　１８Ａ１；ＣＯＬ１Ａ１；ＣＯＬ４Ａ３；ＣＯＬ６Ａ１；ＣＲ２；ＣＲＰ；ＣＳＦＩ（Ｍ－ＣＳＦ）；ＣＳＦ２（ＧＭ－ＣＳＦ）；ＣＳＦ３（ＧＣＳＦ）；ＣＴＬＡ４；ＣＴＮＮＢ１（ｂ－カテニン）；ＣＴＳＢ（カテプシンＢ）；ＣＸ３ＣＬ１（ＳＣＹＤＩ）；ＣＸ３ＣＲ１（Ｖ２８）；ＣＸＣＬ１（ＧＲＯ１）；ＣＸＣＬ１０（ＩＰ－１０）；ＣＸＣＬ１１（Ｉ－ＴＡＣ／ＩＰ－９）；ＣＸＣＬ１２（ＳＤＦ１）；ＣＸＣＬ１３；ＣＸＣＬ１４；ＣＸＣＬ１６；ＣＸＣＬ２（ＧＲＯ２）；ＣＸＣＬ３（ＧＲＯ３）；ＣＸＣＬ５（ＥＮＡ－７８／ＬＩＸ）；ＣＸＣＬ６（ＧＣＰ－２）；ＣＸＣＬ９（ＭＩＧ）；ＣＸＣＲ３（ＧＰＲ９／ＣＫＲ－Ｌ２）；ＣＸＣＲ４；ＣＸＣＲ６（ＴＹＭＳＴＲ／ＳＴＲＬ３３／Ｂｏｎｚｏ）；ＣＹＢ５；ＣＹＣ１；ＣＹＳＬＴＲ１；ＤＡＢ２ＩＰ；ＤＥＳ；ＤＫＦＺｐ４５１Ｊ０１１８；ＤＮＣＬＩ；ＤＰＰ４；Ｅ２Ｆ１；ＥＣＧＦ１；ＥＤＧ１；ＥＦＮＡ１；ＥＦＮＡ３；ＥＦＮＢ２；ＥＧＦ；ＥＧＦＲ；ＥＬＡＣ２；ＥＮＧ；ＥＮＯ１；ＥＮＯ２；ＥＮＯ３；ＥＰＨＢ４；ＥＰＯ；ＥＲＢＢ２（Ｈｅｒ－２）；ＥＲＥＧ；ＥＲＫ８；ＥＳＲ１；ＥＳＲ２；Ｆ３（ＴＦ）；ＦＡＤＤ；ＦａｓＬ；ＦＡＳＮ；ＦＣＥＲ１Ａ；ＦＣＥＲ２；ＦＣＧＲ３Ａ；ＦＧＦ；ＦＧＦ１（αＦＧＦ）；ＦＧＦ１０；ＦＧＦ１１；ＦＧＦ１２；ＦＧＦ１２Ｂ；ＦＧＦ１３；ＦＧＦ１４；ＦＧＦ１６；ＦＧＦ１７；ＦＧＦ１８；ＦＧＦ１９；ＦＧＦ２（ｂＦＧＦ）；ＦＧＦ２０

；ＦＧＦ２１；ＦＧＦ２２；ＦＧＦ２３；ＦＧＦ３（ｉｎｔ－２）；ＦＧＦ４（ＨＳＴ）；ＦＧＦ５；ＦＧＦ６（ＨＳＴ－２）；ＦＧＦ７（ＫＧＦ）；ＦＧＦ８；ＦＧＦ９；ＦＧＦＲ３；ＦＩＧＦ（ＶＥＧＦＤ）；ＦＥＬｌ（ＥＰＳＩＬＯＮ）；ＦＩＬｌ（ＺＥＴＡ）；ＦＬＪ１２５８４；ＦＬＪ２５５３０；ＦＬＲＴＩ（フィブロネクチン）；ＦＬＴ１；ＦＯＳ；ＦＯＳＬ１（ＦＲＡ－１）；ＦＹ（ＤＡＲＣ）；ＧＡＢＲＰ（ＧＡＢＡａ）；ＧＡＧＥＢ１；ＧＡＧＥＣ１；ＧＡＬＮＡＣ４Ｓ－６ＳＴ；ＧＡＴＡ３；ＧＤＦ５；ＧＦＩ１；ＧＧＴ１；ＧＭ－ＣＳＦ；ＧＮＡＳＩ；ＧＮＲＨＩ；ＧＰＲ２（ＣＣＲ１０）；ＧＰＲ３１；ＧＰＲ４４；ＧＰＲ８１（ＦＫＳＧ８０）；ＧＲＣＣＩＯ（Ｃ１０）；ＧＲＰ；ＧＳＮ（ゲルソリン）；ＧＳＴＰ１；ＨＡＶＣＲ２；ＨＤＡＣ４；ＨＤＡＣ５；ＨＤＡＣ７Ａ；ＨＤＡＣ９；ＨＧＦ；ＨＩＦ１Ａ；ＨＯＰ１；ヒスタミンおよびヒスタミン受容体；ＨＬＡ－Ａ；ＨＬＡ－ＤＲＡ；ＨＭ７４；ＨＭＯＸＩ；ＨＵＭＣＹＴ２Ａ；ＩＣＥＢＥＲＧ；ＩＣＯＳＬ；１Ｄ２；ＩＦＮ－ａ；ＩＦＮＡ１；ＩＦＮＡ２；ＩＦＮＡ４；ＩＦＮＡ５；ＩＦＮＡ６；ＩＦＮＡ７；ＩＦＮＢ１；ＩＦＮガンマ；ＤＦＮＷ１；ＩＧＢＰ１；ＩＧＦ１；ＩＧＦ１Ｒ；ＩＧＦ２；ＩＧＦＢＰ２；ＩＧＦＢＰ３；ＩＧＦＢＰ６；ＩＬ－ｌ；ＩＬ１０；ＩＬ１０ＲＡ；ＩＬ１０ＲＢ；ＩＬ１１；ＩＬ１１ＲＡ；ＩＬ－１２；ＩＬ１２Ａ；ＩＬ１２Ｂ；ＩＬ１２ＲＢ１；ＩＬ１２ＲＢ２；ＩＬ１３；ＩＬ１３ＲＡ１；ＩＬ１３ＲＡ２；ＩＬ１４；ＩＬ１５；ＩＬ１５ＲＡ；ＩＬ１６；ＩＬ１７；ＩＬ１７Ｂ；ＩＬ１７Ｃ；ＩＬ１７Ｒ；ＩＬ１８；ＩＬ１８ＢＰ；ＩＬ１８Ｒ１；ＩＬ１８ＲＡＰ；ＩＬ１９；ＩＬ１Ａ；ＩＬ１Ｂ；ＩＬＩＦ１０；ＩＬ１Ｆ５；ＩＬ１Ｆ６；ＩＬ１Ｆ７；ＩＬ１Ｆ８；ＩＬ１Ｆ９；ＩＬ１ＨＹ１；ＩＬ１Ｒ１；ＩＬ１Ｒ２；ＩＬ１ＲＡＰ；ＩＬ１ＲＡＰＬ１；ＩＬ１ＲＡＰＬ２；ＩＬ１ＲＬ１；ＩＬ１ＲＬ２，ＩＬＩＲＮ；ＩＬ２；ＩＬ２０；ＩＬ２０ＲＡ；ＩＬ２１　Ｒ；ＩＬ２２；ＩＬ２２Ｒ；ＩＬ２２ＲＡ２；ＩＬ２３；ＩＬ２４；ＩＬ２５；ＩＬ２６；ＩＬ２７；ＩＬ２８Ａ；ＩＬ２８Ｂ；ＩＬ２９；ＩＬ２ＲＡ；ＩＬ２ＲＢ；ＩＬ２ＲＧ；ＩＬ３；ＩＬ３０；ＩＬ３ＲＡ；ＩＬ４；ＩＬ４Ｒ；ＩＬ５；ＩＬ５ＲＡ；ＩＬ６；ＩＬ６Ｒ；ＩＬ６ＳＴ（糖タンパク質１３０）；ＥＬ７；ＥＬ７Ｒ；ＥＬ８；ＩＬ８ＲＡ；ＤＬ８ＲＢ；ＩＬ８ＲＢ；ＤＬ９；ＤＬ９Ｒ；ＤＬＫ；ＩＮＨＡ；ＩＮＨＢＡ；ＩＮＳＬ３；ＩＮＳＬ４；ＩＲＡＫ１；ＥＲＡＫ２；ＩＴＧＡ１；ＩＴＧＡ２；ＩＴＧＡ３；ＩＴＧＡ６（ａ６インテグリン）；ＩＴＧＡＶ；ＩＴＧＢ３；ＩＴＧＢ４（ｂ４インテグリン）；ＪＡＧ１；ＪＡＫ１；ＪＡＫ３；ＪＵＮ；Ｋ６ＨＦ；ＫＡＩ１；ＫＤＲ；ＫＩＴＬＧ；ＫＬＦ５（ＧＣ　Ｂｏｘ　ＢＰ）；ＫＬＦ６；ＫＬＫＩＯ；ＫＬＫ１２；ＫＬＫ１３；ＫＬＫ１４；ＫＬＫ１５；ＫＬＫ３；ＫＬＫ４；ＫＬＫ５；ＫＬＫ６；ＫＬＫ９；ＫＲＴ１；ＫＲＴ１９（ケラチン１９）；ＫＲＴ２Ａ；ＫＨＴＨＢ６（毛髪特異的Ｈ型ケラチン）；ＬＡＭＡＳ；ＬＥＰ（レプチン）；Ｌｉｎｇｏ－ｐ７５；Ｌｉｎｇｏ－Ｔｒｏｙ；ＬＰＳ；ＬＴＡ（ＴＮＦ－ｂ）；ＬＴＢ；ＬＴＢ４Ｒ（ＧＰＲ１６）；ＬＴＢ４Ｒ２；ＬＴＢＲ；ＭＡＣＭＡＲＣＫＳ；ＭＡＧまたはＯＭｇｐ；ＭＡＰ２Ｋ７（ｃ－Ｊｕｎ）；ＭＤＫ；ＭＩＢ１；ミッドカイン；ＭＥＦ；ＭＩＰ－２；ＭＫＩ６７；（Ｋｉ－６７）；ＭＭＰ２；ＭＭＰ９；ＭＳ４Ａ１；ＭＳＭＢ；ＭＴ３（メタロチオネクチン－１１１）；ＭＴＳＳ１；ＭＵＣ１（ムチン）；ＭＹＣ；ＭＹ０８８；ＮＣＫ２；ニューロカン；ＮＦＫＢ１；ＮＦＫＢ２；ＮＧＦＢ（ＮＧＦ）；ＮＧＦＲ；ＮｇＲ－Ｌｉｎｇｏ；ＮｇＲ－Ｎｏｇｏ６６（Ｎｏｇｏ）；ＮｇＲ－ｐ７５；ＮｇＲ－Ｔｒｏｙ；ＮＭＥ１（ＮＭ２３Ａ）；ＮＯＸ５；ＮＰＰＢ；ＮＲ０Ｂ１；ＮＲ０Ｂ２；ＮＲ１Ｄ１；ＮＲ１Ｄ２；ＮＲ１Ｈ２；ＮＲ１Ｈ３；ＮＲ１Ｈ４；ＮＲ１１２；ＮＲ１１３；ＮＲ２Ｃ１；ＮＲ２Ｃ２；ＮＲ２Ｅ１；ＮＲ２Ｅ３；ＮＲ２Ｆ１；ＮＲ２Ｆ２；ＮＲ２Ｆ６；ＮＲ３Ｃ１；ＮＲ３Ｃ２；ＮＲ４Ａ１；ＮＲ４Ａ２；ＮＲ４Ａ３；ＮＲ５Ａ１；ＮＲ５Ａ２；ＮＲ６Ａ１；ＮＲＰ１；ＮＲＰ２；ＮＴ５Ｅ；ＮＴＮ４；ＯＤＺＩ；ＯＰＲＤ１；Ｐ２ＲＸ７；ＰＡＰ；ＰＡＲＴ１；ＰＡＴＥ；ＰＡＷＲ；ＰＣＡ３；ＰＣＮＡ；ＰＯＧＦＡ；ＰＯＧＦＢ；ＰＥＣＡＭ１；ＰＦ４（ＣＸＣＬ４）；ＰＧＦ；ＰＧＲ；ホスファカン；ＰＩＡＳ２；ＰＩＫ３ＣＧ；ＰＬＡＵ（ｕＰＡ）；ＰＬＧ；ＰＬＸＤＣ１；ＰＰＢＰ（ＣＸＣＬ７）；ＰＰＩＤ；ＰＲＩ；ＰＲＫＣＱ；ＰＲＫＤＩ；ＰＲＬ；ＰＲＯＣ；ＰＲＯＫ２；ＰＳＡＰ；ＰＳＣＡ；ＰＴＡＦＲ；ＰＴＥＮ；ＰＴＧＳ２（ＣＯＸ－２）；ＰＴ

Ｎ；ＲＡＣ２（ｐ２１　Ｒａｃ２）；ＲＡＲＢ；ＲＧＳＩ；ＲＧＳ１３；ＲＧＳ３；ＲＮＦ１１０（ＺＮＦ１４４）；ＲＯＢＯ２；Ｓ１００Ａ２；ＳＣＧＢ１Ｄ２（リポフィリンＢ）；ＳＣＧＢ２Ａ１（マンマグロビン２）；ＳＣＧＢ２Ａ２（マンマグロビン１）；ＳＣＹＥＩ（内皮単球活性化サイトカイン）；ＳＤＦ２；ＳＥＲＰＩＮＡ１；ＳＥＲＰＩＮＡ３；ＳＥＲＰ１ＮＢ５（マスピン）；ＳＥＲＰＩＮＥ１（ＰＡＩ－１）；ＳＥＲＰＤＭＦ１；ＳＨＢＧ；ＳＬＡ２；ＳＬＣ２Ａ２；ＳＬＣ３３Ａ１；ＳＬＣ４３Ａ１；ＳＬＩＴ２；ＳＰＰＩ；ＳＰＲＲ１Ｂ（Ｓｐｒｌ）；ＳＴ６ＧＡＬ１；ＳＴＡＢＩ；ＳＴＡＴ６；ＳＴＥＡＰ；ＳＴＥＡＰ２；ＴＢ４Ｒ２；ＴＢＸ２１；ＴＣＰＩＯ；ＴＯＧＦＩ；ＴＥＫ；ＴＧＦＡ；ＴＧＦＢＩ；ＴＧＦＢ１ＩＩ；ＴＧＦＢ２；ＴＧＦＢ３；ＴＧＦＢＩ；ＴＧＦＢＲＩ；ＴＧＦＢＲ２；ＴＧＦＢＲ３；ＴＨＩＬ；ＴＨＢＳＩ（トロンボスポンジン－１）；ＴＨＢＳ２；ＴＨＢＳ４；ＴＨＰＯ；ＴＩＥ（Ｔｉｅ－１）；ＴＭＰ３；組織因子；ＴＬＲ１；ＴＬＲ２；ＴＬＲ３；ＴＬＲ４；ＴＬＲ５；ＴＬＲ６；ＴＬＲ７；ＴＬＲ８；ＴＬＲ９；ＴＬＲ１０；ＴＮＦ；ＴＮＦ－ａ；ＴＮＦＡＥＰ２（Ｂ９４）；ＴＮＦＡＩＰ３；ＴＮＦＲＳＦＩＩＡ；ＴＮＦＲＳＦ１Ａ；ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ；ＴＮＦＲＳＦ２１；ＴＮＦＲＳＦ５；ＴＮＦＲＳＦ６（Ｆａｓ）；ＴＮＦＲＳＦ７；ＴＮＦＲＳＦ８；ＴＮＦＲＳＦ９；ＴＮＦＳＦ１０（ＴＲＡＩＬ）；ＴＮＦＳＦ１１（ＴＲＡＮＣＥ）；ＴＮＦＳＦ１２（ＡＰ０３Ｌ）；ＴＮＦＳＦ１３（Ａｐｒｉｌ）；ＴＮＦＳＦ１３Ｂ；ＴＮＦＳＦ１４（ＨＶＥＭ－Ｌ）；ＴＮＦＳＦ１５（ＶＥＧＩ）；ＴＮＦＳＦ１８；ＴＮＦＳＦ４（ＯＸ４０リガンド）；ＴＮＦＳＦ５（ＣＤ４０リガンド）；ＴＮＦＳＦ６（ＦａｓＬ）；ＴＮＦＳＦ７（ＣＤ２７リガンド）；ＴＮＦＳＦＳ（ＣＤ３０リガンド）；ＴＮＦＳＦ９（４－１　ＢＢリガンド）；ＴＯＬＬＩＰ；Ｔｏｌｌ様受容体；ＴＯＰ２Ａ（トポイソメラーゼＥａ）；ＴＰ５３；ＴＰＭ１；ＴＰＭ２；ＴＲＡＤＤ；ＴＲＡＦ１；ＴＲＡＦ２；ＴＲＡＦ３；ＴＲＡＦ４；ＴＲＡＦ５；ＴＲＡＦ６；ＴＲＥＭ１；ＴＲＥＭ２；ＴＲＰＣ６；ＴＳＬＰ；ＴＷＥＡＫ；ＶＥＧＦ；ＶＥＧＦＢ；ＶＥＧＦＣ；ベルシカン；ＶＨＬＣ５；ＶＬＡ－４；ＸＣＬ１（リンホタクチン）；ＸＣＬ２（ＳＣＭ－１ｂ）；ＸＣＲＩ（ＧＰＲ５／ＣＣＸＣＲＩ）；ＹＹ１；およびＺＦＰＭ２からなる群から選択される１つ以上の標的に結合することができる。

【０１６４】

本明細書中に提供される方法を使用して産生される抗体（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体）についての好ましい分子標的分子としては、ＣＤタンパク質、例えば、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤＳ、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３４；ＣＤ６４、ＥｒｂＢ受容体ファミリーのＣＤ２００メンバー、例えば、ＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３またはＨＥＲ４受容体；細胞接着分子、例えば、ＬＦＡ－１、Ｍａｃ１、ｐ１５０．９５、ＶＬＡ－４、ＩＣＡＭ－１、ＶＣＡＭ、アルファまたはベータサブユニットを含むアルファ４／ベータ７インテグリン、およびアルファｖ／ベータ３インテグリン（例えば、抗ＣＤ１１ａ、抗ＣＤ１８、または抗ＣＤ１１ｂ抗体）；成長因子、例えば、ＶＥＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦ－Ｃ；組織因子（ＴＦ）；アルファインターフェロン（アルファＩＦＮ）；ＴＮＦ－α、インターロイキン、例えばＩＬ－１β、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－Ｓ、ＩＬ－９、ＩＬ－１３、ＩＬ　１７　ＡＦ、ＩＬ－１Ｓ、ＩＬ－１３Ｒα１、ＩＬ１３Ｒα２、ＩＬ－４Ｒ、ＩＬ－５Ｒ、ＩＬ－９Ｒ、ＩｇＥ；血液型抗原；ｆｌｋ２／ｆｌｔ３受容体；肥満（ＯＢ）受容体；ｍｐｌ受容体；ＣＴＬＡ－４；ＲＡＮＫＬ、ＲＡＮＫ、ＲＳＶ　Ｆタンパク質、プロテインＣなどが挙げられる。

【０１６５】

一実施形態において、本明細書中に提供する方法を用いて産生される抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（ＬＲＰ）－１またはＬＲＰ－８またはトランスフェリン受容体、および、１）ベーターセクレターゼ（ＢＡＣＥ１またはＢＡＣＥ２）、２）アルファーセクレターゼ、３）ガンマーセクレターゼ、４）タウーセクレターゼ、５）アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、６）デスレセプター６（ＤＲ６）、７）アミロイドベータペプチド、８）アルファーシヌクレイン、９）パーキン、１０）ハンチンチン、１１）ｐ７５　ＮＴＲ、および１２）カス

パーゼ－６からなる群から選択される少なくとも１つの標的に結合する。

【０１６６】

一実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して産生された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、以下からなる群から選択される少なくとも２つの標的分子に結合する：ＩＬ－１アルファおよびＩＬ－１ベータ、ＩＬ－１２およびＩＬ－１Ｓ；ＩＬ－１３およびＩＬ－９；ＩＬ－１３およびＩＬ－４；ＩＬ－１３およびＩＬ－５；ＩＬ－５およびＩＬ－４；ＩＬ－１３およびＩＬ－１ベータ；ＩＬ－１３およびＩＬ－２５；ＩＬ－１３およびＴＡＲＣ；ＩＬ－１３およびＭＤＣ；ＩＬ－１３およびＭＥＦ；ＩＬ－１３およびＴＧＦ－～；ＩＬ－１３およびＬＨＲアゴニスト；ＩＬ－１２およびＴＷＥＡＫ；ＩＬ－１３およびＣＬ２５；ＩＬ－１３およびＳＰＲＲ２ａ；ＩＬ－１３およびＳＰＲＲ２ｂ；ＩＬ－１３およびＡＤＡＭＳ；ＩＬ－１３およびＰＥＤ２；ＩＬ１７ＡおよびＩＬ１７Ｆ；ＣＤ３およびＣＤ１９；ＣＤ１３８およびＣＤ２０；ＣＤ１３８およびＣＤ４０；ＣＤ１９およびＣＤ２０；ＣＤ２０およびＣＤ３；ＣＤ３ＳおよびＣＤ１３Ｓ；ＣＤ３ＳおよびＣＤ２０；ＣＤ３ＳおよびＣＤ４０；ＣＤ４０およびＣＤ２０；ＣＤ－ＳおよびＩＬ－６；ＣＤ２０およびＢＲ３；ＴＮＦアルファおよびＴＧＦ－ベータ、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１ベータ；ＴＮＦアルファおよびＩＬ－２、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－３、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－４、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－５、ＴＮＦアルファおよびＩＬ６、ＴＮＦアルファおよびＩＬ８、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－９、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１０、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１１、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１２、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１３、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１４、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１５、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１６、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１７、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１８、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－１９、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－２０、ＴＮＦアルファおよびＩＬ－２３、ＴＮＦアルファおよびＩＦＮアルファ、ＴＮＦアルファおよびＣＤ４、ＴＮＦアルファおよびＶＥＧＦ、ＴＮＦアルファおよびＭＩＦ、ＴＮＦアルファおよびＩＣＡＭ－１、ＴＮＦアルファおよびＰＧＥ４、ＴＮＦアルファおよびＰＥＧ２、ＴＮＦアルファおよびＲＡＮＫリガンド、ＴＮＦアルファおよびＴｅ３８、ＴＮＦアルファおよびＢＡＦＦ、ＴＮＦアルファおよびＣＤ２２、ＴＮＦアルファおよびＣＴＬＡ－４、ＴＮＦアルファおよびＧＰ１３０、ＴＮＦａおよびＩＬ－１２ｐ４０、ＶＥＧＦおよびＨＥＲ２、ＶＥＧＦ－ＡおよびＨＥＲ２、ＶＥＧＦ－ＡおよびＰＤＧＦ、ＨＥＲ１およびＨＥＲ２、ＶＥＧＦＡおよびＡＮＧ２、ＶＥＧＦ－ＡおよびＶＥＧＦ－Ｃ、ＶＥＧＦ－ＣおよびＶＥＧＦ－Ｄ、ＨＥＲ２およびＤＲ５、ＶＥＧＦおよびＩＬ－８、ＶＥＧＦおよびＭＥＴ、ＶＥＧＦＲおよびＭＥＴ受容体、ＥＧＦＲおよびＭＥＴ、ＶＥＧＦＲおよびＥＧＦＲ、ＨＥＲ２およびＣＤ６４、ＨＥＲ２およびＣＤ３、ＨＥＲ２およびＣＤ１６、ＨＥＲ２およびＨＥＲ３、ＥＧＦＲ（ＨＥＲ１）およびＨＥＲ２、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ３、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ４、ＩＬ－１４およびＩＬ－１３、ＩＬ－１３およびＣＤ４０Ｌ、ＩＬ４およびＣＤ４０Ｌ、ＴＮＦＲ１およびＩＬ－１Ｒ、ＴＮＦＲ１およびＩＬ－６ＲならびにＴＮＦＲ１およびＩＬ－１８Ｒ、ＥｐＣＡＭおよびＣＤ３、ＭＡＰＧおよびＣＤ２８、ＥＧＦＲおよびＣＤ６４、ＣＳＰＧｓおよびＲＧＭ　Ａ；ＣＴＬＡ－４およびＢＴＮ０２；ＩＧＦ１およびＩＧＦ２；ＩＧＦ１／２およびＥｒｂ２Ｂ；ＭＡＧおよびＲＧＭ　Ａ；ＮｇＲおよびＲＧＭ　Ａ；ＮｏｇｏＡおよびＲＧＭ　Ａ；ＯＭＧｐおよびＲＧＭ　Ａ；ＰＯＬ－ｌおよびＣＴＬＡ－４；ならびにＲＧＭ　ＡおよびＲＧＭ　Ｂ。

【０１６７】

任意選択的に他の分子にコンジュゲートする可溶性抗原またはその断片は、抗体を生成するための免疫原として使用し得る。受容体などの膜貫通分子の場合、これらの断片（例えば、受容体の細胞外ドメイン）が免疫原として使用し得る。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞が免疫原として使用し得る。このような細胞は、天然源（例えば、がん細胞株）由来であっても、または膜貫通分子を発現するように組換え技術によって形質転換された細胞であってもよい。抗体の作製に有用な他の抗原およびその形態は、当技術分野の当業者には明らかであろう。

活性アッセイ

【０１６８】

本明細書中に提供される方法を使用して産生された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、当技術分野で公知の種々のアッセイによって、その物理的／化学的特性および生物学的機能について特徴付けることができる。そのようなアッセイとしては、Ｎ末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィーおよびパパイン消化が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６９】

特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して産生される抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、その生物学的活性について分析される。いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法を使用して産生された抗体（例えば、二重特異性または多重特異性抗体）は、その抗原結合活性について試験される。当技術分野で公知であり、かつ本明細書中で使用し得る抗原結合アッセイとしては、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫アッセイ、およびプロテインＡ免疫アッセイ等の技法を使用した任意の直接または競合結合アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７０】

前述の記述は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに十分であると見なされる。以下の実施例は、例示のみを目的として提供され、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。実際に、本明細書中において提示および記載される改変に加えて、種々の改変は上記の記述から当業者には明らかとなり、これらは添付の特許請求の範囲に含まれる。

【実施例】

【０１７１】

<u>実施例１：方法および材料</u>

<u>抗体構築物の設計および合成</u>

以下の実施例における全ての抗体は、それぞれ可変ドメインおよび定常ドメインについてＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ.「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ.」 Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ：ＮＩＨ，１９９１）およびＥＵ（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ.「Ｔｈｅ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ａｎ ｅｎｔｉｒｅ ｇａｍｍａＧ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅ.」 Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳ Ａ １９６９；６３：７８－８５）番号付けシステムを使用して番号付けされる。抗体構築物を遺伝子合成（ＧＥＮＥＷＩＺ（登録商標））によって作製し、適用可能な場合はいつでも、前述のように発現プラスミド（ｐＲＫ５）にサブクローニングした（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ.「Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｉｓｏｔｙｐｅｓ ａｎｄ ｓｐｅｃｉｅｓ ｏｆ ｏｒｉｇｉｎ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ.」 ＭＡｂｓ ２０１７；９：２１３－３０）。この研究における全ての抗体ＨＣを非グリコシル化し（Ｎ２９７Ｇ変異）、カルボキシ末端リジンを欠失させて（ΔＫ４４７）、生成物の不均一性を低下させ、それによってＬＣＭＳによるＢｓＩｇＧの正確な定量を容易にした（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ.，下記、Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ.「Ｐｒｅｃｉｓｅ ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｉｘｔｕｒｅｓ ｏｆ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｈｏｓｔ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｌｉｑｕｉｄ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ｍａｓｓ ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ.」 ＭＡｂｓ ２０１６；８：１４６７－７６）。この研究における全てのＢｓＩｇＧの２構成要素ＨＣを、最初に列挙された抗体における「ノブ」変異（例えば、Ｔ３６６Ｗ）または２番目に列挙された抗体における「

ホール」変異（例えば、Ｔ３６６Ｓ：Ｌ３６８Ａ：Ｙ４０７Ｖ）のいずれかを含有するように操作し、ＨＣヘテロ二量体化を促進した（Ａｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．「Ｓｔａｂｌｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｓ ｆｒｏｍ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｍａｉｎ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｏｆ ａ ｈｏｍｏｄｉｍｅｒ ｕｓｉｎｇ ａ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９９７；２７０：２６－３５）。

【０１７２】

この研究における少数のＢｓＩｇＧについて、ＬＣＭＳ分析によるより正確な定量のために、正しく対合したＢｓＩｇＧ種と、誤対合したＢｓＩｇＧ種との間に十分な質量差を提供するために、ＦＲ変異を賢明に作製した。二重特異性ＩｇＧ収率の正確な定量に必要な質量差は≦１１８ Ｄａである（Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ．，下記）。具体的には、抗体および変異は、抗ＣＤ３またはバリアント（表Ａ）、抗ＩＬ－１βまたは抗ＧＦＲα（表Ｂ）と組み合わせる場合、抗ＨＥＲ２ V_L Ｒ６６Ｇ；抗ＡＮＧ２またはバリアントと組み合わせる場合（表Ｆ）、抗ＶＥＧＦＡ V_L Ｆ８３Ａ、抗Ｄ因子２５Ｄ７ ｖ１または抗ＩＬ－３３または抗ＨＥＲ２と組み合わせる場合（表Ｇ２）、抗ＣＤ３ V_L Ｎ３４Ａ：Ｆ８３Ａ、抗ＣＤ３と組み合わせる場合、抗ＲＳＰＯ３ V_L Ｆ８３Ａ、抗ＳＩＲＰαまたは抗Ｄ因子２０Ｄ１２ ｖ１と組み合わせる場合、抗ＥＧＦＲ V_L Ｆ８３Ａ、加えて、抗ＧＦＲα１と組み合わせる場合、抗ＩＬ－４ V_L Ｎ３１Ａ：Ｆ８３Ａ（表Ｂまたは図１Ａ－図１Ｆ）である。選択された残基は、親抗体との比較に基づいて、ＢｓＩｇＧ収率に検出可能な影響を及ぼさなかった。

抗体の発現および精製

【０１７３】

全てのＢｓＩｇＧは、以前に記載されたように（（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，上記）、ＨＥＫ２９３由来ＥＸＰＩ２９３ Ｆ（商標）細胞において一過性に発現させた。２つのＬＣおよび２つのＨＣに対応する４つのプラスミドをＥＸＰＩ２９３Ｆ（商標）細胞（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にコトランスフェクションした。ＬＣ ＤＮＡを各実験について変化させ、最適なＨＣ：ＬＣ比での最も高い二重特異性収率を以前に記載されたように報告した（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，上記）。２つのＨＣの比は１：１に固定した。トランスフェクションした細胞培養物（３０ｍＬ）を振盪しながら３７℃で７日間増殖させた。フィルタにかけた細胞培養上清からのＢｓＩｇＧを、プロテインＡ親和性クロマトグラフィー（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）ＡＦ－ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ、Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）によってハイスループット様式で精製した。ＺＥＮＩＸ（登録商標）－Ｃ ＳＥＣ－３００カラム（１０ｍｍ×３００ｍｍ、粒径３μｍ、Ｓｅｐａｘ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用したサイズ排除クロマトグラフィーによって、凝集体および半IgG_1等の不純物を除去した。IgG_1濃度は、１．５の吸光係数$A^{0.1\%}_{280nm}$を用いて計算した。精製収率は、プロテインＡクロマトグラフィー後に、タンパク質濃度に溶出体積を乗算することによって推定した。

ＳＥＣ ＨＰＬＣによるＢｓＩｇＧの分析的特徴付け

【０１７４】

ＢｓＩｇＧ試料（２０μＬ）を、ＨＰＬＣカラム（ＤＩＯＮＥＸ（商標）ＵｌｔｉＭａｔｅ ３０００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に接続したＴＳＫＧＥＬ（登録商標）ＳｕｐｅｒＳＷ３０００カラム（４．６×１５０ ｍｍ、４μｍ）（Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）上のサイズ排除クロマトグラフィーによって定組成条件下でクロマトグラフィーにかけた。移動相はｐＨ７．２の２００ｍＭリン酸カリウムおよび２５０ｍＭ塩化カリウムであり、流速は０．３ ｍＬ／分であり、波長２８０ｎｍで吸光度測定を行った。

高分解能ＬＣＭＳによるＢｓＩｇＧ収率の決定

【０１７５】

ＢｓＩｇＧ収率（３つ全ての誤対合したIgG_1種を上回って正しく対合されたＬＣ種の強度）の定量化を、以前に記載されたように質量分析（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ

ＥＸＡＣＴＩＶＥ（商標）Ｐｌｕｓ Ｅｘｔｅｎｄｅｄ Ｍａｓｓ Ｒａｎｇｅ ＯＲＢＩＴＲＡＰ（商標））を介して行い、異なる質量ピーク間に応答バイアスはないと仮定した（Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ．、下記を参照）。

【０１７６】

変性質量分析のために、Ｄｉｏｎｅｘ ＵＬＴＩＭＡＴＥ（商標）３０００高速分離液体クロマトグラフィー（ＲＳＬＣ）システムを使用して８０℃に加熱した逆相液体クロマトグラフィーカラム（ＭＡＢＰＡＣ（商標）、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、２．１ｍｍ×５０ｍｍ）に試料（３μｇ）を注入した。二成分勾配ポンプを使用して、溶媒Ａ（０．１％ギ酸および０．０２％トリフルオロ酢酸を含有する９９．８８％水）および溶媒Ｂ（９．８８％水および０．１％ギ酸および０．０２％トリフルオロ酢酸を含有する９０％アセトニトリル）を、３００μＬ／分で４．５分間にわたって２０％～６５％溶媒Ｂの勾配として送達した。溶媒を０．１分かけて９０％溶媒Ｂに段階的に変更し、９０％で６．４分間保持してカラムを洗浄した。最後に、溶媒を０．１分間かけて２０％溶媒Ｂに段階的に変更し、再平衡化のために３．９分間保持した。試料は、データ取得のために以下のパラメータを使用して、質量分析計へのエレクトロスプレーイオン化を介してオンラインで分析した、３．９０ｋＶスプレー電圧、３２５℃キャピラリー温度、２００Ｓ－レンズＲＦレベル、ＥＳＩ源における１５シースガス流量および４ＡＵＸガス流量、１，５００－６，０００ｍ／ｚの走査範囲、脱溶媒、ソース内ＣＩＤ １００ｅＶ、ＣＥ ０、ｍ／ｚ ２００で１７，５００の分解能、正極性、１０マイクロスキャン、３Ｅ６ ＡＧＣ標的、固定ＡＧＣモード、０平均化、２５Ｖ電源ＤＣオフセット、８Ｖ噴射フラットポールＤＣ、７Ｖフラタポール間レンズ、６Ｖ屈曲フラットポールＤＣ、０Ｖトランスファ多極ＤＣチューンオフセット、０Ｖ Ｃトラップ入射レンズ調整オフセット、トラップガス圧力設定、２。

【０１７７】

ネイティブ質量分析のために、Ｄｉｏｎｅｘ ＵＬＴＩＭＡＴＥ（商標）３０００ ＲＳＬＣシステムを使用して３０°Ｃに加熱したＡｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ（商標）ＢＥＨサイズ排除クロマトグラフィーカラム（Ｗａｔｅｒｓ、４．６ｍｍ×１５０ｍｍ）に試料（１０μｇ）を注入した。定組成クロマトグラフィーの実行（１０分）は、３００μＬ／分の流速でｐＨ７．０の５０ｍＭ酢酸アンモニウムを含有する水性移動相を利用した。

【０１７８】

データ取得のために以下のパラメータを使用して、質量分析計へのエレクトロスプレーイオン化を介して試料をオンラインで分析した、４．０ｋＶスプレー電圧、３２０°Ｃキャピラリー温度、２００Ｓレンズ ＲＦレベル、ＥＳＩ源における４シースガス流速度および０ＡＵＸガス流速、３００～２０，０００ｍ／ｚの走査範囲、脱溶媒、ソース内ＣＩＤ １００ｅＶ、ＣＥ ０、ｍ／ｚ ２００における分解能１７，５００、正極性、１０マイクロスキャン、１Ｅ６ ＡＧＣターゲット、固定ＡＧＣモード、０平均化、２５Ｖ電源ＤＣオフセット、８Ｖ噴射フラットポールＤＣ、７Ｖフラタポール間レンズ、６Ｖ屈曲フラットポールＤＣ、０Ｖトランスファ多極ＤＣチューンオフセット、０Ｖ Ｃトラップ入射レンズ調整オフセット、およびトラップガス圧力設定２。

【０１７９】

取得した質量スペクトルデータを、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｅｔｒｉｃｓ Ｉｎｔａｃｔ Ｍａｓｓ（商標）ソフトウェアおよびＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ＢＩＯＰＨＡＲＭＡ ＦＩＮＤＥＲ（商標）３．０ソフトウェアを用いて分析した。各試料のデコンボリューションされたスペクトルからの正確に対合したＬＣ種のシグナル強度を、３つの誤対合したＩｇＧ$_1$種に対する定量に使用した。ＨＣホモ二量体および半ＩｇＧは、検出不能であるか、または微量で存在し、計算から除外した。正確にＬＣ対合したＢｓＩｇＧは、以前に記載された代数式（Ｙｉｎ ｅｔ ａｌ、下記を参照）を使用することによって、ＢｓＩｇＧと二重ＬＣ誤対合ＩｇＧ$_1$との等圧混合物から推定された。

ＢｓＩｇＧのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル分析

【０１８０】

プロテインＡおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製されたＢｓＩｇＧをＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。還元条件および非還元条件の両方でそれぞれ電気泳動移動度を分析するために、ＤＴＴの存在下および非存在下で試料を調製した。試料色素と混合した試料をＤＴＴと共に５分間、またはＤＴＴなしで１分間９５℃で加熱し、４～２０％トリス－グリシンゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で１２０Ｖで電気泳動した。次いで、ゲルをＧＥＬＣＯＤＥ（商標）青色タンパク質染色剤（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で染色し、水中で脱染した。等量のタンパク質（６μｇ）を各試料についてロードした。

速度論的結合実験：

【０１８１】

速度論的結合実験を、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｔ　２００装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）における表面プラズモン共鳴を使用して行った。抗Ｆａｂ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）をＣＭ５センサーチップ上に固定化した　［約１２０００共鳴単位（ＲＵ）］。固定化表面上に親Ｆａｂおよび変異Ｆａｂを捕捉し、分析物の結合を評価した。ＨＥＲ２－ＥＣＤ（インハウス）およびＶＥＧＦ－Ｃ（Ｃｙｓ１５６Ｓｅｒ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号７５２－ＶＣ）についての０、０．２９３、１．１７、４．６８７５、１８．７５、７５、３００ｎＭ、０、０．０１９５、０．０７８１、０．３１２５、１．２５、５、２０ｍＭのＶＥＧＦ１６５（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号２９３－ＶＥ）およびＩＬ－１３（社内）、０、０．０７３２、０．２９３、１．１７、４．６８７５、１８．７５、７５ｎＭのＥＴ－Ｒ　Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号８６１４－ＭＴ）、ＩＬ－１β（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号２０１－ＬＢ／ＣＦ）、ＥＧＦＲ　Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号３４４－ＥＲ）、０、０．９７６、３．９０６、１５．６２５、６２．５、２５０ｎＭのビオチン化ＣＤ３（インハウス）の分析物の濃度のセンサーグラムを、注入時間３分、流速５０μｌ／分を用いて、温度２５℃で作製した。分析物の注入後、解離を９００秒間モニタリングした。使用したランニング緩衝液は、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００３％　ＥＤＴＡ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ（ＨＢＳ－ＥＰ＋、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）であった。各注入後に、１０ｍＭグリシン、ｐＨ２．１を用いてチップ表面を再生した。二重ブランク参照（ゼロ分析物濃度のサブステーションおよびブランク参照セル）を使用して、センサーグラムを補正した。次いで、製造業者によって提供されるソフトウェアによって１：１ラングミュアモデルを使用して、センサーグラムを分析した。

実施例２：単一細胞における二重特異性ＩｇＧのアセンブリを容易にするための重鎖／軽鎖対合優先性の解明

導入

【０１８２】

本明細書に記載の研究において、ハイスループット生産および高分解能ＬＣＭＳ分析Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．「Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＩｇＧ　ｏｆ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　ｉｓｏｔｙｐｅｓ　ａｎｄ　ｓｐｅｃｉｅｓ　ｏｆ　ｏｒｉｇｉｎ　ｉｎ　ｓｉｎｇｌｅ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ．」ＭＡｂｓ　２０１７；９：２１３－３０、Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｅｃｉｓｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｉｘｔｕｒｅｓ　ｏｆ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＩｇＧ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｓｉｎｇｌｅ　ｈｏｓｔ　ｃｅｌｌｓ　ｂｙ　ｌｉｑｕｉｄ　ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ」　ＭＡｂｓ　２０１６；８：１４６７－７６）を利用して、ＢｓＩｇＧの収率についてノブ・イン・ホールＨＣを有するがＦａｂ変異を有しない９９個の異なる抗体対を調査した。抗体対の１／３が高い（＞６５％）ＢｓＩｇＧ収率を示し、これは強い固有の同族ＨＣ／ＬＣ鎖対合優先性と一致した。そのような抗体対について、２つのC_H1／C_Lドメイン界面（（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．「Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＩｇＧ　ｏｆ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　ｉｓｏｔｙｐｅｓ　ａｎｄ　ｓｐｅｃｉｅｓ　ｏｆ　ｏｒｉｇ

ｉｎ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ」” ＭＡｂｓ ２０１７；９：２１３－３０）における以前に同定された電荷変異の組み込みを使用して、ＢｓＩｇＧの産生を増強した。次に、本発明者らは、一方または両方のアームにおける同族鎖対合優先性がＢｓＩｇＧの高収率のために必要であるかどうかを調べた。変異分析を使用して、高ＢｓＩｇＧ収率に寄与するＣＤＲ Ｈ３およびＬ３中の特定の残基を同定した。次いで、ＣＤＲ Ｈ３およびＬ３ならびに同定された特定の残基を、ランダムなＨＣ／ＬＣ鎖対合を示す他の利用可能な無関係の抗体に挿入して、ＢｓＩｇＧ収率に対するそれらの効果を決定した。最後に、変異分析を使用して、ＢｓＩｇＧの収率に対する鎖間ジスルフィド結合の効果を調べた。

ＢｓＩｇＧの収率に対する構成抗体対の影響

【０１８３】

以前に、ノブ・イン・ホール重鎖（ＨＣ）変異を有するがＦａｂアーム変異を有しない高収率のＢｓＩｇＧ（＞６５％）が、２つの二重特異性、すなわち抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴおよび抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４について観察された（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．、下記）。同族重鎖／軽鎖（ＨＣ／ＬＣ）対合優先性の発生の強度および頻度を調査するために、抗体対の大きなパネル（ｎ＝９９）を使用してＢｓＩｇＧを生成した。簡略化のために、この研究における全ての二重特異性をヒトＩｇＧ$_1$ ＨＣ定常ドメインを用いて構築した。ＩＬ－１３、ＩＬ－４、ＭＥＴ、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２またはＣＤ３のいずれかに結合する６つの抗体（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．、下記）を使用して、１５個全ての可能なＢｓＩｇＧ$_1$のマトリックスを構築した。次に、これらの６つの抗体を、主に３つのλＬＣアイソタイプ（抗ＤＲ５、抗α$_5$β$_1$、抗ＲＳＰＯ２）を有するκＬＣアイソタイプである１４個のさらなる抗体で置換した（下記表Ａを参照）。表Ａにおいて、独自のアライメントツールを使用して、ＬＣおよびＨＣ配列をヒト抗体生殖系列遺伝子レパートリーと比較することによって、生殖系列遺伝子ファミリーを同定した。生殖系列遺伝子セグメントと最も近い一致が報告された。この研究で使用した抗体は全て、３つの完全ヒト抗体（抗ＣＤ３３、抗ＰＤＧＦ－Ｃ、抗Ｆｌｕ Ｂ）を除いてヒト化抗体であった。

表Ａ：ＬＣ／ＨＣ対合優先性について評価された異なる抗体の生殖系列遺伝子ファミリーおよびＬＣアイソタイプ分析。

抗体／クローン	抗原結合特異性	ＬＣアイソタイプ	生殖系列遺伝子ファミリー		参照
			V_L	V_H	
レブリキズマブ	ＩＬ－１３	κ	ＫＶ４	ＨＶ２	Ｕｌｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．
１９Ｃ１１	ＩＬ－４	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．
オナルツズマブ／５Ｄ５	ＭＥＴ	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．
Ｄ１．５	ＥＧＦＲ	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｓｃｈａｅｆｅｒ ｅｔ ａｌ．
トラスツズマブ／ｈｕｍＡｂ４Ｄ５－８	ＨＥＲ２	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．
ｈｕｍＡｂＵＣＨＴ１ｖ９	ＣＤ３	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓ ｅｔ ａｌ．
２５Ｄ７ ｖ１	Ｄ因子	κ	ＫＶ４	ＨＶ２	ｎａ
５Ｄ６	ＲＳＰＯ３	κ	ＫＶ１	ＨＶ４	ｎａ
１０Ｃ１２	ＩＬ－３３	κ	ＫＶ３	ＨＶ３	ｎａ
１９Ｄ１ ｖ４．１	ＳＩＲＰα	κ	ＫＶ１	ＨＶ１	ｎａ
２０Ｄ１２ ｖ１	Ｄ因子	κ	ＫＶ１	ＨＶ１	ｎａ
８Ｅ１１ ｖ２	ＬＧＲ５	κ	ＫＶ４	ＨＶ１	ｎａ
２Ｈ１２ ｖ６．１１	ＩＬ－１β	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	ｎａ
７Ｃ９ ｖ８	ＧＦＲα１	κ	ＫＶ１	ＨＶ３	Ｂｈａｋｔａ ｅｔ ａｌ．
アポマブ	ＤＲ５	λ	ＬＶ３	ＨＶ３	Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．
１Ａ１	ＲＳＰＯ２	λ	ＬＶ２	ＨＶ３	ｎａ
ｎａ	$\alpha_5\beta_1$	λ	ＬＶ３	ＨＶ３	ｎａ
４６Ｂ８	ＦｌｕＢ	κ	ＫＶ２	ＨＶ５	ｎａ
１Ｅ５ ｖ３．１	ＰＤＧＦ－Ｃ	κ	ＫＶ４	ＨＶ１	ｎａ
ＧＭ１５．３３	ＣＤ３３	κ	ＫＶ２	ＨＶ１	ｎａ

ＫＶ＝κ変数、ＬＶ＝λ可変、ＨＶ＝重可変、ｎａ＝該当なし。

１．Ｍｅｒｃｈａｎｔ Ｍ，Ｍａ Ｘ，Ｍａｕｎ ＨＲ，Ｚｈｅｎｇ Ｚ，Ｐｅｎｇ Ｊ，Ｒｏｍｅｒｏ Ｍ，Ｈｕａｎｇ Ａ，Ｙａｎｇ ＮＹ，Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ Ｍ，Ｇｒｅｖｅ Ｊ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ ｏｆ ｏｎａｒｔｕｚｕｍａｂ，ａ ＭＥＴ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ｗｉｔｈ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｓ ａ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｇｅｎｔ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ２０１３；１１０：Ｅ２９８７－９６．

２．Ｓｃｈａｅｆｅｒ Ｇ，Ｈａｂｅｒ Ｌ，Ｃｒｏｃｋｅｒ ＬＭ，Ｓｈｉａ Ｓ，Ｓｈａｏ Ｌ，Ｄｏｗｂｅｎｋｏ Ｄ，Ｔｏｔｐａｌ Ｋ，Ｗｏｎｇ Ａ，Ｌｅｅ ＣＶ，Ｓｔａｗｉｃｋｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ａ ｔｗｏ－ｉｎ－ｏｎｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ＨＥＲ３ ａｎｄ ＥＧＦＲ ｈａｓ ｓｕｐｅｒｉｏｒ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｃｏｍｐａｒｅｄ ｗｉｔｈ ｍｏｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ２０１１；２０：４７２－８６．

５．Ｕｌｔｓｃｈ Ｍ，Ｂｅｖｅｒｓ Ｊ，Ｎａｋａｍｕｒａ Ｇ，Ｖａｎｄｌｅｎ Ｒ，Ｋｅｌｌｅｙ ＲＦ，Ｗｕ ＬＣ，Ｅｉｇｅｎｂｒｏｔ Ｃ．Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｂａｓｉｓ ｏｆ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｂｌｏｃｋａｄｅ ｂｙ ａｎｔｉ－ＩＬ－１３ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｌｅｂｒｉｋｉｚｕｍａｂ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０１３；４２５：１３３０－９．

６．Ｓｐｉｅｓｓ Ｃ，Ｂｅｖｅｒｓ Ｊ，３ｒｄ，Ｊａｃｋｍａｎ Ｊ，Ｃｈｉａｎ

g N, Nakamura G, Dillon M, Liu H, Molina P, Elliott JM, Shatz W, et al. Development of a human IgG4 bispecific antibody for dual targeting of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) cytokines. J Biol Chem 2013;288:26583-93.
8. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:4285-9.
9. Rodrigues ML, Shalaby MR, Werther W, Presta L, Carter P. Engineering a humanized bispecific F(ab')2 fragment for improved binding to T cells. Int J Cancer Suppl 1992;7:45-50.
10. Bhakta S, Crocker LM, Chen Y, Hazen M, Schutten MM, Li D, Kuijl C, Ohri R, Zhong F, Poon KA, et al. An anti-GDNF family receptor alpha 1 (GFRA1) antibody-drug conjugate for the treatment of hormone receptor-positive breast cancer. Mol Cancer Ther 2018;17:638-49.
11. Adams C, Totpal K, Lawrence D, Marsters S, Pitti R, Yee S, Ross S, Deforge L, Koeppen H, Sagolla M, et al. Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. Cell Death Differ 2008;15:751-61.

【0184】

次に、以下の表Bに示す抗体対を、HEK293由来EXPI 293F（商標）細胞において最適化された鎖比で共発現させ、BsIgGの収率を、以前に記載された方法の改良版（Dillon et al.、Yin et al.、下記を参照）を用いて決定した。Dillon et al.（下記）に記載されているFab変異を含む抗体対はなかった。全ての二重特異性抗体対は、重鎖ヘテロ二量体化のためのノブ・イン・ホール変異を含んでいた。

【0185】

抗体対の共発現およびプロテインAクロマトグラフィー後、精製したIgG_1プールをサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によってさらに精製して、高分解能LCMSによる定量の前に、存在する任意の少量の凝集体および半IgG_1を除去した。LCスクランブルされたIgG_1も含有した等圧基（すなわち、同じ分子量）混合物中の正しく集合したBsIgGの収率を、以前に開発された代数式（Yin et al.、下記を参照）を使用して推定した。表Bに示すデータは、最適化されたLC DNA比からのBsIgGの収率である。BsIgGの収率＞65％を太字で示す。mAb-1のHCは「ホール」変異（T366S：S368A：Y407V）を含み、mAb-2のHCは「ノブ」変異（T366W）を含んでいた（Atwell et al.「Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage displ

ａｙ　ｌｉｂｒａｒｙ．」　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１９９７；２７０：２６－３５）。

表ＢＢｓＩｇＧ収率を調べるために使用される半抗体対

	mAb－1					
mAb－2	ＩＬ－１３	MET	EGFR	CD３	ＩＬ－４	HER２
ＩＬ－１３	NA	８７．６	８７．０	７５．２	７０．３	６６．６
MET	８６．６	NA	７２．３	６０．７	５３．１	５９．９
EGFR	８６．３	７２．４	NA	２３．９	４５．４	２２．０
CD３	７５．５	５４．８	３２．５	NA	２５．０	２２．７
ＩＬ－４	６８．７	５８．０	４４．１	２６．９	NA	２２．６
HER２	６４．６	６５．４	２１．６	２４．１	２５．０	NA
ＤＲ５	９０．４	９５．１	５３．３	５３．４	５３．８	３４．７
ＦｌｕＢ	８７．７	６９．５	５２．３	３２．０	６０．８	７２．７
ＲＳＰＯ３	８４．７	５８．６	８２．１	４０．６	２６．０	２２．０
D因子２５Ｄ７　ｖ１	８３．６	７３．１	６９．３	８３．１	３５．５	６８．７
ＲＳＰＯ２	８３．５	５１．１	７８．５	３８．７	２２．３	７１．３
ＩＬ－１３	７４．２	６３．５	８０．４	７７．８	６３．７	６５．９
ＧＦＲα１	７３．９	４０．６	７７．５	７９．６	３３．５	６８．０
ＰＤＧＦ－Ｃ	６１．２	７１．０	５４．６	５６．０	３４．２	２４．３
ＣＤ３３	４９．８	５８．８	４９．６	３６．４	５６．５	５１．５
$\alpha_5\beta_1$	４５．９	６２．２	３１．０	４１．４	４８．４	７２．６
ＩＬ－３３	４５．６	２１．４	３０．９	２０．４	４２．４	４６．６
ＳＩＲＰα	４１．７	３１．０	２２．６	６０．６	４７．９	３１．８
D因子２０Ｄ１２　ｖ１	２３．５	２９．８	５８．０	３６．０	２２．６	６９．６
ＬＧＲ５	２１．７	５６．２	５３．８	２３．６	２２．８	２２．１

ＮＡ＝該当せず；単一特異性抗体。

【０１８６】

９９個の特有の抗体対についてのＢｓＩｇＧ$_1$の収率は、非常に広い範囲にわたって変動した：２２～９５％（表Ｂ参照）。驚くべきことに、非ランダムＨＣ／ＬＣ対合（ＢｓＩｇＧ$_1$の３０％超の収率）が抗体対の大部分（８０％超）で観察され、ＢｓＩｇＧ$_1$の高（６５％超）および中間（３０～６５％）収率がそれぞれ３３および４８の抗体対で見られた。ＢｓＩｇＧ$_1$のほぼ定量的な（９０％超）形成を、２つの抗体対（抗ＭＥＴ／ＤＲ５および抗ＩＬ－１３／ＤＲ５）について測定した。

【０１８７】

図１Ａ－１Ｆは、低収率（３０％未満、例えば、抗ＬＧＲ５／ＩＬ－４、図１Ａおよび１Ｂ）中間体収率（３０％－６５％、例えば、抗ＳＩＲＰα／ＩＬ－４、図１Ｃおよび１Ｄを参照）および高収率（６５％超、例えば、抗ＭＥＴ／ＤＲ５、図１Ｅおよび１Ｆを参照）についてのＢｓＩｇＧ$_1$の代表的な例についての高分解能ＬＣＭＳデータを示す。対応する抗体対をＨＥＫ２９３由来ＥＸＰＩ２９３Ｆ（商標）細胞に一過性にコトランスフェクションした。Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記およびＹｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記に記載されているように、高分解能ＬＣＭＳによるＢｓＩｇＧ$_1$収率の定量化の前に、ＩｇＧ$_1$種をプロテインＡクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。図１Ａ、図１Ｃ、および図１Ｅに示すデータは、電荷状態３８＋および３９＋の質量エンベロープであり、図１Ｂ、図１Ｄおよび図１Ｆは、対応するデコンボリューションされたデータを示し、存在する異なるＩｇＧ$_1$種を表すカートゥーンを提供する。

【０１８８】

試験した各抗体のＢｓＩｇＧ$_1$収率は、そのパートナー抗体に応じて広範囲にわたって

変動した。例えば、抗ＭＥＴ抗体についてのＢｓＩｇＧ$_1$収率は、抗ＩＬ－３３と対にした場合の約２１％程度のわずかなものから、抗ＤＲ５と対にした場合の約９５％程度の高さまで変動した（表Ｂ）。同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性に対する「ノブ」および「ホール」変異の影響を調査するために、ｍＡｂ１中に「ノブ」変異およびｍＡｂ２中に「ホール」変異またはその逆を含むＨＣを用いてＢｓＩｇＧ$_1$を産生した（表Ｂ）。ＢｓＩｇＧ$_1$の収率は、試験した全ての場合（ｎ＝１５）において、どのＨＣが「ノブ」および「ホール」変異を含むかの影響を最小限にしか受けなかった（表Ｂ）。プロテインＡクロマトグラフィーによる３０ｍＬ培養物からのＩｇＧ種の回収は、約５倍（１．５－８．０ｍｇ）にわたって変動した。

【０１８９】

上記の結果は、Ｆａｂ変異を有しないＢｓＩｇＧ$_1$の高収率が、構成抗体対に依存する一般的な現象であることを示した。

同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性を有する抗体対に対するＢｓＩｇＧ１の収率に対するＣ$_H$１／Ｃ$_L$界面電荷変異の効果

【０１９０】

以前、ノブ・イントゥ・ホールＨＣ変異と併せた全部で４つのドメイン／ドメイン界面（すなわち、両方のＶ$_H$／Ｖ$_L$と両方のＣ$_H$１／Ｃ$_L$）における変異の組合せを、単一の哺乳動物宿主細胞における異なるアイソタイプのＢｓＩｇＧのほぼ定量的な集合のために使用した（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）。ここでは、Ｆａｂ変異のないＢｓＩｇＧ$_1$の高収率を与える抗体対を同定した（表Ｂ）。これらの抗体対はそれらの可変ドメイン配列が異なるが、定常ドメイン、すなわちＩｇＧ$_1$　Ｃ$_H$１および　ｋ　Ｃ$_L$はほとんどの場合同一であった。そのような抗体対について、２つのＣ$_H$１／Ｃ$_L$界面における変異のみで、正しく集合した二重特異性の収率を約１００％まで高めるのに十分であり得ると仮定された。１１の異なる抗体対を選択し、ＢｓＩｇＧ$_1$の収率を、以前に報告されたＣ$_H$１／Ｃ$_L$ドメイン界面電荷変異（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）の存在下または非存在下で比較した。具体的には、「ノブ」アームをＣ$_L$　Ｖ１３３Ｅおよびｃ$_H$１　Ｓ１８３Ｋ変異で操作し、「ホール」アームをＣ$_L$　Ｖ１３３ＫおよびＣ$_H$１　Ｓ１８３Ｅ変異で操作した（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）。２つのＣ$_H$１／Ｃ$_L$界面における電荷変異は、大部分の場合（９／１１）において、全抗体対のＢｓＩｇＧ$_1$収率を約１２－３４％から９０％以上にＢｓＩｇＧ$_1$収率を上昇させた（図２）。図２の電荷対バリアントの場合、対の最初に列挙された抗体は　Ｃ$_L$　Ｖ１３３Ｅおよびｃ$_H$１　Ｓ１８３Ｋ変異を含み、２番目に列挙された抗体は　Ｃ$_L$　Ｖ１３３Ｋおよび　Ｃ$_H$１　Ｓ１８３Ｅ変異を含む（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）。ＢｓＩｇＧ$_1$の収率９０％を図２の点線の横線で示す。Ｃ$_L$　Ｖ１３３ＥおよびＣ$_H$１　Ｓ１８３Ｋ変異は、それらの標的抗原に対する抗体の親和性に影響を及ぼさなかった（データは示さない）。

ＢｓＩｇＧの収率に対するＢｓＩｇＧの１つのアームにおける同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性の効果

【０１９１】

いくつかの抗体対について観察されたＢｓＩｇＧ$_1$の高収率の機構的塩基を調べた。２つの抗体対、すなわち、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴおよび抗ＩＬ－４／ＩＬ－１３を、Ｆａｂ変異を有しないＢｓＩｇＧ$_1$のその高い収率に基づいてこの研究のために選択した（表ＢおよびＤｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）。先験的に、一方または両方のＦａｂは、ＢｓＩｇＧ$_1$の高収率に寄与する同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性を示し得る。これらの可能性を区別するために、３鎖共発現実験を行った。「ノブ」または「ホール」変異を有する単一のＨＣ（ＨＣ１）を、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞においてその同族ＬＣ（ＬＣ１）および競合する非同族ＬＣ（ＬＣ２）と一過性に共発現させた（図３）。図３のアスタリスクは、ＨＣにおける「ノブ」または「ホール」変異の存在を示す。（抗ＥＧＦＲ、抗ＩＬ１３および抗ＨＥＲ２のＨＣは「ノブ」変異（Ｔ３６６Ｗ）を含有し、抗ＭＥＴ、抗ＩＬ４および抗ＣＤ３のＨＣは「ホール」変異（Ｔ３６６Ｓ：Ｓ３６８Ａ：Ｙ４０７Ｖ）

を含有する（Ａｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．“Ｓｔａｂｌｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｓ ｆｒｏｍ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｍａｉｎ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｏｆ ａ ｈｏｍｏｄｉｍｅｒ ｕｓｉｎｇ ａ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９９７；２７０：２６－３５）を参照）。得られた半ＩｇＧ種を、プロテインＡ親和性クロマトグラフィーによって対応する細胞培養上清から精製し、同族および非同族ＨＣ／ＬＣの対合の程度を高分解能ＬＣＭＳ（Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．およびＹｉｎ ｅｔ ａｌ．、下記）によって評価した。同族ＨＣ／ＬＣ対合のパーセント比率を、半ＩｇＧ$_1$種を定量することによって計算した。

【０１９２】

以下の表Ｃに示すように、抗ＭＥＴ ＨＣは、非同族抗ＥＧＦＲ ＬＣよりもその同族ＬＣについて強い優先性を示す（約７１％）のに対して、抗ＥＧＦＲ ＨＣは、非同族抗ＭＥＴ ＬＣよりもその同族ＬＣについてわずかな優先性を示す（約５６％）のみである。抗ＩＬ－１３ ＨＣは、非同族抗ＩＬ－４ ＬＣよりもその同族ＬＣについて強い優先性を示す（８１％）のに対して、抗ＩＬ－４ ＨＣはその同族ＬＣに対する優先性を示さない（４９％）。これらのデータは、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴについての高いＢｓＩｇＧ$_1$収率が、それぞれ抗ＭＥＴおよび抗ＥＧＦＲ抗体に対する強いおよび弱い同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性に起因するという考えと一致している。対照的に、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４についての高いＢｓＩｇＧ$_1$収率は、明らかに、抗ＩＬ－１３抗体単独に対する強い同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性を反映している。したがって、一方または両方のアームにおける同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性は、Ｆａｂ変異を必要とすることなく、単一細胞におけるＢｓＩｇＧ$_1$の高収率にとって明らかに十分であり得る。

表Ｃ：共発現後の抗体同族鎖優先性の定量化。

ＨＣ１	ＬＣ１	ＬＣ２	ＨＣ／ＬＣ対合（%）	
			同族	非同族
ＭＥＴ	ＭＥＴ	ＥＧＦＲ	７０．６	２９．４
ＥＧＦＲ	ＭＥＴ	ＥＧＦＲ	５６．４	４３．６
ＩＬ－１３	ＩＬ－１３	ＩＬ－４	８１．０	１９．０
ＩＬ－４	ＩＬ－１３	ＩＬ－４	４９．１	５０．９
ＨＥＲ２	ＨＥＲ２	ＣＤ３	５１．０	４９．０
ＣＤ３	ＨＥＲ２	ＣＤ３	４６．４	５３．６

【０１９３】

抗ＨＥＲ２／ＣＤ３を、その低いＢｓＩｇＧ$_1$収率（表ＢおよびＤｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．、下記を参照）に基づいてこの研究の対照として選択した。抗ＨＥＲ２ ＨＣは、非同族抗ＣＤ３ ＬＣよりも同族ＬＣに対する対合優先性を示さない。同様に、抗ＣＤ３ ＨＣは、非同族抗ＨＥＲ２ ＬＣよりも同族ＬＣについて対合優先性を示さない（表Ｃ参照）。

【０１９４】

単一の宿主細胞で共発現させた場合のその同族軽鎖（ＬＣ）または非同族ＬＣとのＨＣ対合も評価した。簡潔には、各ＨＣを、その同族ＬＣまたは非同族ＬＣのいずれかと共にＨＥＫ２９３由来ＥＸＰＩ２９３Ｆ（商標）細胞にコトランスフェクションした。ＩｇＧ１および半ＩｇＧ１種を、プロテインＡクロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製し、ＬＣ－ＭＳによって分析した。（Ｌａｂｒｉｊｎ ｅｔ ａｌ．「Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｔａｂｌｅ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ１ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｆａｂ－ａｒｍ ｅｘｃｈａｎｇｅ．」 Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ２０１３；１１０：５１４５－５０；Ｓｐｉｅｓｓ Ｃ ｅｔ ａｌ．「Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｗｉｔｈ ｎａｔｕｒａｌ ａｒｃｈｉｔｅｃｔｕｒｅ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｂｙ ｃｏ－ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉａ ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ｔｗｏ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ｈａｌｆ

－ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．」Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１３；３１：７５３－８）。同族ＨＣ／ＬＣ対合のパーセント比率を、半ＩｇＧ１種を定量化することによって計算した。タンパク質発現収率を、抗体濃度にハイスループットプロテインＡクロマトグラフィーステップから得られた溶出体積を乗算することによって推定した。抗ＥＧＦＲ、抗ＩＬ－１３および抗ＨＥＲ２のＨＣは「ノブ」変異（Ｔ３６６Ｗ）を含有し、抗ＭＥＴ、抗ＩＬ－４および抗ＣＤ３のＨＣは「ホール」変異（Ｔ３６６Ｓ：Ｓ３６８Ａ：Ｙ４０７Ｖ）を含有する（Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．「Ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｆｏｒｍａｔｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．」Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１５；６７：９５－１０６を参照）。競合が存在しない場合、試験した６つの異なるミスマッチＨＣ／ＬＣ対全てによって判断されるように、ＨＣは非同族ＬＣと効率的に集合することができる（以下の表Ｄ参照）。

表Ｄ：その同族軽鎖（ＬＣ）または非同族ＬＣとのＨＣ対合
単一の宿主細胞で共発現させた場合

ＨＣ	ＬＣ	半ＩｇＧ$_1$ ＨＣ－ＬＣ対合（％）	発現収率（ｍｇ）
ＭＥＴ	ＭＥＴ	１００．０	６．３
ＭＥＴ	ＥＧＦＲ	１００．０	６．７
ＥＧＦＲ	ＥＧＦＲ	１００．０	５．１
ＥＧＦＲ	ＭＥＴ	１００．０	６．６
ＩＬ－１３	ＩＬ－１３	１００．０	３．０
ＩＬ－１３	ＩＬ－４	１００	１．９
ＩＬ－４	ＩＬ－４	１００	４．８
ＩＬ－４	ＩＬ－１３	１００	３．１
ＨＥＲ２	ＨＥＲ２	１００	５．４
ＨＥＲ２	ＣＤ３	１００	６．１
ＣＤ３	ＣＤ３	１００	４．１
ＣＤ３	ＨＥＲ２	１００	５．０

抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ ＢｓＩｇＧ$_1$の収率に対する抗ＭＥＴ ＣＤＲ Ｌ３およびＣＤＲ Ｈ３の寄与

【０１９５】

抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与する抗ＭＥＴ抗体の配列決定因子を調べた。抗ＥＧＦＲ抗体と抗ＭＥＴ抗体との間のアミノ酸配列の相違は、完全にＣＤＲの内部に位置し、加えてＣＤＲ Ｈ３に直接隣接する１つのさらなるフレームワーク領域（ＦＲ）残基であるＶＨ９４（図４）。これらの抗体の残りのＦＲ、ならびにＣ$_k$およびＨ１定常ドメイン配列は同一である（図４）。ＣＤＲ Ｌ３およびＨ３は、その抗原と複合体形成した抗ＭＥＴ ＦａｂのＸ線結晶構造によって証明されるように（タンパク質データバンク（ＰＤＢ）識別コード４Ｋ３Ｊ）、抗ＭＥＴ抗体の V_H／V_L ドメイン界面に最も広く関与するＣＤＲである（Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．「Ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ ｏｆ ｏｎａｒｔｕｚｕｍａｂ，ａ ＭＥＴ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ｗｉｔｈ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｓ ａ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｇｅｎｔ．」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ２０１３；１１０：Ｅ２９８７－９６を参照）。これらの所見は、抗ＭＥＴ抗体のＣＤＲ Ｌ３およびＨ３が抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与し得るという仮説を導いた。この考えと一致して、抗ＭＥＴ抗体のＣＤＲ Ｌ３およびＨ３の両方を抗ＣＤ３抗体からの対応する配列で置換することにより、二重特異性収率が実質的に失われた（約

８５％から３３％、図５Ａ）。対照的に、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ二重特異性の抗ＥＧＦＲアームのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３の両方の置換は、ＢｓＩｇＧ収率のわずかな低下しかもたらさなかった（約８５％から７５％、図５Ａ）。抗ＥＧＦＲアームおよび抗ＭＥＴアームの両方に対するＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３の置換は、ランダムなＨＣ／ＬＣ対合をもたらした。これらのデータは、抗ＭＥＴのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３が、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$について観察された高い二重特異性収率に大きく寄与する一方で、抗ＥＧＦＲのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３は寄与が小さいという考えを支持している。抗ＭＥＴ抗体からのＣＤＲ　Ｌ１およびＨ１またはＣＤＲ　Ｌ２およびＨ２を、対応する抗ＣＤ３抗体配列に置換することは、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧの二重特異性収率にほとんどまたは全く影響を及ぼさなかった（図６）。

抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$の収率に対する抗ＭＥＴＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３内の残基の寄与

【０１９６】

次に、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与する抗ＭＥＴ抗体のＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３内の残基を調べた。抗ＭＥＴ　ＦａｂのＸ線結晶構造（ＰＤＢアクセッションコード４Ｋ３Ｊ）により、ＣＤＲ　Ｌ３とＨ３（図７）との間の接触残基が明らかになり、変異分析のための残基の選択を導くために使用した。抗ＭＥＴ　ＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３のアラニンスキャニング変異誘発（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．「Ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｅｐｉｔｏｐｅ　ｍａｐｐｉｎｇ　ｏｆ　ｈＧＨ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ　ｂｙ　ａｌａｎｉｎｅ－ｓｃａｎｎｉｎｇ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ．」Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８９；２４４：１０８１－５）を使用して、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与する残基をマッピングした。

表Ｅ１：以下に対するＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３接触残基のアラニンスキャニング変異誘発抗ＭＥＴ抗体

抗EGFR／MET　BsIgG$_1$		
抗METバリアント		収率（%）
CDR　L3	CDR　H3	
親	親	８３．６±３．５
Ｙ９１Ａ	親	５７．３±１．０
Ｙ９２Ａ	親	８９．５±０．２
Ｙ９４Ａ	親	６８．２±４．９
Ｐ９５Ａ	親	８５．８±１．０
Ｗ９６Ａ	親	７０．１±０．９
Ｙ９１Ａ：Ｙ９４Ａ	親	２２．６±０．４
Ｙ９１Ａ：Ｗ９６Ａ	親	３５．１±１．７
Ｙ９４Ａ：Ｗ９６Ａ	親	５６．０±０．２
Ｙ９１Ａ：Ｙ９４Ａ：Ｗ９６Ａ	親	２３．２±０．２
親	Ｙ９５Ａ	７４．９±０．９
親	Ｒ９６Ａ	７８．３±２．８
親	Ｓ９７Ａ	８２．７±３．９
親	Ｙ９８Ａ	７９．０±０．１
親	Ｖ９９Ａ	７９．８±０．９
親	Ｔ１００Ａ	８５．５±０．７
親	Ｐ１００Ａａ	６４．７±４．７
親	Ｖ９９Ａ：Ｐ１００ａＡ	７２．８±４．２

【０１９７】

上記の表Ｅ１に示されるように、ＣＤＲ　Ｌ３におけるV_L　Ｙ９１Ａ変異は、試験した１２の単一アラニン変異体のいずれにおいても二重特異性収率の最大の低下（８４％から５７％）をもたらした。ＣＤＲ　Ｌ３におけるわずか２つのアラニン置換、すなわちV_L　Ｙ９１Ａ：Ｙ９４Ａは、高い二重特異性収率を無効にした（８４％から２３％）。したがって、ＣＤＲ　Ｌ３残基V_L　Ｙ９１およびＹ９４は、抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に決定的な寄与をすると考えられる。全ての変異体の発現力価は、プロテインＡクロマトグラフィーからの回収収率によって推定され、親ＢｓＩｇＧ$_1$に匹敵した（データは示さない）。表Ｅ１に示されるデータは、最適化されたＨＣ／ＬＣ　ＤＮＡ比を使用した２つの独立した実験の±標準偏差を表す（表Ｂを参照）。

【０１９８】

ＭＥＴに対する表Ｅ１の親抗ＭＥＴ　ＦａｂおよびＭＥＴ　Ｆａｂバリアントのサブセットの親和性を、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって決定した。会合速度（k_{on}）、解離速度（k_{off}）および結合親和性（K_D）を表Ｅ２に示す（ｎ．ｄ．は、結合が検出されなかったことを示す）。ＣＤＲ　Ｌ３におけるＰ９５Ａ置換は、ＭＥＴに対する抗ＭＥＴ　Ｆａｂバリアントの結合に影響を及ぼさなかった。ＣＤＲ　Ｌ３における他の単一アラニン置換は、親和性を様々な程度に低下させた。ＣＤＲ　Ｌ３におけるＹ９１Ａ：Ｙ９４ＡまたはＹ９１Ａ：Ｗ９６Ａの二重置換を有する抗Ｍｅｔ　Ｆａｂバリアントについては、抗原への結合は検出されなかった。

表Ｅ２

親抗ＭＥＴ　ＦａｂおよびＦａｂバリアント				
ＣＤＲ　Ｌ３	ＣＤＲ　Ｈ３	k_{on} （ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$）	k_{off} （ｘ１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$）	K_D （ｎＭ）
親	親	１７．９	＜０．１	＜０．０５
Ｙ９１Ａ	親	７．０	０．６	０．８
Ｙ９２Ａ	親	１７．２	１．９	１．１
Ｙ９４Ａ	親	１１．５	６．５	５．７
Ｐ９５Ａ	親	１５．３	＜０．１	＜０．０６
Ｗ９６Ａ	親	８．４	１．７	２．１
Ｙ９１Ａ：Ｙ９４Ａ	親	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
Ｙ９１Ａ：Ｗ９６Ａ	親	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．

抗ＩＬ１３／ＩＬ１４　ＢｓＩｇＧ$_1$の収率に対する抗ＩＬ１３　ＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の寄与

【０１９９】

抗ＭＥＴ抗体のＣＤＲ　Ｌ３中の特定の残基が抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率のために重要であることが判明したことを考えると、同様の原理が抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与することにおいて抗ＩＬ－１３抗体に適用され得ると仮定された。類似の実験戦略を使用して、この可能性を調査した。これらの２つの抗体対の間の注目すべき違いの１つは、抗ＩＬ－１３および抗ＩＬ－４抗体はそのＣＤＲおよびＦＲ配列の両方が異なる（図８）のに対して、抗ＭＥＴおよび抗ＥＧＦＲ抗体は同一のＦＲ配列を有し（V_H９４を除く）、そのＣＤＲ配列が異なることである（図４）。

【０２００】

抗ＩＬ－１３抗体のＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３を抗ＣＤ３抗体由来の対応する配列で置換することにより、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　ＢｓＩｇＧ$_1$の二重特異性収率が実質的に失われた（約７２％から３７％、図５Ｂ）。対照的に、抗ＩＬ－４抗体のＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３を同様に置換した場合、わずかな上昇が観察された（図５Ｂ）。これらの結果から

、抗ＩＬ－１３抗体のＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３は、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与することが示唆された。

【０２０１】

抗ＩＬ－１３　ＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３のアラニンスキャニング変異分析（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．下記）を使用して、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　ＢｓＩｇＧ$_1$の高い二重特異性収率に寄与する残基をマッピングした。ＩＬ－１３と複合体を形成した抗ＩＬ－１３　ＦａｂのＸ線結晶構造（ＰＤＢアクセッションコード４Ｉ７７、Ｕｌｔｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．「Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　ｂａｓｉｓ　ｏｆ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　ｂｌｏｃｋａｄｅ　ｂｙ　ａｎｔｉ－ＩＬ－１３　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｌｅｂｒｉｋｉｚｕｍａｂ．」Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２０１３；４２５：１３３０－９参照）により、ＣＤＲ　Ｌ３とＨ３との間の接触残基が明らかになり（図９）、変異分析のための残基を選択するために使用した（下記表Ｆ１）。ＣＤＲ　Ｌ３変異Ｖ$_L$　Ｒ９６Ａは、ＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３について試験した９つの単一アラニン変異体のいずれにおいても二重特異性収率の最大の低下をもたらし、高い二重特異性収率を無効にした（７２％から２９％）。ＣＤＲ　Ｈ３におけるわずか２つのアラニン置換、すなわちＶ$_H$　Ｄ９５Ａ：Ｐ９９Ａもまた、高い二重特異性収率を無効にした（７２％から２６％）。全ての変異体の発現力価は、プロテインＡクロマトグラフィーからの回収収率によって推定され、親ＢｓＩｇＧ$_1$に匹敵した（データは示さない）。表Ｆ１に示されるデータは、最適化されたＨＣ／ＬＣＤＮＡ比を使用した２つの独立した実験の±標準偏差を表す（表Ｂを参照）。

表Ｆ１：以下についてのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３接触残基のアラニンスキャニング変異誘発

抗ＩＬ１３抗体

抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　ＢｓＩｇＧ$_1$		
抗ＩＬ１３バリアント		収率（%）
ＣＤＲ　Ｌ３	ＣＤＲ　Ｈ３	
親	親	７１．８±１．６
Ｎ９１Ａ	親	６５．４±２．１
Ｎ９２Ａ	親	６９．７±１．１
Ｄ９４Ａ	親	７８．１±３．３
Ｒ９６Ａ	親	２８．７±１．４
Ｎ９１Ａ：Ｄ９４Ａ	親	６８．７±３．５
Ｄ９４Ａ：Ｒ９６Ａ	親	２４．８±２．１
Ｎ９１Ａ：Ｄ９４Ａ：Ｒ９６Ａ	親	３６．８±０．１
親	Ｄ９５Ａ	５５．９±０．１
親	Ｙ９７Ａ	７７．０±１．９
親	Ｙ９８Ａ	６３．７±０．７
親	Ｐ９９Ａ	７２．５±１．３
親	Ｙ１００Ａ	５５．７±２．８
親	Ｄ９５Ａ：Ｐ９９Ａ	２６．１±２．９

【０２０２】

したがって、本明細書で研究される抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴおよび抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４ＢｓＩｇＧ$_1$の両方によって判断されるように、高い二重特異性収率への重要な寄与は、ＣＤＲ　Ｌ３および／またはＨ３によってなされ得る。

【０２０３】

ＩＬ－１３についての表Ｆ１の親抗ＩＬ－１３　ＦａｂおよびＩＬ－１３　Ｆａｂバリアントのサブセットの親和性を、ＳＰＲによって決定した。会合速度（ｋ$_{on}$）、解離

速度（k_{off}）および結合親和性（K_D）を表Ｆ２に示す（ｎ．ｄ．は結合が検出されなかったことを示す）。ＣＤＲ　Ｌ３におけるＮ９２Ａ置換もＤ９４Ａ置換も、ＩＬ－１３に対する抗ＩＬ－１３　Ｆａｂバリアントの結合に影響を及ぼさなかった。ＣＤＲ　Ｌ３のＲ９６Ａ置換は、ＣＤＲ　Ｌ３におけるＤ９４：Ｒ９６Ａの二重置換と同様に、結合親和性の約１０倍の損失をもたらした。ＣＤＲ　Ｈ３における他の単一アラニン置換は、親和性を様々な程度に低下させた。抗原への結合は、ＣＤＲ　Ｈ３のＤ９５Ａ：Ｐ９９Ａ二重置換については検出されなかった。

表Ｅ２．

親抗ＩＬ－１３　ＦａｂおよびＦａｂバリアント				
ＣＤＲ　Ｌ３	ＣＤＲ　Ｈ３	k_{on} （ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$）	k_{off} （ｘ１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$）	K_D （ｎＭ）
親	親	１１７．１	０．５	０．０５
Ｎ９２Ａ	親	１０３．０	０．３	０．０３
Ｄ９４Ａ	親	１２４．３	０．３	０．０２
Ｒ９６Ａ	親	８２．５	４．４	０．５
Ｄ９４Ａ：Ｒ９６Ａ	親	５２．８	３．７	０．７
親	Ｄ９５Ａ	８８．２	１１．１	１．３
親	Ｐ９９Ａ	１５０．４	２６．９	１．８
親	Ｄ９５Ａ：Ｐ９９Ａ	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．

ＢｓＩｇＧ$_1$の収率に対するＣＤＲ　Ｌ３およびＣＤＲ　Ｈ３の効果

【０２０４】

次に、これらの抗体からのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３が他の抗体対に高い二重特異性収率を提供するのに十分であり得るかどうかを決定するために一連の実験を行った。低い二重特異性収率を有する２つの抗体対、すなわち抗ＨＥＲ２／ＣＤ３（２２－２４％）および抗ＶＥＧＦＡ／ＡＮＧ２（２４％）（表Ｂおよび　Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、下記を参照）を選択し、これら２つのＢｓＩｇＧ$_1$のそれぞれ１つのアームについてのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３を、抗ＭＥＴ抗体または抗ＩＬ－１３抗体のいずれかからの対応するＣＤＲ配列に置換した。抗ＨＥＲ２／ＣＤ３（図１０Ａ）および抗ＶＥＧＦＡ／ＡＮＧ２（図１０Ｂ）の両方について、４つのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３のリクルートの場合の３つにおいて、ＢｓＩｇＧ$_1$の収率の実質的な上昇（約２４％から４０－６５％まで）が観察された。図１０Ａおよび図１０Ｂに示されるデータは、最適化されたＬＣ　ＤＮＡ比からのものである。図１０Ａおよび図１０Ｂのデータは、同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性を有する抗体からのＣＤＲ　Ｌ３およびＨ３のリクルートは、対合優先性のないＢｓＩｇＧ$_1$の収率を高めることができるが、常にそうであるとは限らないことを示す。

【０２０５】

ＢｓＩｇＧ１収率に対する抗ＩＬ－１３抗体から他の抗体への単一の重要な残基のリクルートの効果を調べた。以下の表Ｇ１を参照されたい。アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。可変ドメイン変異を含む抗体を太字で示す。示されるデータは、最適化されたＬＣ　ＤＮＡ比からのものである。９５位にアスパラギン酸残基を有する抗ＶＥＧＦＣ（Ｄ９５）は変異しなかった。

表Ｇ１：ＢｓＩｇＧ$_1$収率に対する効果を調べるための抗ＩＬ１３抗体からの単一の重要な残基の他の抗体へのリクルート

$BsIgG_1$	CDR L3	CDR H3	$BsIgG_1$収率（%）
抗HER2／CD3	親	親	24.0
抗**HER2**／CD3	T94D	親	47.5
抗**HER2**／CD3	P96R	親	40.1
抗**HER2**／CD3	親	W95D	36.0
抗VEGFA／ANG2	親	親	22.1
抗**VEGFA**／ANG2	V94D	親	23.8
抗**VEGFA**／ANG2	W96R	親	23.5
抗**VEGFA**／ANG2	親	Y95D	22.7
抗VEGFC／CD3	親	親	24.1
抗**VEGFC**／CD3	T94D	親（D95）	44.0
抗**VEGFC**／CD3	P96R	親（D95）	31.7

【０２０６】

抗ＩＬ－１３に対する対合優先性についての２つ以上の重要な残基を抗ＨＥＲ２抗体、抗ＶＥＧＦＡ抗体または抗ＶＥＧＦＣ抗体の対応する位置に移植すると、親抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４　$BsIgG_1$の場合よりも低いにもかかわらず、二重特異性収率のいくらかの上昇が観察された（以下表Ｇ２を参照）。表Ｇ２において、可変ドメイン変異を含む抗体を太字で示し、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。可変ドメイン変異を含む抗体は太字で下線の引かれた文字である。示されるデータは、最適化されたＬＣ　ＤＮＡ比を使用した２つの独立した実験の平均±ＳＤを表す。９５位にアスパラギン酸残基（Ｄ９５）を有する抗ＶＥＧＦＣは変異しなかった。

表Ｇ２：$BsIgG_1$収率に対する効果を調べるための抗ＩＬ１３抗体からの重要な残基の他の抗体へのリクルート

$BsIgG_1$	CDR L3	CDR H3	$BsIgG_1$収率（%）
抗HER2／CD3	親	親	24.0
抗**HER2**／CD3	T94D：P96R	親	31.8
抗**HER2**／CD3	親	W95D	36.0
抗**HER2**／CD3	T94D：P96R	W95D	47.4
抗VEGFA／ANG2	親	親	22.1
抗**VEGFA**／ANG2	V94D：W96R	親	52.5
抗**VEGFA**／ANG2	親	Y95D	22.7
抗**VEGFA**／ANG2	V94D：W96R	Y95D	59.1
抗VEGFC／CD3	親	親（D95）	24.1
抗**VEGFC**／CD3	T94D：P96R	親（D95）	50.4

【０２０７】

まとめると、これらの結果は、ＣＤＲ　Ｌ３の９４位および９６位（Ｋａｂａｔ番号付け）およびＣＤＲ　Ｈ３の９５位（Ｋａｂａｔ番号付け）の荷電残基（例えば、ＤおよびＲ）が、全てではないが一部の抗体対に対して対合優先性を付与し得ることを示唆した。

【０２０８】

それぞれの標的に対する表Ｇ１およびＧ２の親抗ＨＥＲ２、抗ＶＥＧＦＡおよび抗ＶＥＧＦＣ　Ｆａｂならびに抗ＨＥＲ２、抗ＶＥＧＦＡおよび抗ＶＥＧＦＣ　Ｆａｂバリアントのサブセットの親和性をＳＰＲによって決定した。会合速度（k_{on}）、解離速度（k_{off}）および結合親和性（K_D）を表Ｇ３に示す（ｎ．ｄ．は結合が検出されなかったことを示す）。重要な残基を抗ＩＬ１３から他の抗体に転移すると、結合親和性が失われ

た。特に、抗ＨＥＲ２のＣＤＲ－Ｌ３におけるＴ９４Ｄ置換は、抗ＨＥＲ２／抗ＣＤ３ＢｓＡｂのＢｓＩｇＧ$_1$収率を２４％からほぼ５０％に上昇させたが、ＨＥＲ２に対する抗ＨＥＲ２の親和性を２０倍しか低下させなかった。同様に、ＶＥＧＦＡのＣＤＲ－Ｌ３におけるＶ９４Ｄ：Ｗ９６Ｒの二重置換は、抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２　ＢｓＡｂのＢｓＩｇＧ$_1$収率を約２２％から約５２％に上昇させたが、ＶＥＧＦＡに対する抗ＶＥＧＦＡの親和性を約２０倍低下させただけであった

表Ｇ３

Ｆａｂ	ＣＤＲ　Ｌ３	ＣＤＲ　Ｈ３	k_{on} (ｘ１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ^1)	k^{off} (ｘ１０$^{-4}$ｓ^1)	K_D (ｎＭ)
抗ＨＥＲ２	親	親	１０．４	１．３	１．２
	Ｔ９４Ｄ	親	６．９	１６．８	２４．４
	Ｐ９６Ｒ	親	７．０	１４９．５	２１２．９
	親	Ｗ９５Ｄ	８．０	２９．４	３６．５
	Ｔ９４Ｄ：Ｐ９６Ｒ	親	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
	Ｔ９４Ｄ：Ｐ９６Ｒ	Ｗ９５Ｄ	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
抗ＶＥＧＦＡ	親	親	６５．４	＜０．１	＜０．０１５
	Ｖ９４Ｄ	親	５９．８	＜０．１	＜０．０１６
	Ｗ９６Ｒ	親	１３．３	９．１	６．８
	親	Ｙ９５Ｄ	９２．６	６．０	０．６
	Ｖ９４Ｄ：Ｗ９６Ｒ	親	１６３．８	４．７	０．３
	Ｔ９４Ｄ：Ｐ９６Ｒ	Ｗ９５Ｄ	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
抗ＶＥＧＦＣ	親	親	１７．１	１４．１	８．２
	Ｖ９４Ｄ	親	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
	Ｗ９６Ｒ	親	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．
	親	Ｙ９５Ｄ	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．	ｎ．ｄ．

【０２０９】

表Ｇ１および表Ｇ２に示される結果とは対照的に、抗ｃＭｅｔに対する対合優先性のための重要な残基を抗ＨＥＲ２抗体、抗ＶＥＧＦＡ抗体または抗ＶＥＧＦＣ抗体の対応する位置に移植した場合、ほとんどの場合において二重特異性収率の上昇はわずかにしか観察されなかった。以下の表Ｇ４を参照のこと。表Ｇ４では、可変ドメイン変異を含む抗体を太字で示し、アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。

表Ｇ４：ＢｓＩｇＧ$_1$収率に対する効果を調べるための抗ｃＭｅｔ抗体から他の抗体への重要な残基のリクルート

$BsIgG_1$	CDR L3	CDR H3	$BsIgG_1$収率（%）
抗HER2／CD3	親	親	24.0
抗HER2／CD3	H91Y	親	23.6
抗HER2／CD3	T94Y	親	31.0
抗HER2／CD3	P96W	親	26.2
抗HER2／CD3	H91Y：T94Y	親	24.2
抗HER2／CD3	H91Y：P96W	親	23.4
抗HER2／CD3	T94Y：P96W	親	22.7
抗HER2／CD3	H91Y：T94Y：P96W	親	23.6
抗VEGFA／ANG2	親（Y91，W96）	親	22.1
抗VEGFA／ANG2	（Y91）V94Y（W96）	親	23.6
抗VEGFC／CD3	親	親	23.9
抗VEGFC／CD3	S91Y	親	22.6
抗VEGFC／CD3	T94Y	親	33.6
抗VEGFC／CD3	P96W	親	47.7
抗VEGFC／CD3	S91Y：T94Y	親	22.4
抗VEGFC／CD3	S91Y：P96W	親	59.0
抗VEGFC／CD3	T94Y：P96W	親	36.4
抗VEGFC／CD3	S91Y：T94Y：P96W	親	47.8
抗HER2／EGFR	親	親	21.4
抗HER2／EGFR	H91Y：T94Y	親	22.3
抗HER2／EGFR	H91Y：P96W	親	24.2
抗HER2／EGFR	T94Y：P96W	親	23.4
抗HER2／EGFR	H91Y：T94Y：P96W	親	33.6

$BsIgG_1$の収率に対する鎖間ジスルフィド結合の寄与

【0210】

以前、HCとLCとの間の鎖間ジスルフィド結合の形成は、鎖交換を防ぐ動力学的トラップとして作用すると仮定された（Dillon et al.、下記）。顕著な同族鎖優先性を有する2つの$BsIgG_1$（抗EGFR／METおよび抗IL-13／IL-4）およびランダムなHC／LC対合を有する2つの対照（抗HER2／CD3および抗VEGFA／VEGFC）を用いて、HCとLCとの間のジスルフィド結合が二重特異性収率に影響を及ぼすかどうかを調べるために実験を行った。簡潔には、システインからセリンへの変異を使用して、鎖間ジスルフィド結合を欠く$BsIgG_1$バリアントを生成した：LC C214SおよびHC C220S。操作されたバリアントにおける鎖間ジスルフィド結合の除去をSDS PAGEによって検証した。図11に示すように、還元条件下または非還元条件下のいずれかで試料を電気泳動した。4つの異なるBsIgG1を分析した：抗HER2／CD3（レーン1）；抗VEGFA／VEGFC（レーン2）；抗EGFR／MET（レーン3）；および抗IL13／IL14（レーン4）。下記の表Hに示されるように、鎖間ジスルフィド結合が、ネイティブ質量分析によって判断されるように、試験された4つの抗体対のいずれについても$BsIgG_1$収率に影響を及ぼすという明確な証拠は見出されなかった。親およびジスルフィド結合操作バリアントの$BsIgG_1$の収率は類似していた。表Hのデータは、最適化されたDNA軽鎖比を用いた3回の生物学的複製の平均±標準偏差である。

表H：$BsIgG_1$収率に対するHCとLCとの間のジスルフィド結合の効果を決定するための変異分析。

	ＢｓＩｇＧ$_1$収率（％）	
ＢｓＩｇＧ$_1$	ＨＣ／ＬＣジスルフィド結合を有する親	ＨＣ／ＬＣジスルフィド結合を有しないバリアント
抗ＥＧＦＲ／ＭＥＴ	８１．１±１．４	８２．８±２．６
抗ＩＬ－１３／ＩＬ－４	７３．３±４．５	７５．１±０．８
抗ＨＥＲ２／ＣＤ３	２４．５±０．８	２７．０±２．４
抗ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＣ	２８．８±５．９	３８．０±６．０

【０２１１】

要約すると、この研究は、単一細胞でＢｓＩｇＧを産生する際の同族ＨＣ／ＬＣ対合優先性が、特定の抗体対に高度に依存する一般的な現象であることを実証している。機構的には、この鎖対合優先性は、ＣＤＲ　Ｈ３およびＬ３中の残基によって強く影響され得る。実際には、この対合優先性を利用して、単一細胞におけるＢｓＩｇＧ$_1$および潜在的な他のアイソタイプのＢｓＩｇＧの産生を駆動するために使用されるＦａｂ変異の数を低下させることができる。

追加の参考文献

Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ　Ｕ，Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ　ＲＥ．Ｔｈｅ　ｍａｋｉｎｇ　ｏｆ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．ｍＡｂｓ　２０１７；９：１８２－２１２．

Ｃａｒｔｅｒ　ＰＪ，Ｌａｚａｒ　ＧＡ．Ｎｅｘｔ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｄｒｕｇｓ：ｐｕｒｓｕｉｔ　ｏｆ　ｔｈｅ　‘ｈｉｇｈ－ｈａｎｇｉｎｇ　ｆｒｕｉｔ’．Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ　２０１８；１７：１９７－２２３．

Ｓａｎｆｏｒｄ　Ｍ．Ｂｌｉｎａｔｕｍｏｍａｂ：ｆｉｒｓｔ　ｇｌｏｂａｌ　ａｐｐｒｏｖａｌ．Ｄｒｕｇｓ　２０１５；７５：３２１－７．

Ｏｌｄｅｎｂｕｒｇ　Ｊ，Ｍａｈｌａｎｇｕ　ＪＮ，Ｋｉｍ　Ｂ，Ｓｃｈｍｉｔｔ　Ｃ，Ｃａｌｌａｇｈａｎ　ＭＵ，Ｙｏｕｎｇ　Ｇ，Ｓａｎｔａｇｏｓｔｉｎｏ　Ｅ，Ｋｒｕｓｅ－Ｊａｒｒｅｓ　Ｒ，Ｎｅｇｒｉｅｒ　Ｃ，Ｋｅｓｓｌｅｒ　Ｃ，ｅｔ　ａｌ．Ｅｍｉｃｉｚｕｍａｂ　ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ　ｉｎ　ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ａ　ｗｉｔｈ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ．Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２０１７；３７７：８０９－１８．

Ｓｃｏｔｔ　ＬＪ，Ｋｉｍ　ＥＳ．Ｅｍｉｃｉｚｕｍａｂ－ｋｘｗｈ：Ｆｉｒｓｔ　Ｇｌｏｂａｌ　Ａｐｐｒｏｖａｌ．Ｄｒｕｇｓ　２０１８；７８：２６９－７４．

Ｓｕｒｅｓｈ　ＭＲ，Ｃｕｅｌｌｏ　ＡＣ，Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　Ｃ．Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｆｒｏｍ　ｈｙｂｒｉｄ　ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ　１９８６；１２１：２１０－２８．

Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｎ，Ｅｌｓｏｎ　Ｇ，Ｍａｇｉｓｔｒｅｌｌｉ　Ｇ，Ｄｈｅｉｌｌｙ　Ｅ，Ｆｏｕｑｕｅ　Ｎ，Ｌａｕｒｅｎｄｏｎ　Ａ，Ｇｕｅｎｅａｕ　Ｆ，Ｒａｖｎ　Ｕ，Ｄｅｐｏｉｓｉｅｒ　ＪＦ，Ｍｏｉｎｅ　Ｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｅｘｐｌｏｉｔｉｎｇ　ｌｉｇｈｔ　ｃｈａｉｎｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｓｃａｌａｂｌｅ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｐｌａｔｆｏｒｍ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｎａｔｉｖｅ　ｈｕｍａｎ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＩｇＧ．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　２０１５；６：６１１３．

Ｓｔｒｏｐ　Ｐ，Ｈｏ　ＷＨ，Ｂｏｕｓｔａｎｙ　ＬＭ，Ａｂｄｉｃｈｅ　ＹＮ，Ｌｉｎｄｑｕｉｓｔ　ＫＣ，Ｆａｒｉａｓ　ＳＥ，Ｒｉｃｋｅｒｔ　Ｍ，Ａｐｐａｈ　ＣＴ，Ｐａｓｃｕａ　Ｅ，Ｒａｄｃｌｉｆｆｅ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ１　ａｎｄ　ＩｇＧ２　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｆｒｏｍ　ａｎｙ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐａｉｒ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２０１２；４２０：２０４－１９．

Ｖａｋｓ　Ｌ，Ｌｉｔｖａｋ－Ｇｒｅｅｎｆｅｌｄ　Ｄ，Ｄｒｏｒ　Ｓ，Ｍａｔａｔｏｖ　Ｇ，Ｎａｈａｒｙ　Ｌ，Ｓｈａｐｉｒａ　Ｓ，Ｈａｋｉｍ　Ｒ，Ａｌｒｏｙ　Ｉ，Ｂｅｎｈａｒ　Ｉ．Ｄｅｓｉｇｎ　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｆｏｒ　ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ

IgGs, opportunities and pitfalls of artificial disulfide bonds. Antibodies 2018;7.
Schaefer W, Volger HR, Lorenz S, Imhof-Jung S, Regula JT, Klein C, Mølhøj M. Heavy and light chain pairing of bivalent quadroma and knobs-into-holes antibodies analyzed by UHR-ESI-QTOF mass spectrometry. MAbs 2016;8:49-55.
Bonisch M, Sellmann C, Maresch D, Halbig C, Becker S, Toleikis L, Hock B, Ruker F. Novel CH1:CL interfaces that enhance correct light chain pairing in heterodimeric bispecific antibodies. Protein Eng Des Sel 2017;30:685-96.
Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nature Medicine 2012;18:1570-4.
Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Funaki M, Yoshihashi K, Kitazawa T, Muto A, Kojima T, Nakamura S, Hattori K. Non-antigen-contacting region of an asymmetric bispecific antibody to factors IXa/X significantly affects factor VIII-mimetic activity. MAbs 2015;7:120-8.
Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, Tanaka E, Muto A, Kojima T, Kitazawa T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. PLoS One 2013;8:e57479.
Carter PJ. Introduction to current and future protein therapeutics:a protein engineering perspective. Exp Cell Res 2011.
Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. J Mol Biol 2007;368:652-65.
Cooke HA, Arndt J, Quan C, Shapiro RI, Wen D, Foley S, Vecchi MM, Preyer M. EFab domain substitution as a solution to the light-chain pairing problem of bispecific antibodies. MAbs 2018;10:1248-59.

Tiller KE, Li L, Kumar S, Julian MC, Garde S, Tessier PM. Arginine mutations in antibody complementarity-determining regions display context-dependent affinity/specificity trade-offs. J Biol Chem 2017;292:16638-52.
Dashivets T, Stracke J, Dengl S, Knaupp A, Pollmann J, Buchner J, Schlothauer T. Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies. MAbs 2016;8:1525-35.
Lamberth K, Reedtz-Runge SL, Simon J, Klementyeva K, Pandey GS, Padkjaer SB, Pascal V, Leon IR, Gudme CN, Buus S, et al. Post hoc assessment of the immunogenicity of bioengineered factor VIIa demonstrates the use of preclinical tools. Sci Transl Med 2017;9.
Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. mAbs 2014;2:256-65.
Sekiguchi N, Kubo C, Takahashi A, Muraoka K, Takeiri A, Ito S, Yano M, Mimoto F, Maeda A, Iwayanagi Y, et al. MHC-associated peptide proteomics enabling highly sensitive detection of immunogenic sequences for the development of therapeutic antibodies with low immunogenicity. MAbs 2018;10:1168-81.
Schachner L, Han G, Dillon M, Zhou J, McCarty L, Ellerman D, Yin Y, Spiess C, Lill JR, Carter PJ, et al. Characterization of chain pairing variants of bispecific IgG expressed in a single host cell by high-resolution native and denaturing mass spectrometry. Anal Chem 2016;88:12122-7.

実施例３：実施例２で生成された改変抗体の親和性成熟

【０２１２】

実施例２で生成された表Ｉの例示的抗体は、それぞれの標的抗原に対する親和性を改善するために親和性成熟に供される。

表Ｉ

抗体	ＣＤＲ　Ｌ３*	ＣＤＲ　Ｈ３*	親和性成熟のための例示的な候補（親親和性を回復させるために約２０～４０倍）
抗ＨＥＲ２／ＥＧＦＲ	Ｔ９４Ｄ	親	改変抗体のK_Dは、非改変親よりも約２０倍低い**
	親	Ｗ９５Ｄ	改変抗体のK_Dは、非改変親よりも約３０倍低い**
抗ＶＥＧＦＡ	Ｖ９４Ｄ	親	改変抗体のK_Dは、非改変親（任意選択的に、さらなる親和性成熟していてもよい）**のK_Dに匹敵する
	親	Ｙ９５Ｄ	改変抗体のK_Dは、非改変親よりも約３８倍低い**
	Ｖ９４Ｄ：Ｗ９６Ｒ	親	改変抗体のK_Dは、非改変親よりも約２０倍低い**

＊アミノ酸番号付けはＫａｂａｔに従っている。
＊＊表Ｇ３を参照のこと。

【０２１３】

簡潔には、各抗体について１つ以上のポリペプチドライブラリ（例えば、ファージディスプレイまたは細胞表面ディスプレイライブラリ）を作製するために、表Ｉの抗体のＣＤＲに変異を導入する。二重特異性収率を改善するために各抗体のＣＤＲ－Ｌ３および／またはＣＤＲ－Ｈ３に導入されたアミノ酸置換（表Ｉを参照のこと）は、固定されたままであり、ライブラリ構築中にランダム化されない。次いで、例えば、Ｗａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ．５８：６５７－６７０、Ｒａｊｐａｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．１０２：８４６６－８４７１に記載されているように、パニングまたは細胞選別によってスクリーニングし、標的抗原（すなわち、ＨＥＲ２、ＶＥＧＦＡまたはＶＥＧＦＣ）に高親和性で結合する抗体バリアントを同定する。次いで、そのようなバリアントを単離し、それらの標的抗原に対するそれらの親和性を、例えば表面プラズモン共鳴によって決定し、表Ｉに示される抗体および表Ｉ中の抗体が由来する親抗体の親和性と比較する（例えば、表Ｇ３を参照のこと）。少なくとも１回（例えば、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、または１０回の少なくともいずれか１つ）の親和性成熟を行って、高親和性抗ＨＥＲ２バリアント、高親和性抗ＶＥＧＦＡバリアントおよび高親和性抗ＶＥＧＦＣバリアントを同定する。それぞれの標的抗原に対して高い親和性を有する抗体バリアントの配列を決定する。

【０２１４】

次に、上記のスクリーニングで同定されたバリアントをさらに分析して、二重特異性抗体収率に対するそれらの効果を評価する。完結には、高親和性抗ＨＥＲ２、抗ＶＥＧＦＡおよび抗ＶＥＧＦＣバリアントを二重特異性抗体として再フォーマットする。例示的な二重特異性抗体としては、例えば、抗ＨＥＲ２／抗ＣＤ３、抗ＶＥＧＦＡ／抗ＡＮＧ２および抗ＶＥＧＦＣ／抗ＣＤ３が含まれるが、これらに限定されない（上記の表Ｇ１および表Ｇ２を参照）。二重特異性抗体は、例えば、実施例１に詳述されている方法に従って発現および精製される。正しく集合した二重特異性抗体の収率を、例えば、実施例１に詳述されているように、サイズ排除クロマトグラフィー、高分解能ＬＣＭＳおよび／またはＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル分析によって評価する。例えば、表Ｇ１および表Ｇ２に示される二重特異性抗体を使用する対照実験が並行して行われる。ライブラリスクリーニングによって特定される高親和性抗ＨＥＲ２抗体バリアント、高親和性抗ＶＥＧＦＡバリアントまたは抗ＶＥＧＦＣバリアントを含む二重特異性抗体の収率が、表Ｉに示される抗ＨＥＲ２抗体、抗ＶＥＧＦＡ抗体または抗ＶＥＧＦＣ抗体を含む二重特異性抗体の収率と比較される。１

つ以上の親和性成熟ステップに供され、改善された親和性およびＢｓＡｂ収率についてさらにアッセイされる、すなわち、上記のような、さらなる改変抗体を表Ｇ３に示す。

追加の参照文献

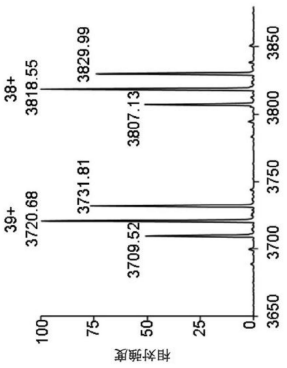
Ｍｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１１０（３２）：Ｅ２９８７－９６
Ｊｕｌｉａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ．７：４５２５９
Ｔｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：９８６
Ｋｏｅｎｉｇ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１１４（４）：Ｅ４８６－Ｅ４９５
Ｙａｍａｓｈｉｔａ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ．２７，５１９－５２７
Ｐａｙａｎｄｅｈ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２０：９４０－９５０
Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１９）ｍＡｂｓ．１１（１）：１６６－１７７
Ｃｉｓｎｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｍｏｌ．Ｓｙｓｔ．Ｄｅｓ．Ｅｎｇ．４：７３７－７４６

【０２１５】

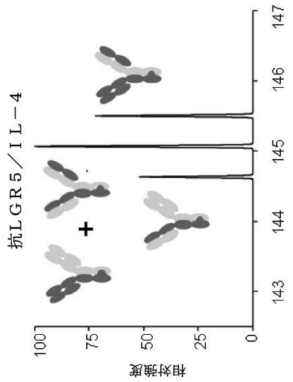
前述の実施例は、例示目的のためのみに提供されており、決して、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書に示され、記載される改変に加えて、本発明の種々の改変は、前述の記載から当技術分野の当業者には明らかになり、これらは添付の特許請求の範囲内にある。

【図面】

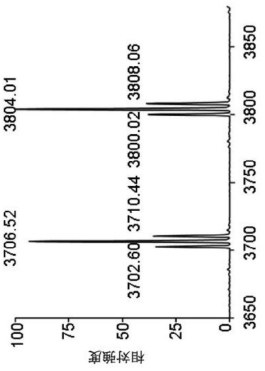
【図１Ａ】



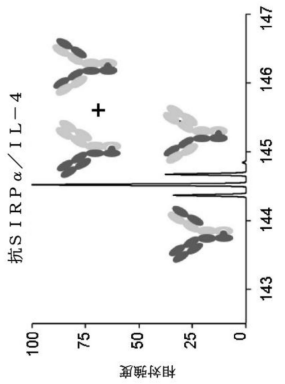
【図１Ｂ】



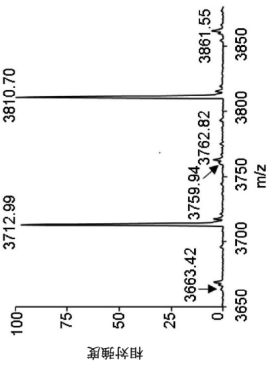
【図１Ｃ】



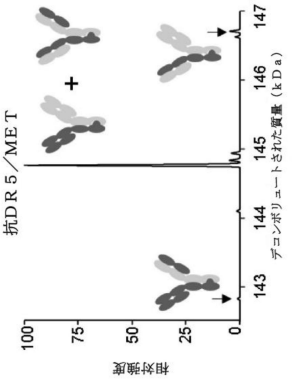
【図１Ｄ】



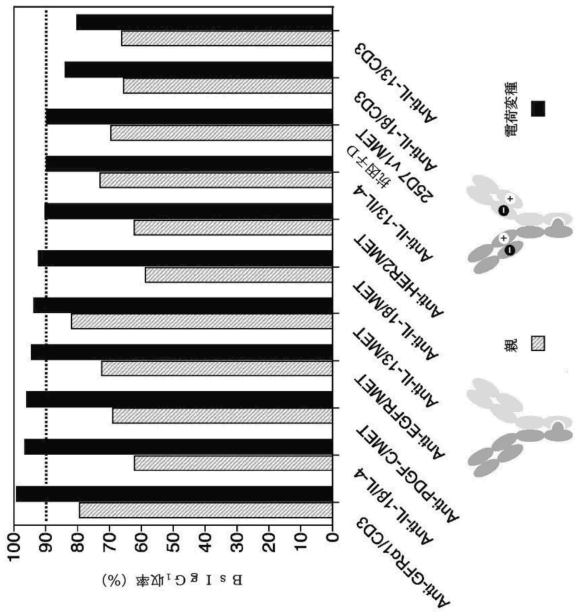
【図１Ｅ】



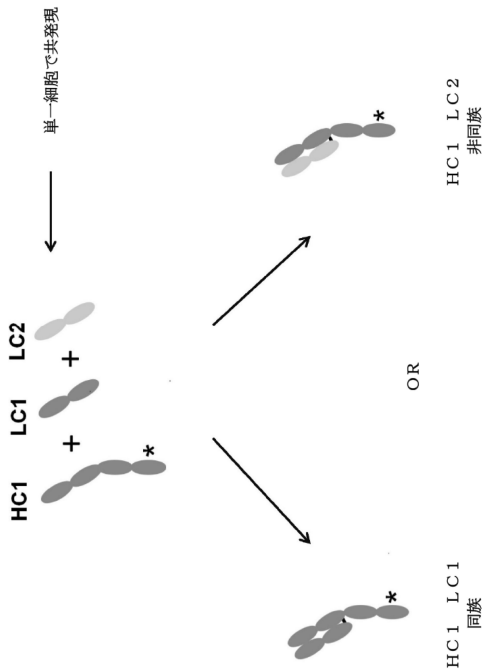
【図１Ｆ】



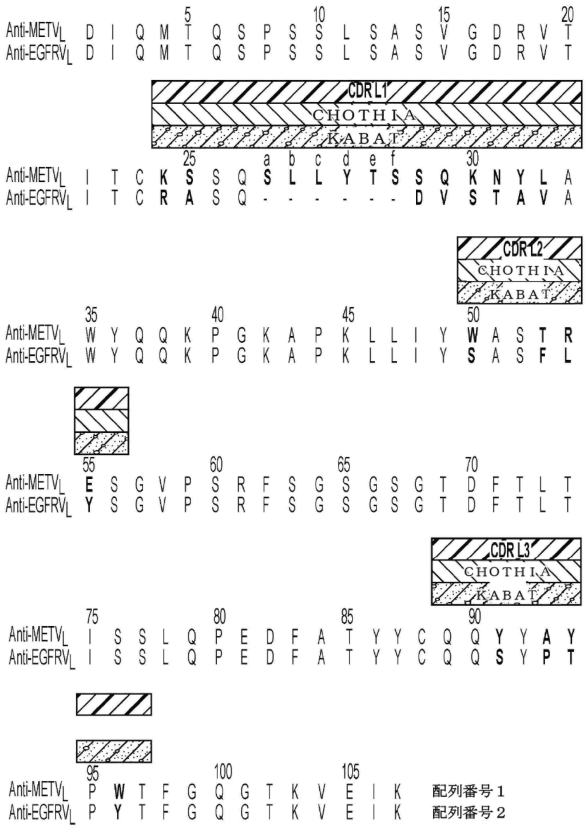
【図２】


Anti-GFRα1/CD3
Anti-IL-1β/IL-4
Anti-PDGF-CMET
Anti-EGFRMET
Anti-IL-13MET
Anti-IL-18MET
Anti-HER2MET
Anti-IL-13/IL-4
25Q7 V1MET
Anti-IL-1β/CD3
Anti-IL-13/CD3
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
Bs1gG1収率 (%)
電荷変種
親
抗原ナシ

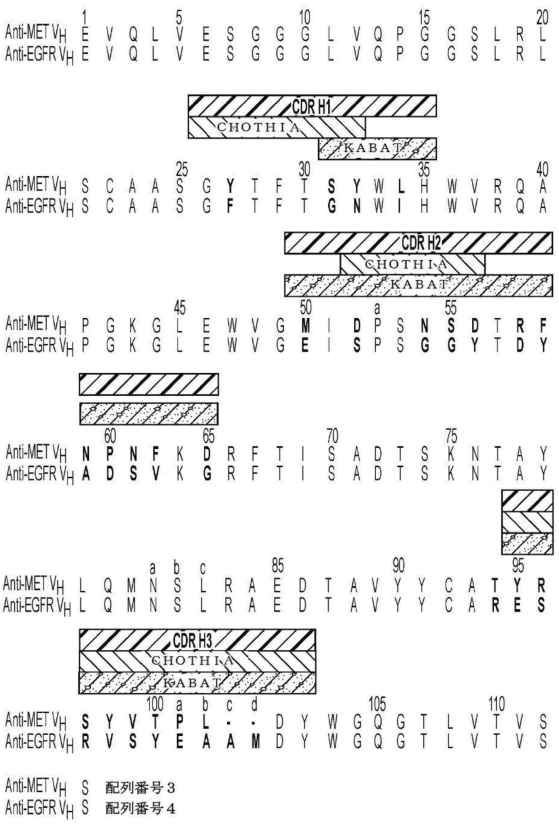
【図３】


単一細胞で共発現
LC2
LC1
HC1
OR
HC1 LC2
非同族
HC1 LC1
同族

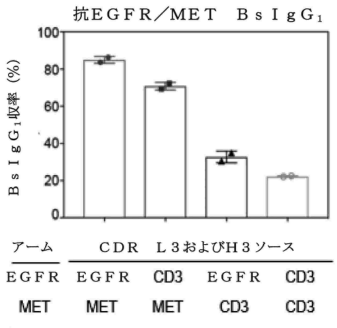
【図４Ａ】


Anti-METVL D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
Anti-EGFRVL D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
CDR L1
CHOTHIA
KABAT
Anti-METVL I T C K S Q S L L Y T S S Q K N Y L A
Anti-EGFRVL I T C R A S Q - - - - - - D V S T A V A
CDR L2
Anti-METVL W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W A S T R
Anti-EGFRVL W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L
Anti-METVL E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
Anti-EGFRVL Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
CDR L3
Anti-METVL I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y A Y
Anti-EGFRVL I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y P T
Anti-METVL P W T F G Q G T K V E I K 配列番号１
Anti-EGFRVL P Y T F G Q G T K V E I K 配列番号２

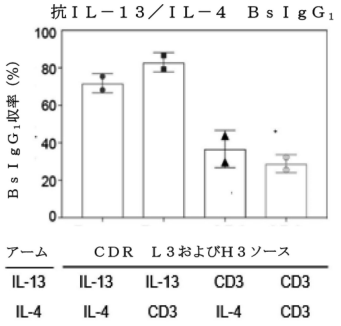
【図４Ｂ】


Anti-METVH E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
Anti-EGFRVH E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
CDR H1
CHOTHIA
KABAT
Anti-METVH S C A A S G Y T F T S Y W L H W V R Q A
Anti-EGFRVH S C A A S G F T F T G N W I H W V R Q A
CDR H2
Anti-METVH P G K G L E W V G M I D P S N S D T R F
Anti-EGFRVH P G K G L E W V G E I S P S G G Y T D Y
Anti-METVH N P N F K D R F T I S A D T S K N T A Y
Anti-EGFRVH A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y
Anti-METVH L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T Y R
Anti-EGFRVH L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E S
CDR H3
CHOTHIA
KABAT
Anti-METVH S Y V T P L - - D Y W G Q G T L V T V S
Anti-EGFRVH R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V T V S
Anti-METVH S 配列番号３
Anti-EGFRVH S 配列番号４

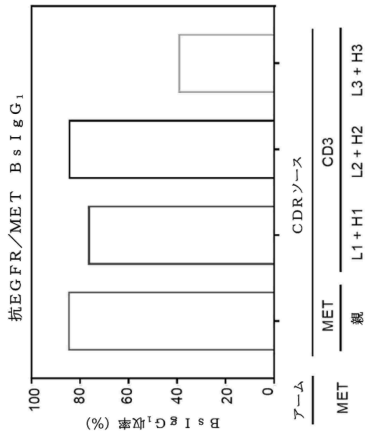
【図５Ａ】


抗EGFR／MET BsIgG1
BsIgG1収率（%）
100
80
60
40
20
0
アーム
CDR L3およびH3ソース
EGFR EGFR CD3 EGFR CD3
MET MET MET CD3 CD3

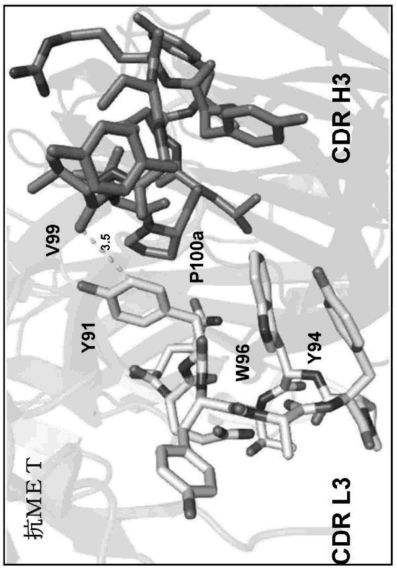
【図５Ｂ】


抗IL−13／IL−4 BsIgG1
BsIgG1収率（%）
100
80
60
40
20
0
アーム
CDR L3およびH3ソース
IL-13 IL-13 IL-13 CD3 CD3
IL-4 IL-4 CD3 IL-4 CD3

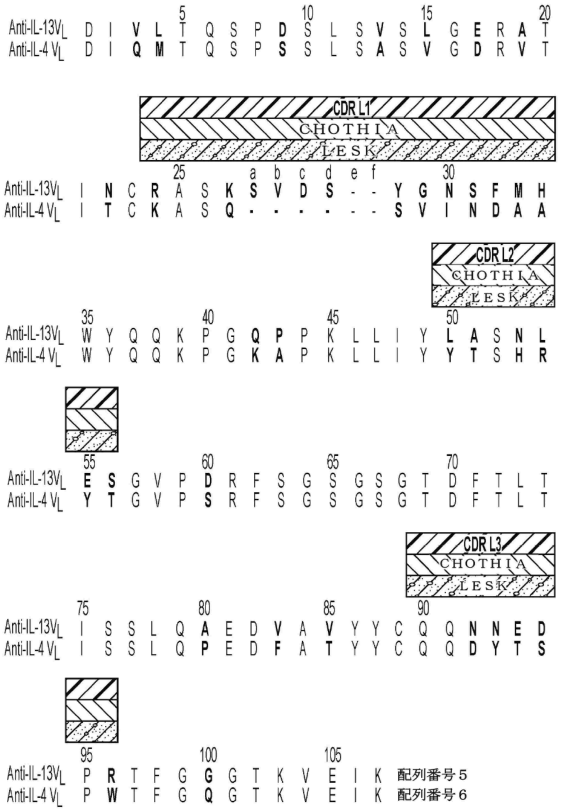
【図６】


抗EGFR／MET BsIgG1
BsIgG1収率（%）
100
80
60
40
20
0
アーム
MET
MET
親
CDRソース
CD3
L1 + H1
L2 + H2
L3 + H3

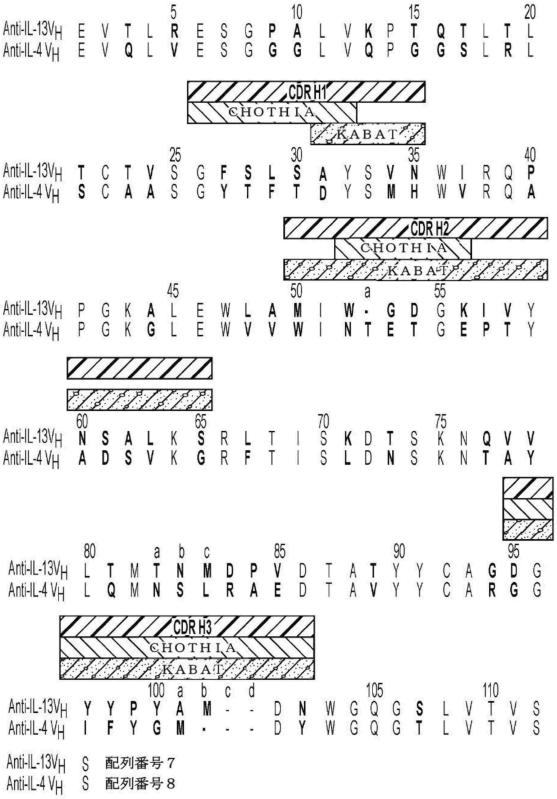
【図７】


CDR H3
V99
3.5
P100a
Y91
W96
Y94
抗MET
CDR L3

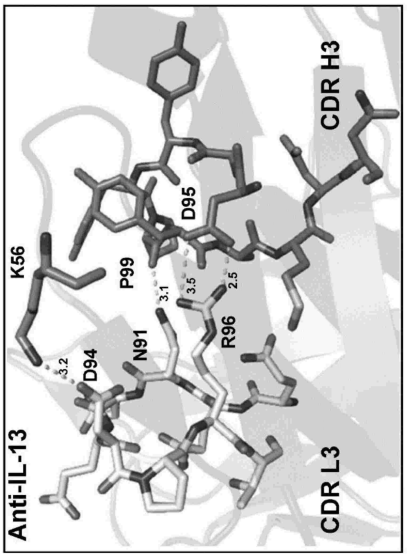
【図８Ａ】



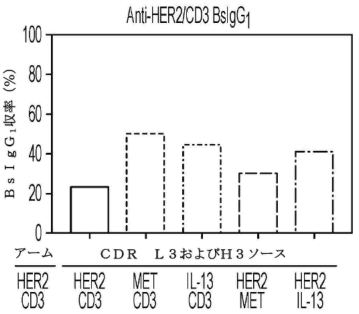
【図８Ｂ】



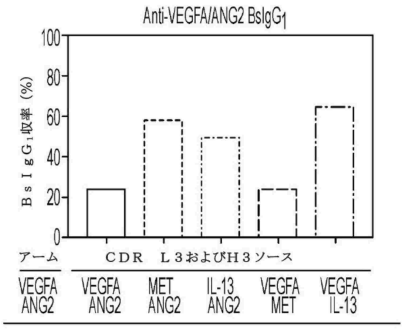
【図９】



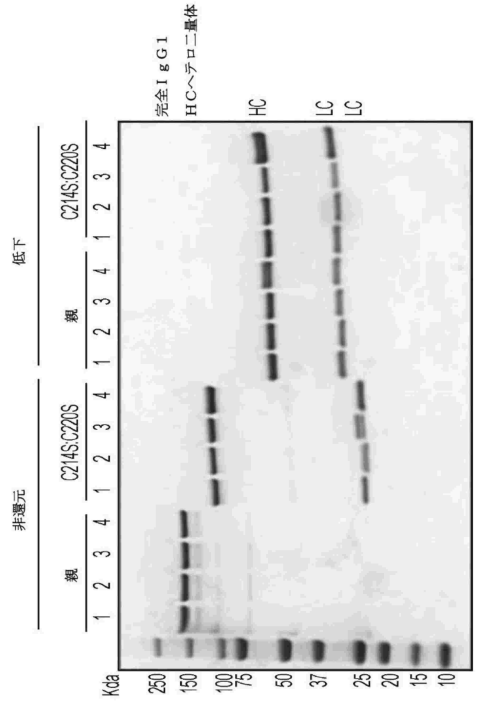
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【図１１】



【配列表】

2024028811000001.xml

【手続補正書】
【提出日】令和６年１月４日(２０２４.１.４)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載の一の発明。
【外国語明細書】
２０２４０２８８１１０００００３６.ｐｄｆ

フロントページの続き

ィーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 イン， イーユアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド