(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-531594
(P2023-531594A)
(43)公表日　令和5年7月25日(2023.7.25)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		4B065
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	ZNA	4C076
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C085
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全95頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-575309(P2022-575309)
(86)(22)出願日　令和3年6月7日(2021.6.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月31日(2023.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/036117
(87)国際公開番号　WO2021/252327
(87)国際公開日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　63/036,062
(32)優先日　令和2年6月8日(2020.6.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/085,351
(32)優先日　令和2年9月30日(2020.9.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/088,586
最終頁に続く

(71)出願人　514104933
ユニヴァーシティ オブ ワシントン
アメリカ合衆国 ９８１０５ ワシントン
州 シアトル ルーズベルト ウェイ ノー
スイースト ４５４５ スイート ４００
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗体結合ナノ粒子

(57)【要約】
（Ｆｃ）結合ドメイン、ヘリックスポリペプチド単量体、およびオリゴマードメインを含むポリペプチド、ならびにＴｉｅ２抗体または二量体のいずれか、または腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー抗体を含む抗体粒子、ならびにそれらの用途が開示される。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、
（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；または
（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
括弧中の残基が、任意選択的である（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、
複数のポリペプチド多量体；および
（ｂ）（ｉ）Ｆｃドメインを含む複数のＴｉｅ２受容体抗体、および／または（ｉｉ）Ｆｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）の複数の二量体の複数であって；
（ｉ）各Ｔｉｅ２抗体または二量体が、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み；
（ｉｉ）複数における各Ｔｉｅ２抗体または二量体が、（Ａ）第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に第１のＦｃドメインを介して非共有結合され、かつ（Ｂ）第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に第２のＦｃドメインを介して非共有結合され；およ

び
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖が、１つのＦｃドメインに非共有結合される、
複数、
を含み、
二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む、粒子。
【請求項２】
多量体が、いくつかのアミノ酸の差異を有する単量体を含む、請求項１の粒子。
【請求項３】
ホモオリゴマーではない多量体を含む、請求項１または２の粒子。
【請求項４】
粒子中の各多量体が、同一である、請求項１～３のいずれか１項に記載の粒子。
【請求項５】
各多量体中の各単量体が、同一でありかつ各多量体が、ホモ多量体である、請求項１の粒子。
【請求項６】
粒子中の各ホモ多量体が、同一である、請求項５の粒子。
【請求項７】
複数の多量体が、配列番号：１～３から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの二量体を含む、請求項１～６のいずれか１項の粒子。
【請求項８】
複数の多量体が、配列番号：４～６から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの三量体を含む、請求項１～６のいずれか１項の粒子。
【請求項９】
複数の多量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの四量体を含む、請求項１～６のいずれか１項の粒子。
【請求項１０】
複数の多量体が、配列番号：８～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの五量体を含む、請求項１～６のいずれか１項の粒子。
【請求項１１】
配列番号：１～９のいずれか１つのポリペプチドの多量体中の、表２で定義されるような、多量体界面に存在する残基が、保存される、請求項１～１０のいずれか１項の粒子。
【請求項１２】
表３で定義されるような配列番号：１～９のいずれか１つのＦｃ結合界面に存在する残基が、保存される、請求項１～１１のいずれか１項の粒子。
【請求項１３】
配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換が、参照ポリペプチド中の極性残基での置換を含む、本質的に置換から成る、または置換から成る、請求項１～１２のいずれか１項の粒子。

【請求項１４】
配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換が、参照ポリペプチド中の、表４で定義されるような、ループ位置における非Ｇｌｙ／非Ｐｒｏ残基部位での極性残基における置換を含む、本質的に置換から成る、または置換から成る、請求項１～１３のいずれか１項の粒子。
【請求項１５】
配列番号：１～９のいずれか１つの参照ポリペプチドからのアミノ酸変化が、保存的アミノ酸置換である、請求項１～１４のいずれか１項の粒子。
【請求項１６】
Ｔｉｅ２抗体または二量体が、Ｔｉｅ２抗体を含み、Ｔｉｅ２抗体が、
配列番号：１１～１２、
配列番号：１３～１４、および
配列番号：１５～１６、
から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～１５のいずれか１項の粒子。
【請求項１７】
Ｔｉｅ２抗体または二量体が、二量体を含み、二量体が、配列番号：４７のアミノ酸配列を含む単量体を含み、（Ｘ）が任意選択的でありかつ存在する場合任意の好適な長さおよびアミノ酸組成のアミノ酸リンカーを含む、請求項１～１５のいずれか１項の粒子。
【請求項１８】
二量体が、配列番号：１７または１８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む単量体を含み、括弧中の残基が、任意選択的である、請求項１７の粒子。
【請求項１９】
複数のホモ多量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ四量体を含む、請求項１６～１８のいずれか１項の粒子。
【請求項２０】
複数のホモ多量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ三量体を含む、請求項１６～１８のいずれか１項の粒子。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１項の複数の粒子を含む組成物。
【請求項２２】
組成物中のすべての抗体または二量体が、同一である、請求項２１の組成物。
【請求項２３】
組成物中の抗体または二量体が、全体で、同一ではない、請求項１７の組成物。
【請求項２４】
（ａ）請求項１～２３のいずれか１項の粒子または組成物、および（ｂ）薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。
【請求項２５】
実施例に記載されるものを含むがこれらに限定されない、任意の好適な使用のための組成物または医薬組成物の使用。

【請求項２６】
細菌感染またはウイルス感染を治療する、あるいは血管機能不全に起因する疾患または症候群の発症を治療するまたは制限するのに有効な本明細書に記載の粒子、組成物または医薬組成物あるいはいずれかの実施態様または実施態様の組み合わせのある量を細菌感染またはウイルス感染あるいは血管機能不全に起因する疾患または症候群を有する対象に投与することを含む、細菌感染またはウイルス感染からの合併症を治療するための、または血管機能不全に起因する疾患または症候群を治療するまたは制限するための方法。
【請求項２７】
治療することが、敗血症、急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、急性肺障害、急性腎障害、滲出型加齢黄斑変性、開放隅角緑内障、糖尿病性網膜症、および糖尿病性腎症を含むがこれらに限定されない、血管機能不全に起因する疾患または症候群の発症を治療または制限することを含む、請求項２６の方法。
【請求項２８】
配列番号：１７～１８および４７のいずれか1つのアミノ酸配列を含むまたはアミノ酸配列から成るアミノ酸配列を含むポリペプチド。
【請求項２９】
請求項２８のポリペプチドをコードする核酸。
【請求項３０】
制御配列に制御可能に連結された請求項２９の核酸を含む発現ベクター。
【請求項３１】
請求項２８～３０のいずれか１項のポリペプチド、核酸、および／または発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項３２】
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、（ａ）ホモ多量体へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に請求項２～１５のいずれか１項においてさらに限定される、ポリペプチド、および
（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むＴｉｅ２抗体、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）、
を含むキット。
【請求項３３】
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、ポリペプチドが、（ａ）ホモ多量体へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に請求項２～１５のいずれか１項においてさらに限定される、宿主細胞；および
（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９

３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるＴｉｅ２抗体のアミノ酸配列、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）を発現できる宿主細胞、
を含むキット。
【請求項３４】
（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、
（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；または
（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；括弧中の残基が、任意選択的である（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、
ポリペプチド多量体；
および
（ｂ）Ｆｃドメインを含むα－ＴＮＦＲＳＦ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー）抗体の複数であって；
（ｉ）抗体の複数中の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み、

（ｉｉ）抗体の複数中の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、（Ａ）第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に第１のＦｃドメインを介して非共有結合され、かつ（Ｂ）第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に第２のＦｃドメインを介して非共有結合され；および
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖が、１つのＦｃドメインに非共有結合される；
α－ＴＮＦＲＳＦ抗体の複数を含み、
二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む、
粒子。
【請求項３５】
多量体が、いくつかのアミノ酸の差異を有する単量体を含む、請求項３４の粒子。
【請求項３６】
ホモオリゴマーではない多量体を含む、請求項３４または３５の粒子。
【請求項３７】
粒子中の各多量体が、同一である、請求項３４～３６のいずれか１項に記載の粒子。
【請求項３８】
各多量体中の各単量体が、同一であり、かつ各多量体が、ホモ多量体である、請求項３４の粒子。
【請求項３９】
粒子中の各ホモ多量体が、同一である、請求項３８の粒子。
【請求項４０】
複数の多量体が、配列番号：１～３から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの二量体を含む、請求項３４～３９のいずれか１項の粒子。
【請求項４１】
複数の多量体が、配列番号：４～６から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの三量体を含む、請求項３４～３９のいずれか１項の粒子。
【請求項４２】
複数の多量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの四量体を含む、請求項３４～３９のいずれか１項の粒子。
【請求項４３】
複数の多量体が、配列番号：８～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの五量体を含む、請求項３４～３９のいずれか１項の粒子。
【請求項４４】
配列番号：１～９のいずれか１つのポリペプチドの多量体中の、表２で定義されるような、多量体界面に存在する残基が、保存される、請求項３４～４３のいずれか１項の粒子。
【請求項４５】
表３で定義されるような配列番号：１～９のいずれか１つのＦｃ結合界面に存在する残基が、保存される、請求項３４～４４のいずれか１項の粒子。
【請求項４６】

配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換が、参照ポリペプチド中の極性残基での置換を含む、本質的に置換から成る、または置換から成る、請求項３４～４５のいずれか１項の粒子。
【請求項４７】
配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換が、参照ポリペプチド中の、表４で定義されるような、ループ位置での非Ｇｌｙ／非Ｐｒｏ残基での極性残基における置換を含む、本質的に置換から成る、または置換から成る、請求項３４～４６のいずれか１項の粒子。
【請求項４８】
配列番号：１～９のいずれか１つの参照ポリペプチドからのアミノ酸変化が、保存的アミノ酸置換である、請求項３４～４７のいずれか１項の粒子。
【請求項４９】
α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、ＤＲ５／ＴＲＡＩＬ－Ｒ２／ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ／ＣＤ２６２、ＣＤ４０、４－１ＢＢ、およびＴＷＥＡＫＲ（アポトーシス受容体の腫瘍壊死因子様の弱い誘導剤）／ＴＮＦＲＳＦ１２Ａ／ＣＤ２６６の１種類以上を標的にする、請求項３４～４８のいずれか１項の粒子。
【請求項５０】
α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、
配列番号：１～９および２０；
配列番号：２１および２２；
配列番号：２３および２４；
配列番号：２５および２６；
配列番号：２７および２８；
配列番号：２９；
配列番号：３０；
配列番号：３１および３２；
配列番号：３３；
配列番号：３４および３５；
配列番号：３６および３７；
配列番号：３８および３９；
配列番号：４０および４１；
配列番号：４２および４３；
配列番号：４４および４５；
配列番号：４４および４６；
配列番号：４８および４９；
配列番号：５０および５１；
配列番号：５２および５３；
配列番号：５４および５５；
配列番号：５６；
米国特許出願公開：ＵＳ２００９００７４７１１において開示されるようなＬｏｂ７／６の重鎖および軽鎖；および
米国特許出願公開：ＵＳ２０１８０９４３００において開示された重鎖および軽鎖の対、から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対（重鎖および軽鎖の両方が必要とされる場合）のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項３４～４８のいずれか１項の粒子。
【請求項５１】
複数の多量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９

４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの四量体を含む、請求項３４～５０のいずれか１項の粒子。
【請求項５２】
複数の多量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの三量体を含む、請求項３４～５０のいずれか１項の粒子。
【請求項５３】
請求項３４～５２のいずれか１項の複数の粒子を含む組成物。
【請求項５４】
組成物中のすべての抗体が、同一である、請求項５３の組成物。
【請求項５５】
組成物中の抗体が、全体で、同一ではない、請求項５３の組成物。
【請求項５６】
（ａ）請求項３４～５５のいずれか１項に記載の粒子または組成物、および（ｂ）薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物。
【請求項５７】
実施例に記載されるものを含むがこれらに限定されない、任意の好適な使用のための請求項３４～５７のいずれか１項の粒子、組成物、または医薬組成物の使用。
【請求項５８】
腫瘍細胞アポトーシスを誘導するのに有効な請求項３４～５６のいずれ１項に記載の粒子、組成物、または医薬組成物のある量を腫瘍を有する対象に投与することを含む、腫瘍を治療するための方法。
【請求項５９】
腫瘍が、対照腫瘍または閾値ＤＲ５発現レベルと比較してＤＲ５を過剰発現する、請求項５８の方法。
【請求項６０】
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドであって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、（ａ）ホモ多量体へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に請求項４４～４８のいずれか１項においてさらに限定される、ポリペプチド；および
（ｂ）任意選択的に請求項５０においてさらに限定される、Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツマブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択される抗体を含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体、
を含むキット。
【請求項６１】
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、ポリペプチドが、（ａ）ホモ多量体へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に請求項４４～４８のいずれか１項においてさらに限定される、宿主細胞；および
（ｂ）任意選択的に請求項５０においてさらに限定される、Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツ

マブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択される抗体を含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を発現できる宿主細胞、
を含むキット。
【請求項６２】
（ａ）粒子、ポリペプチド多量体、単量体、抗体、および／または二量体が、血液中または注射部位におけるインビボ半減期の延長を促進するあるいは安定性または活性の増強を促進するために他の化合物に連結されてよく、そのような結合が、共有結合または非共有結合であってよく、かつ非限定的例として、化学的架橋、ＰＥＧ化、ＨＥＳ化、ＰＡＳ化、および／またはグリコシル化を含むがこれらに限定されない方法により、達成されてよく；および／または
（ｂ）ポリペプチド多量体中の１つ以上の単量体が、インビボで半減期を増加させるあるいは血液中でまたは注射部位で増強された安定性または活性を促進するために、抗体または二量体のいずれかに共有結合で連結されてよい、
前記請求項のいずれかの粒子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連する出願の相互参照
本出願は、２０２０年６月８日付けで出願された米国仮出願第６３／０３６，０６２号；２０２０年９月３０日付けで出願された米国仮出願第６３／０８５，３５１号；２０２０年１０月７日付けで出願された米国仮出願第６３／０８８，５８６号；および２０２０年１０月７日付けで出願された米国仮出願第６３／０８８，５７６号に基づく優先権を主張するものである。その各優先出願の開示内容全体が参照として本出願に組み入れられる。
【０００２】
配列表の参照
配列表のコンピューター可読形態のものを、本出願と共に電子提出する。この配列表はその内容全体が参照として本出願に組み入れられる。この配列表は、２０２１年６月３日付けで作成した「２０－１３３０－ＷＯ－ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」というファイル名のファイルに含まれ、そのサイズは１７８ｋｂである。
【背景技術】
【０００３】
抗体は、治療薬および診断薬の用途で非常に広範に用いられる。親和性（ａｖｉｄｉｔｙ）および受容体クラスター化を増強するために抗体をオリゴマー化する試みがあるが、正しく並べられ構造的に均一な抗体結合ナノ粒子構造物を正確に形成するための方法は現在のところない。
【発明の概要】
【０００４】
第１の局面において、本開示は、以下：
（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、
（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０

％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
または
（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
括弧中の残基が、任意選択的である（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、
ポリペプチド多量体；
および
（ｂ）（ｉ）Ｆｃドメインを含む複数のＴｉｅ２受容体抗体、および／または（ｉｉ）Ｆｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）の二量体の複数であって、
（ｉ）各Ｔｉｅ２抗体または各二量体は、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み；
（ｉｉ）複数における各Ｔｉｅ２抗体または二量体は、
（Ａ）第１のＦｃドメインを介して第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に非共有結合され、
（Ｂ）第２のＦｃドメインを介して第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に非共有結合され；および
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖は、１つのＦｃドメインに非共有結合される、
複数、
を含む粒子を提供し、
粒子は、二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む。

【０００５】

一実施態様において、Ｔｉｅ２抗体または二量体は、Ｔｉｅ２抗体を含み、ここでＴｉｅ２抗体は、以下から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して

少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む：
配列番号：１１～１２、
配列番号：１３～１４、
および
配列番号：１５～１６。
【０００６】
別の一実施態様において、二量体は、配列番号：１７または１８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み、ここで括弧中の残基は、任意選択的である。
【０００７】
別の一実施態様において、粒子またはその組成物は、細菌感染またはウイルス感染、敗血症、急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、急性肺障害、急性腎障害、滲出型加齢黄斑変性、開放隅角緑内障、糖尿病性網膜症、および糖尿病性腎症を含むがこれらに限定されない、血管機能不全に起因する疾患または症候群の発症を治療するまたは制限することを含む治療することのために用いられる。
【０００８】
別の一実施態様において、本開示は、配列番号：１７～１８および４７のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、またはその配列から成るアミノ酸配列を含むポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、制御配列に制御可能に連結されたそのような核酸を含む発現ベクター、およびそのようなポリペプチド、核酸、および／または発現ベクターを含む宿主細胞を含む。
【０００９】
その他の実施態様において、本開示は、以下を含むキットを提供する：
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって；括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）；ポリペプチドは、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に、本明細書に開示の実施態様においてさらに限定されるような、ポリペプチド；および
（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合された、アンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）を含むＴｉｅ２抗体。
【００１０】
さらなる実施態様において、本開示は、以下を含むキットを提供する：
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、ポリペプチドが、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に、本明細書に開示の実施態様においてさらに限定されるようである、宿主細胞、および

（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるＴｉｅ２抗体のアミノ酸配列、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合された、アンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）を発現できる宿主細胞。

【００１１】

別の一局面において、本開示は、

（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、

（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；または

（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；括弧中の残基が、任意選択的である（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、

複数のポリペプチド多量体、および

（ｂ）Ｆｃドメインを含む複数のα－ＴＮＦＲＳＦ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー）抗体であって；

（ｉ）複数の抗体中の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み、
（ｉｉ）複数の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体が、（Ａ）第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に第１のＦｃドメインを介して非共有結合され、（Ｂ）第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に第２のＦｃドメインを介して非共有結合され；および
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖が、１つのＦｃドメインに非共有結合される、
複数のα－ＴＮＦＲＳＦ抗体；
を含む粒子を提供し、粒子は、二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む。

【００１２】

一実施態様において、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、ＤＲ５／ＴＲＡＩＬ－Ｒ２／ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ／ＣＤ２６２、ＣＤ４０、４－１ＢＢ、およびＴＷＥＡＫＲ（アポトーシス受容体の腫瘍壊死因子様の弱い誘導剤）／ＴＮＦＲＳＦ１２Ａ／ＣＤ２６６の１種類以上を標的とする。別の一実施態様において、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、以下から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対（重鎖および軽鎖の両方が必要である場合）のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む：
配列番号：１～９および２０；
配列番号：２１および２２；
配列番号：２３および２４；
配列番号：２５および２６；
配列番号：２７および２８；
配列番号：２９；
配列番号：３０；
配列番号：３１および３２；
配列番号：３３；
配列番号：３４および３５；
配列番号：３６および３７；
配列番号：３８および３９；
配列番号：４０および４１；
配列番号：４２および４３；
配列番号：４４および４５；
配列番号：４４および４６；
配列番号：４８および４９；
配列番号：５０および５１；
配列番号：５２および５３；
配列番号：５４および５５；
配列番号：５６；
米国特許出願公開：ＵＳ２００９００７４７１１において開示されるようなＬｏｂ７／６の重鎖および軽鎖；および
米国特許出願公開：ＵＳ２０１８０９４３００において開示された重鎖および軽鎖の対。

【００１３】

本開示はまた、腫瘍を治療するために粒子などを用いるための方法を提供する。

【００１４】

別の一実施態様において、本開示は以下を含むキットを提供する：
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドであって、括弧中の残基が、任意選択

的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）
、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に本明細書に開示の実施態様においてさらに限定されるような、ポリペプチド；および
（ｂ）任意選択的に本明細書においてさらに限定されるような、Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツマブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択される抗体を含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体。
【００１５】
別の一実施態様において、本開示は、以下を含むキットを提供する：
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、ポリペプチドは、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；任意選択的に本明細書に開示の実施態様においてさらに限定される、宿主細胞；および
（ｂ）任意選択的に本明細書においてさらに限定されるような、Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツマブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択される抗体を含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を発現できる宿主細胞。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】抗体ナノケージ（ＡｂＣ）の設計。Ａ、多面体配置を特定する。Ｂ、ｈＩｇＧ１の抗体ＦｃモデルをＣ２軸に対して整列する（ここでは、Ｄ２二面体を示す）。Ｃ、抗体Ｆｃ結合剤をヘリックス反復蛋白質に融合し、次いでそれをヘリックス環状オリゴマーの単量体サブユニットに融合する。全ての構成要素の組み合わせおよび構成要素境界部を取得する（下の挿入図）。Ｄ～Ｅ、所望の多面体の幾何学的配置にとって必要とされる配向で環状オリゴマー軸を良好に設置し（Ｄ）側鎖の再設計のために前方に移動する（Ｅ）三部分融合物。Ｆ、設計したＡｂＣ形成オリゴマーを、細菌で発現させ、精製し、抗体ＦｃまたはＩｇＧと構築する。
【図２】ＡｂＣの構造的特徴付け。Ａ、抗体ＦｃおよびＡｂＣ形成オリゴマーを有する、設計モデル。Ｂ、設計物およびＦｃを単一構成要素のものと混合することにより形成される構築物のＳＥＣトレースの重ね合わせ。Ｃ、電子顕微鏡像（挿入図に２Ｄ平均を有する）；すべてのデータは、設計物ｏ４２．１およびｉ５２．３（低温ＥＭ）を除き陰性染色ＥＭである。Ｄ～Ｅ、完全ヒトＩｇＧ１（無損傷の２つのＦａｂ領域を含む）と組み立てられた同じ設計された抗体ケージの、ＳＥＣ（Ｄ）およびＮＳ－ＥＭの代表的な顕微鏡写真（２Ｄクラス平均）（Ｅ）。
【図３】ＦｃによってＡｂＣの３Ｄ再構成。各ＡｂＣのコンピューター設計モデル（模式図による表現）を、ＥＭから実験的に決定された３Ｄ密度にフィットさせる。各ナノケージを、非占有対称軸に沿って（左）、およびＦｃにより占有される対称性のＣ２軸の1つを上部から観察する回転の後で（右）観察する。ｏ４２．１およびｉ５２．３からの３Ｄ再構成は、低温電子顕微鏡分析由来であり；他はすべてＮＳ－ＥＭ由来である。
【図４】ＡｂＣは、アポトーシスおよびを血管形成シグナル伝達経路を活性化する。（ＡおよびＢ）カスパーゼ－３／７は、α－ＤＲ５抗体と形成されたＡｂＣにより、活性化される（Ａ）が、ＲＣＣ４腎癌細胞において、遊離のα－ＤＲ５抗体では活性化されない（Ｂ）。（ＣおよびＤ）、α－ＤＲ５　ＡｂＣ（Ｃ）は、処置後４日で細胞生存率を低下さ

せるが、Ｆｃ　ＡｂＣ対照（Ｄ）は低下させない。（Ｅ）－ＤＲ５　ＡｂＣは、処置後６日で生存率を低下させる。（ＦおよびＧ）ｏ４２．１　α－ＤＲ５　ＡｂＣは、アポトーシスシグナル伝達のマーカーであるＰＡＲＰの切断を促進する；（Ｇ）は、ＰＢＳ対照に対する（Ｆ）の定量である。（Ｈ）アンジオポイエチン－１由来のＦドメインを、Ｆｃ（Ａ１Ｆ－Ｆｃ）に融合し、八面体（ｏ４２．１）および二十面体（ｉ５２．３）ＡｂＣへと組み立てた。（Ｉ）代表的なウエスタンブロットは、Ａ１Ｆ－Ｆｃ　ＡｂＣはｐＡＫＴおよびｐＥＲＫ１／２シグナルを増強するが、対照は増強しないことを示す。（Ｊ）（Ｉ）の定量：ｐＡＫＴ定量を、ｏ４２．１　Ａ１Ｆ－Ｆｃシグナル伝達に対し正規化する（ＰＢＳ対照ではｐＡＫＴシグナルはない）；ｐＥＲＫ１／２を、ＰＢＳに対し正規化する。（Ｋ）Ａ１Ｆ－Ｆｃ　ＡｂＣは、７２時間後に血管安定性を増大させる。（左）ＰＢＳと比較した血管安定性の定量。（右）代表的画像；スケールバー、１００ｍｍ。全てのエラーバーは、平均値±標準誤差を表す；平均値を、分散分析およびダネットの事後検定を用いて比較した（表１１および１２）。＊Ｐ≦０．０５；＊＊Ｐ≦０．０１；＊＊＊Ｐ≦０．００１；＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。

【図５】α－ＣＤ４０　ＡｂＣは、非ケージＩｇＧと比較してＣＤ４０シグナル伝達を活性化する。Ａ～Ｄ、α－ＣＤ４０で作成された八面体ＡｂＣ（Ａ）は、ＳＥＣ（Ｂ）、ＤＬＳ（Ｃ）、およびＮＳ－ＥＭ（Ｄ）にしたがい予想されるサイズおよび形状のＡｂＣを形成する。Ｅ、ＣＤ４０経路は、ＬＯＢ７／６α－ＣＤ４０八面体ナノケージによりを活性化されるが、遊離ＬＯＢ７／６により活性化されない。スケールバーは、平均値±標準偏差を表す；ｎ＝３；ＥＣ５０は、表７で報告される。

【図６】設計されたＦｃを結合する設計されたヘリックス反復。Ａ、抗体Ｆｃ（ＰＤＢ　ＩＤ：１ＤＥＥ）に係留されたヘリックス反復蛋白質ＤＨＲ７９のモデル。プロテインＡ（ＰＤＢ　ＩＤ：１Ｌ６Ｘ）からの残基を、Ｆｃとヘリックス反復蛋白質の間の界面に移植する。Ｂ、Ｆｃ結合ヘリックス反復単量体のＳＥＣトレース。Ｃ、Ｆｃ（左）またはｈＩｇＧ１（右）を伴うＦｃ結合ヘリックス反復設計物のバイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）と要約統計量（下）。

【図７】追加のα－ＤＲ５ＡｂＣ実験。Ａ、α－ＤＲ５　ＡｂＣおよびＴＲＡＩＬは、結腸直腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５においてカスパーゼ－３、７を活性化する。Ｂ～Ｃ、ｈＩｇＧ１由来のＦｃで作成したＡｂＣは、ＲＣＣ４細胞において、カスパーゼ－３、７を活性化せず（Ｂ）、または生存率を低下させない（Ｃ）。Ｄ、α－ＤＲ５　ＡｂＣは、２日後に、カスパーゼ－３、７を大幅に活性化せず（Ｄ）、または初代腎尿細管細胞株（ＲＡＭ００９）において生存率を低下させない（Ｅ）。Ｆ、切断されたＰＡＲＰは、ＲＣＣ４細胞においてα－ＤＲ５により活性化されるが、ＴＲＡＩＬ、α－ＤＲ５、およびＦｃ　ＡｂＣにより活性化されない。

【図８】追加のＡ１Ｆ－Ｆｃ　ＡｂＣ実験。Ａ～Ｂ、Ａ１Ｆ－Ｆｃでｏ４２．１およびｉ５２．３　ＡｂＣは、単分散であり、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ６カラム上のＳＥＣ（Ａ）およびＤＬＳ（Ｂ）により予想されるサイズである。ＳＥＣは、アセンブリトレースを黒色で、関連するＡｂＣ設計構成要素を薄い灰色で、およびｅＡ１Ｆ－Ｆｃを暗灰色で示す。Ｃ、８個のＡ１Ｆリガンド（「Ｈ８－Ａ１Ｆ」）を表示する対照アセンブリ物は、同程度の血管安定性増加と共にＡ１Ｆ－Ｆｃ　ＡｂＣと同様のレベルのｐＡＫＴ活性化およびｐＥＲＫ１／２活性化を生じた。；Ｈ８－Ａ１Ｆに加えて、他の全ての条件でのデータを、便宜的に図４Ｉ～Ｋから再プロットする。Ｄ、血管安定性アッセイにおけるＦｃで形成されたｏ４２．１、ｉ５２．３　ＡｂＣ、およびＨ８－Ａ１Ｆの代表的な画像；スケールバーは、１００μｍ。Ｅ、ｏ４２．１　Ａ１Ｆ－Ｆｃ　ＡｂＣを、１００％ヒト血清（ＨＳ）と４℃または３７℃で２４時間インキュベートし、１５０ｎＭでＨＵＶＥＣ細胞に添加した。ｐＡＫＴシグナルは、血清とインキュベートされたｏ４２．１　Ａ１Ｆ－Ｆｃ粒子では、増加を示さなかった。統計分析を、表１２に示す。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

本明細書に引用する全ての参照文献は、参照としてその全体が本明細書に組み入れられ

る。本願においては、他で特段に言及するのでない限り、利用される技術は複数の周知の参照文献に記載されているものであり、そのような文献としては以下が挙げられる：「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）、「遺伝子発現技術（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）」（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、第１８５巻、 Ｄ． Ｇｏｅｄｄｅｌ編集、１９９１． Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、「蛋白質精製の指針（Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｍ． Ｐ． Ｄｅｕｔｓｈｃｅｒ編集、（１９９０）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｉｎｃ．）；「ＰＣＲプロトコル：方法と応用の指針（ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ： Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）」（Ｉｎｎｉｓら、１９９０． Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、 ＣＡ）、「動物細胞の培養：基本技術マニュアル、第２版（Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ： Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ， ２ｎｄ Ｅｄ．）」（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ． １９８７． Ｌｉｓｓ、Ｉｎｃ． Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ， ＮＹ）、「遺伝子導入と発現のプロトコル（Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ）」、（ｐｐ．１０９～１２８、Ｅ．Ｊ．Ｍｕｒｒａｙ編集、Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ． Ｃｌｉｆｔｏｎ、Ｎ．Ｊ．）、およびＡｍｂｉｏｎ１９９８カタログ（Ａｍｂｉｏｎ、Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）。

【００１８】

本明細書中の単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈がそうではないことを明確に示すのでない限り複数の言及を含む。

【００１９】

本明細書中では、アミノ酸残基を以下の略号で示す：アラニン（Ａｌａ；Ａ）、アスパラギン（Ａｓｎ；Ｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ；Ｄ）、アルギニン（Ａｒｇ；Ｒ）、システイン（Ｃｙｓ；Ｃ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ；Ｅ）、グルタミン（Ｇｌｎ；Ｑ）、グリシン（Ｇｌｙ；Ｇ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ；Ｈ）、イソロイシン（Ｉｌｅ；Ｉ）、ロイシン（Ｌｅｕ；Ｌ）、リジン（Ｌｙｓ；Ｋ）、メチオニン（Ｍｅｔ；Ｍ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ；Ｆ）、プロリン（Ｐｒｏ；Ｐ）、セリン（Ｓｅｒ；Ｓ）、トレオニン（Ｔｈｒ；Ｔ）、トリプトファン（Ｔｒｐ；Ｗ）、チロシン（Ｔｙｒ；Ｙ）、およびバリン（Ｖａｌ；Ｖ）。

【００２０】

本明細書に開示のポリペプチドのすべての実施態様において、いずれのＮ末端メチオニン残基も任意選択的である（すなわち：Ｎ末端メチオニン残基は、存在してよく、または非存在であってもよい）。

【００２１】

本開示の任意の局面のあらゆる実施態様は、文脈がそうではないことを明確に示すのでない限り、組み合わせて用いることができる。

【００２２】

文脈によって明確に必要性が示されるのでない限り、本明細書の記載および「特許請求の範囲」の請求項を通じて、用語「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、およびそれに類似の言葉は、排他的または網羅的意味とは対照的に、包括的な意味とみなされるべきものである；すわなち、「を含むが、これらに限定さない」という意味とみなされるべきものである。単数形または複数形を用いる言葉もまた、それぞれ複数および単数を含む。さらに、本願においては、「本明細書中」、「上記」、および「下記」などの言葉も、本願全体を参照し、本願のいずれかの特定部分を指すものではない。

【００２３】

第１の局面において、本開示は、
（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、
（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；または
（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；
括弧中の残基が、任意選択的である（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、複数のポリペプチド多量体；および
（ｂ）複数の（ｉ）Ｆｃドメインを含むＴｉｅ２受容体抗体、および／または（ｉｉ）Ｆｃドメインに融合されるアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）の二量体であって、
（ｉ）各Ｔｉｅ２抗体または各二量体は、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み；
（ｉｉ）複数での各Ｔｉｅ２抗体または各二量体は、
（Ａ）第１のＦｃドメインを介して第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に非共有結合され、（Ｂ）第２のＦｃドメインを介して第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に非共有結合され；および
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖が、１つのＦｃドメインに非共有結合され

る、
複数のＴｉｅ２受容体抗体および／またはＦドメインの二量体、
を含む粒子を提供し、粒子は、二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む。
【００２４】
後述の実施例に示すように、Ｆｃドメインを含む本開示のＴｉｅ２受容体抗体、および／またはＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチン（Ｆドメイン）に由来するフィブロネクチン様ドメインの二量体の粒子および組成物は、ＡＫＴリン酸化およびＥＲＫ１／２リン酸化を、ベースラインを超えて有意に増加させ、細胞遊走を促進し、血管安定性を増強するので、細菌感染およびウイルス感染に起因する病的症状の治療に有用である。例えば、ＡＫＴおよびＥＲＫのリン酸化を誘導する能力は、細胞遊走および管形成を促進し、傷害後の創傷治癒を改善するために働き得、したがって感染（細菌感染およびウイルス感染など）ならびに血管機能不全に起因する疾患または症候群により特徴付けられる病態の治療において有用であり、そのような疾患または症候群としては、敗血症、急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、急性肺障害、急性腎障害、滲出型加齢黄斑変性、開放隅角緑内障、糖尿病性網膜症、および糖尿病性腎症が挙げられるが、これらに限定されない。
【００２５】
複数のポリペプチド多量体中の単量体は、配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み、括弧中の残基は、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）；ポリペプチドは、（ａ）多量体（ホモ多量体を含むが、これに限定されない）を形成でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合できる。
【００２６】

【表１】

表１：すべての設計物に用いられる配列および元の構成要素

名称	Fc結合剤（下線）	単量体（標準フォント）	オリゴマー（太字フォント）	配列
d2.3配列番号:1	DHR79	EXT6-DHR62	bex2c2_G2	(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARIAQIAFYLVLHDPSSSEVNEALKAVVKAIELAVRALEEAEKTGDPEVRELAREVVRLAVEVATATAAGENDTLRKVAERALRLAKEAAKRGDAKAAKQAAKIAKLAAANAGDEDVLKKVELVRLA**IELVEIVVENAKRKGDDDKEAAEAALAAFRIVLAAAQLAGIASLEVLELALRLIKEVVENAQREGYDIAVAAIAAAVAFAVVAVAAAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENAQREGYVILLAALAAAAAFVVVAAAAKRAGITSSETLKRAIEEIRKRVEEAQREGNDISEAARQAAEEFRKKAEELK**(GSLEHHHHHH)
d2.4配列番号:2	DHR79	EXT6-DHR62	bex2c2_G2	(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARIAQIAFYLVLHDPSSSEVNEALKAVVKAIELAVRALEAAEKTGDPRVRELAREVVKAAVDVAEAAQAGLNDKLREVAEKALRLAKEALKEGDSTAAELAAEIARLAAKLAGDEDVLKKVKLVLEAIKLV**KIVVENAKRKGDDSKEAAEAAVAAFLIVLAAAKLAGIASEEVLELAARLIKEVVENAQREGYDIAVAAIAAAVAFAVVAVAAAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENAQREGYVILLAALAAAAAFVVVAAAAKRAGITSSETLKRAIEEIRKRVEEAQREGNDISEAARQAAEEFRKKAEELK**(GSLEHHHHHH)
d2.7配列番号:3	DHR79	DHR76	bex2c2_G3	(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELAKLAQIAFYLVLHDPSAKEVNLALELIVKAIELAVRALEEAEKTGDPHARELAREIVRLAVELARAVAEAAEEAKKQGNSELAEQVARAAQVALEVIKAAITAAKQGDRKAFRAALELVLEVIKAIEEAVKQGNPKKVAEVAL**KAELIRIVVQNAANKGDDADEAVEAARAAFEIVLAAAQLAGIDSEEVLELAARLIKEVVENAQREGYDIAVAAIAAAVAFAVVAVAAAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENAVREGYVILLAALAAAAAFVVVAAAAKRAGITSSETLKRAIEEIRKRVEEAQREGNDISEAARQAAEEFRKKAEELK**(GSLEHHHHHH)
t32.4_old配列番号:4	プロテインA	EXT6-DHR70	tj04c3_int5v2	(M)FNKSQQSAFYLILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPAKSEVVAGEAAIEAARNASKKGSPETAREAVRLALELVQEAARVARKTGSTELLIAAAKLAIEVARVALKVGSPEAAREAVRAALELVQELIRAARKTGSKEVLEEAAKLALEVALVAAAVGSSEAA**AKAVATAVEALKEAGASEDEIAEIVARVISEVIRILKENGSEYKVICVSVAKIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSDYLIICVCVAIIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSSYEVIKECVQIIVLAIILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEVRRTLKESGS**(GSLEHHHHHH)
t32.4(akat.4_r1)配列番号:5	プロテインA	EXT6-DHR70	tj04c3_int5v2	(M)FNKSQQSAFYLILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSKSEVVAGEAAIEAARNALKKGSPETAREAVRLALELVQEAERQARKTGSTERLIAAAKLAIEVARVALKVGSPETAREAVRTALELVQELIRQARKTGSKEVLEEAAKLALEVAKVAAEVGSPETA**ARAVATAVEALKEAGASEDEIAEIVARVISEVIRILKESGSEYKVICRAVARIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSDYLIICVCVAIIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSSYEVIKECVQIIVLAIILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEVRRTLKES**(GSLEHHHHHH)
t32.8	プロテインA	EXT6-DHR39	tj04C3_int5v2	(M)FNKDQQSAFYEVLNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSLKILIKAAAGGDSELEEVAKRIVKELAEQGRSEKEAAKEAAELIERITRAAGGNSDLIELAVRI

配　列番号:6				VKILEEQGRSPSEAAKEAVEAIEAIVRAAGGDSEA**IKVAAEIAKTIITQKES** **GSEYKEICRTVARIVAEIVEKLKRNGASEDEIAEIVAAIIAAVILTLKLSGS** **DYLIICVCVAIIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISAVIRVLKESGSSY** **EVIKECVQIIVLAIILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEVRRTLKES**(GSLEH HHHHH)
o42.1				(M)FNKDQQSAFYEILNMPNLNEALRNGFIQLLKDDPSKSTVILTAAKVAAE LSEKIRTLKESGSSYEQIAETVAKAVAKLVEKLKRNGVSEDEIALAVALIIS AVIQTLKESGSSYEVIAEIVARIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEV IRTLKESGSSYEVIAEIVARIVAEIVEALKRSGTSEDEIAKIVARVIAEVLR TLKESGSSEEVIKEIVARIITEIKEALKRSGTSEDEIELITLMIEAALEI**AK** **LKSSGSEYEEICEDVARRIAELVEKLKRDGTSAVEIAKIVAAIISAVIAMLK**
配　列番号:7	プロテインA	EXT6-DHR9	tj10C4_G1	**ASGSSYEVICECVARIVAEIVEALKRSGTSAAIIALIVALVISEVIRTLKES** **GSSFEVILECVIRIVLEIIEALKRSGTSEQDVMLIVMAVLLVVLATLQLS**(G SLEHHHHHH)
i52.3				(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARLAQRAFYL VLHDPSSSDVNEALKLIVEAIEAAVRALEAAERAGDPELREDAREAVRLAVE AAEEVQRNPSSSTANLLLKAIVALAEALAAAANGDKEKFKKAAESALEIAKR VVEVASKEGDPEAVLEAAKVALRVAELAAKNGDKEVFKKAAESALEVAKRLV
配　列番号:8	DHR79	EXT6-DHR71	5H2LD-10_5	EVASKEGDPELVLEAAKVALRVAELAAKNGDKEVFQKAAASAVEVALRLTEV ASKEGDSELETEAAKVITRVRELASKQGDAA**VAILAETAEVKLEIEESKKRP** **QSESAKNLILIMQLLINQIRLLVLQIRMLDEQRQE**(GSLEHHHHHH)
i52.6				(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARLAQRAFYL VLHDPSSSDVNEALKLIVEAIEAAVRALEAAERTGDPKVREEARELVRRAVE AAEEVQRNPSSSEVNEKLKAIVVEIEVKVASLEAKEVTDPDKALKIAKKVIE LALEAVKENPSTEALRAVLEAVRLASEVAKRVTDPDKALKIAKLVIELALEA VKEDPSTDALRAVLEAVRLASEVAKRVTDPDKALKIAKLVLELAAEAVKEDP STDALRAAKEAERLATEVAKRVTDPKKAREIEML**VLKLQMEAILAETEEVKK**
配　列番号:9	DHR79	EXT6-DHR57	5H2LD-10_5	**EIEESKKRPQSESAKNLILIMQLLINQIRLLALQIRMLALQLQE**(GSLEHHH HHH)

【００２７】

後の実施例において詳細に記述されるように、単量体は、（表１のカラムに反映されるように）３種類のドメイン：

（１）（Ｆｃ）結合ドメイン；

（２）高次構造（ケージまたはナノ粒子とよぶこともある）を促進するためにＦｃ結合剤ドメインおよびオリゴマードメインが正しい配向で配置することを助けるヘリックスポリペプチド（単量体）；および

（３）二量体、三量体、四量体、または五量体（それぞれＣ２、Ｃ３、Ｃ４、またはＣ５周期対称）などの、多量体（ホモ多量体を含むが、これに限定されない）を形成するために、非共有結合による相互作用を介して会合できるオリゴマードメイン

を含む。

【００２８】

いくつかの実施態様において、オリゴマードメインは、非共有結合による相互作用を介して自己会合して同一のポリペプチドを有するホモ多量体を形成できる。別の一実施態様において、オリゴマードメインは、各単量体が参照ポリペプチドに対し必要とされるアミノ酸配列同一性を有する限り、非共有結合による相互作用を介して会合していくつかのアミノ酸配列の差異を有する類似のポリペプチドを有するる擬似多量体を形成できる。

【００２９】

ポリペプチド単量体は、オリゴマー形態でかつＩｇＧと組み合わされると本明細書にお

いて詳細に記載されるような所望の高次構造を形成する配向で、これらのドメインを融合する。

【００３０】

各ポリペプチド単量体は、２種類の界面：（１）Ｆｃ結合界面（表３の各ポリペプチドについて定義される）；および（２）オリゴマー形成ドメイン界面（表２の各ポリペプチドについて定義される）を有する。本開示のポリペプチドは、発現されると、オリゴマー形成ドメインを介してＣ２、Ｃ３、Ｃ４、またはＣ５対称性を有する環状オリゴマーを形成する。抗体または二量体と組み合わされると、高次のケージ様多面体構造が、Ｆｃ結合界面を有する抗体の相互作用により自発的に集合する。結果として生じる高次構造は、Ｆｃの位置でＣ２周期対称性を有し、各オリゴマー形成ドメイン界面で２、３、４、または５周期対称を有する。得られた粒子は、正確に順序づけられた構造的に均一な抗体結合ナノ粒子構造物を形成する。

【００３１】

本明細書中のＴｉｅ２「抗体」は、Ｆｃドメインを含む完全抗体および任意の機能性抗体断片（すなわち：Ｔｉｅ２受容体に選択的に結合する）への言及を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖および軽鎖を含む。他の実施態様において、抗体は、Ｔｉｅ２受容体に選択的に結合する蛋白質およびＦｃドメインを含む融合蛋白質を含んでよく、それは二量体化し、その理由はＦｃドメインが自然に二量体化するからである。他の実施態様において、抗体は、Ｔｉｅ２受容体に選択的に結合する蛋白質へと化学修飾されたＦｃ断片を含み、それは、Ｆｃドメインが自然に二量体化するので二量体化する。

【００３２】

Ｔｉｅ２二量体は、Ｆｃドメインに融合されたアンジオポイエチン（Ｆドメイン）に由来するフィブロネクチン様ドメインの単量体を２つ含む。Ｆｃドメインは自然に二量体を形成するので、２つの単量体は、二量体化する。各単量体に存在するＦドメインアミノ酸配列は、以下の配列番号：１０のアミノ酸配列を含む、もしくはその配列から成る：

【化１】

ＫＡＥＬＡＳＥＫＰＦＲＤＣＡＤＶＹＱＡＧＦＮＫＳＧＩＹＴＩＹＩＮＮＭＰＥＰＫＫ
ＶＦＣＮＭＤＶＮＧＧＧＷＴＶＩＱＨＲＥＤＧＳＬＤＦＱＲＧＷＫＥＹＫＭＧＦＧＮＰ
ＳＧＥＹＷＬＧＮＥＦＩＦＡＩＴＳＱＲＱＹＭＬＲＩＥＬＭＤＷＥＧＮＲＡＹＳＱＹＤ
ＲＦＨＩＧＮＥＫＱＮＹＲＬＹＬＫＧＨＴＧＴＡＧＫＱＳＳＬＩＬＨＧＡＤＦＳＴＫＤ
ＡＤＮＤＮＣＭＣＫＣＡＬＭＬＴＧＧＷＷＦＤＡＣＧＰＳＮＬＮＧＭＦＹＴＡＧＱＮＨ
ＧＫＬＮＧＩＫＷＨＹＦＫＧＰＳＹＳＬＲＳＴＴＭＭＩＲＰＬＤＦ（配列番号：１０）。

【００３３】

Ｔｉｅ２抗体または二量体と組み合わされると、高次のケージ様多面体構造は、Ｆｃ結合界面を有する抗体または二量体の相互作用により自発的に集合する。結果として生じる高次構造は、各Ｆｃ結合界面および各オリゴマー形成ドメイン界面で周期対称性を有する。例えば、Ｔｉｅ２抗体の重鎖および軽鎖が、Ｔｉｅ２抗体を生産するために、細胞中で共発現されてよく、これを次いで多量体と混合して本開示の粒子を形成できる。あるいは、Ｆｃドメインに融合されたＴｉｅ２結合ドメインが、細胞中で発現されてよく、これは会合して二量体を形成し、それは次いで、多量体と混合されて本開示の粒子を形成できる。

【００３４】

一実施態様では、配列番号：１～９のいずれか１つのポリペプチド単量体の多量体中の多量体界面の部位に存在し得るアミノ酸残基（表２に定義されるような）が、保存される（すなわち：参照ポリペプチド中の同じ位置でのアミノ酸残基と同一である）。

【００３５】

【表２】

表２：残基位置によるオリゴマー界面（すなわち、Ｆｃ／Ｆｃ結合剤界面ではない）での予想される界面残基

名称	界面残基の位置
	122, 185, 188, 189, 192, 195, 196, 199, 200, 202, 203, 204, 234, 235,
d2.3	238, 239, 242, 245, 246, 249, 250, 252, 253, 280, 281, 282, 284, 285,
配列番号:1	288, 292, 295, 296, 299, 303, 338
	185, 188, 189, 192, 195, 196, 199, 200, 202, 203, 235, 238, 239, 242,
d2.4	245, 246, 249, 250, 252, 253, 280, 281, 282, 284, 285, 288, 292, 295,
配列番号:2	296, 299, 303, 338
	202, 205, 206, 209, 213, 216, 217, 219, 220, 221, 251, 252, 255, 256,
d2.7	259, 262, 263, 266, 267, 269, 270, 297, 298, 299, 301, 302, 305, 309,
配列番号:3	312, 313, 316, 320, 355
	202, 203, 204, 207, 208, 252, 254, 255, 258, 261, 262, 265, 266, 269,
t32.4_old	278, 308, 312, 315, 316, 318, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 327, 328,
配列番号:4	329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 339, 340, 343
t32.4	202, 203, 204, 207, 208, 252, 254, 255, 258, 261, 262, 265, 266, 269,
(aka t.4_r1)	278, 308, 312, 315, 316, 318, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 327, 328,
配列番号:5	329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 339, 340, 343
	155, 156, 157, 160, 161, 205, 207, 208, 211, 214, 215, 218, 219, 222,
t32.8	231, 232, 261, 265, 268, 269, 271, 272, 273, 275, 276, 278, 279, 280,
配列番号:6	281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 289, 290, 292, 293, 296
	288, 289, 290, 294, 338, 339, 340, 341, 343, 344, 348, 364, 368, 369,
o42.1	372, 373, 375, 376, 379, 383, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395,
配列番号:7	396, 397, 398, 400, 401, 402, 404, 405, 408, 409, 412
	201, 205, 209, 236, 248, 252, 255, 277, 281, 282, 284, 286, 287, 289,
	290, 293, 294, 297, 300, 301, 304, 305, 307, 308, 309, 310, 311, 312,
	313, 314, 315, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327,
i52.3	328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341,
配列番号:8	343
	203, 206, 276, 282, 285, 288, 289, 292, 293, 295, 296, 299, 302, 303,
	306, 309, 310, 313, 314, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324,
i52.6	325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338,
配列番号:9	339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352

【００３６】

別の一実施態様において、表３に定義されるようなＦｃ結合界面の部位に存在する単量体中のアミノ酸残基は、保存される。

【００３７】

【表３】

表３

名称	設計に用いたFc結合剤	界面残基の位置
d2.3 配列番号:1	DHR79	4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 35, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53
d2.4 配列番号:2	DHR79	4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 35, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53
d2.7 配列番号:3	DHR79	4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 35, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53
t32.4_old 配列番号:4	プロテインＡ	2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 21, 24, 25, 28, 32
t32.4 (aka t.4_r1) 配列番号:5	プロテインＡ	2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 21, 24, 25, 28, 32
t32.8 配列番号:6	プロテインＡ	2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 21, 24, 25, 28, 32
o42.1 配列番号:7	プロテインＡ	2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 21, 24, 25, 28, 32
i52.3 配列番号:8	DHR79	4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 35, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53
i52.6 配列番号:9	DHR79	4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 35, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53

【００３８】

さらなる一実施態様において、参照単量体アミノ酸配列に対するアミノ酸置換は、参照ポリペプチド中の極性残基位置の置換を含む、本質的にそのような置換から成る、もしくはそのような置換から成る。他の実施態様において、Ｆｃ界面またはオリゴマー界面にないポリペプチド単量体の表面上の極性残基は、設計物の折りたたみおよびアセンブリ特性を維持しつつ他の極性残基で置換されてよい。

【００３９】

本明細書中の「極性の」残基は、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、およびＹである。「非極性の」残基は、Ａ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｐ、Ｗ、およびＶと定義される。

【００４０】

一実施態様において、参照単量体アミノ酸配列に対するアミノ酸置換は、参照ポリペプチド単量体中の、表４に定義されるような、ループ位置中の非Ｇｌｙ／非Ｐｒｏ残基での極性残基での置換を含む、本質的にそのような置換から成る、もしくはそのような置換から成る。

【００４１】

【表４】

表４：ｐｙｒｏｓｅｔｔａのｄｉｓｐｌａｙ＿＿ｓｅｃｓｔｒｕｃｔ（）関数を用いる、すべての列挙された設計物について予測される２次構造

名称	配列
	LLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLL
	HHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHH
	HHHHLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHH
d2.3	HHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLH
(配列番号:1)	HHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLL
	LLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLL
	HHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHH
	HHHHLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHH
d2.4	HHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLH
(配列番号:2)	HHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLL
	LLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLL
	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHH
d2.7	HHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHH
(配列番号:3)	HHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLL
	LLLHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHL
	LHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHL
	LLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHH
t32.4_old	HHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHH
(配列番号:4)	HHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLL
	LLLHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHL
	LHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHL
t32.4	LLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHH
(aka t.4_r1)	HHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHH
(配列番号:5)	HHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLL
	LLLHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHH
	LLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLL
	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHH
t32.8	HHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
(配列番号:6)	HHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLL
	LLLHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHH
	HLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
	HHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHH
	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHH
o42.1	HHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
(配列番号:7)	HHHHHHHHHLLLLLLLLLLL
	LLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHH
i52.3	HHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHH
(配列番号:8)	HLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHH

i52.6 （配列番号:9）	HHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHLLLLLLLLLLL LLLHHHHHHHHHHHHHHLLLLLHHHHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHL LHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHL LLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLL

L＝ループ、H＝ヘリックス

【００４２】

これらの実施態様の任意のさらなる一実施態様において、参照ポリペプチド単量体からのアミノ酸の変化は、保存的アミノ酸置換である。本明細書中の「保存的アミノ酸置換」は、以下を意味する：

・疎水性アミノ酸（Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ｍｅｔ、Ｓｃｅ、Ｓｍｅ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ）は、他の疎水性アミノ酸でのみ置換できる；

・体積の大きな側鎖を有する疎水性アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ）は、体積の大きな側鎖を有する他の疎水性アミノ酸でのみ置換できる；

・正に荷電した側鎖を有するアミノ酸（Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ）は、正に荷電した側鎖を有する他のアミノ酸でのみ置換できる；

・負に荷電した側鎖を有するアミノ酸（Ａｓｐ、Ｇｌｕ）は、負に荷電した側鎖を有する他のアミノ酸でのみ置換できる；および

・極性非荷電側鎖を有するアミノ酸（Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ）は、極性非荷電側鎖を有する他のアミノ酸でのみ置換できる。

【００４３】

本明細書に開示のすべての実施態様において、ポリペプチドは、意図する用途にとって適切であると考えられるような、１種類以上の付加的官能基または残基を含んでよい。本開示のポリペプチドは、Ｎ末端またはＣ末端で、またはそれらの組み合わせで付加的残基を含んでよく；これらの付加的残基は、参照ポリペプチドに対する本発明のポリペプチドの同一性％決定には含まれない。そのような残基は、意図する用途に好適な任意の残基であってよく、検出可能蛋白質またはその断片（「タグ」とよばれることもある）を含むが、これに限定されない。本明細書中の「タグ」は、一般的な検出可能部分（すなわち：蛍光蛋白質、抗体エピトープタグなど）、治療薬、精製タグ（Ｈｉｓタグなど）、リンカー、精製目的に好適なリガンド、ポリペプチドの局在を決めるリガンド、ポリペプチドに機能性を付与するペプチドドメインを含む。非限定的な実施態様において、そのような官能基は、１種類以上のポリペプチド抗原、ポリペプチド治療薬、酵素、検出可能ドメイン（例えば、蛍光蛋白質またはその断片）、ＤＮＡ結合蛋白質、転写因子などを含んでよい。一実施態様において、ポリペプチドは、アミノ末端および／またはカルボキシ末端に共有結合で連結される機能性ポリペプチドをさらに含んでよい。他の実施態様において、機能性ポリペプチドは、蛍光ポリペプチドまたは発光ポリペプチドなどの検出可能ポリペプチド、受容体結合ドメインなどを含み得るが、これらに限定されない。

【００４４】

一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：１～３から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドホモ二量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにＴｉｅ２抗体または二量体を付加することは、粒子当たり２抗体を含むＤ２二面体構造物への自発的アセンブリを

もたらす。

【００４５】

別の一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：４～６から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むホモ三量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにＴｉｅ２抗体または二量体を付加することは、粒子当たり６抗体を含むＴ３２四面体構造物への自発的アセンブリをもたらす。

【００４６】

さらなる一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ四量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにＴｉｅ２抗体または二量体を付加することは、粒子当たり１２抗体を含むＯ４２八面体構造物への自発的アセンブリをもたらす。

【００４７】

またさらなる一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：８～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ五量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにＴｉｅ２抗体または二量体を付加することは、粒子当たり３０抗体を含むＩ５２二十面体構造物への自発的アセンブリをもたらす。

【００４８】

これらの実施態様の一実施態様において、Ｔｉｅ２抗体または二量体は、Ｔｉｅ２抗体を含み、Ｔｉｅ２抗体は、下記から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む：

配列番号：１１～１２，

配列番号：１３～１４、および

配列番号：１５～１６。

【化２】

１２Ｈ８

重鎖　（Ｆｃドメインに下線を附した）

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＹＧＭＨＷＶＲＱＡ
ＰＥＫＧＬＥＷＶＡＹＩＮＳＧＳＳＴＩＴＹＡＤＴＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＦ
ＬＱＭＴＳＬＲＳＥＤＴＡＩＹＹＣＡＲＧＹＹＧＰＹＹＦＤＹＷＧＱＧＴＡＬＴＶＳＳＡ
ＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷ
ＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹ
ＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ
ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ
ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥ
ＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬ
ＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬ
ＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱ
ＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：１１）

軽鎖

ＤＩＶＭＴＱＳＨＫＦＭＳＴＳＶＧＤＲＶＳＦＴＣＫＡＳＱＮＶＧＴＡＶＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＱＳＰＫＬＬＩＹＷＡＳＳＲＨＴＧＶＰＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＴＮＶＱＳ
ＥＤＬＡＤＹＦＣＱＥＹＳＳＹＰＬＴＦＧＶＧＴＫＬＥＬＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：１２）

１３Ｈ１０

重鎖　（Ｆｃドメインに下線を附した）

ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＦＳＩＨＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＥＴＧＥＰＴＹＡＥＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＳＲＲＹＤＹＤＴＷＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＡＳ
ＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮ
ＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩ
ＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶ
ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹ
ＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤ
ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号：１３）

軽鎖

ＤＩＶＭＴＱＡＡＬＳＶＰＶＴＰＧＥＳＶＳＩＳＣＲＳＳＳＳＬＬＨＲＮＧＮＴＹＬＹＷ
ＦＬＱＲＰＧＱＳＰＱＬＬＩＹＲＭＳＮＬＡＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＡＦＴＬＲＩ
ＳＲＶＥＡＥＤＶＧＶＹＹＣＭＱＲＬＥＹＰＦＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶ
ＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱ
ＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥ
ＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：１４）

１５Ｂ８

重鎖　（Ｆｃドメインに下線を附した）

ＱＶＱＬＱＱＰＧＶＶＬＶＭＰＧＡＳＶＫＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＡＳＹＷＭＨＷＶＫＱＲ

ＰＧＱＧＬＥＷＩＧＥＩＤＰＳＤＳＹＲＮＹＮＱＫＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＶＮ
ＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＫＴＳＧＩＧＲＡＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡ
ＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷ
ＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹ
ＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ
ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ
ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥ
ＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬ
ＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬ
ＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱ
ＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：１５）

軽鎖
ＤＩＱＭＩＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＴＩＴＣＲＡＳＥＮＩＹＳＦＶＴＷＹＱＱＫＱ
ＧＫＳＰＱＬＬＶＦＮＡＫＮＬＶＥＧＶＰＳＳＦＳＧＳＧＳＧＴＱＦＳＬＫＩＤＳＬＱＰ
ＥＤＦＧＴＹＹＣＱＨＨＹＳＩＰＹＴＦＧＧＧＴＫＬＥＭＲＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：１６）

【００４９】

これらの実施態様すべての別の一実施態様において、Ｔｉｅ２抗体または二量体は、二量体を含み、二量体は、配列番号：４７のアミノ酸配列を含む単量体を含み、（Ｘ）は、任意選択的であり存在する場合任意の好適な長さおよびアミノ酸組成のアミノ酸リンカーを含む。上記のように、Ｔｉｅ２二量体は、Ｆｃドメインに融合されたアンジオポイエチン（Ｆドメイン）に由来するフィブロネクチン様ドメインの２つの単量体を含む。Ｆｃドメインは自然に二量体を形成するので、２つの単量体は、二量体を形成する。各単量体中に存在するＦドメインアミノ酸配列は、配列番号：１０のアミノ酸配列を含む、あるいはその配列から成る：

【化３】

ヒトＡｎｇ１　Ｆドメイン（Ｔｉｅ２受容体結合ドメイン；配列番号：１０）：太字のフォント
ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ：下線部

ＫＡＥＬＡＳＥＫＰＦＲＤＣＡＤＶＹＱＡＧＦＮＫＳＧＩＹＴＩＹＩＮＮＭＰＥＰＫＫ
ＶＦＣＮＭＤＶＮＧＧＧＷＴＶＩＱＨＲＥＤＧＳＬＤＦＱＲＧＷＫＥＹＫＭＧＦＧＮＰ
ＳＧＥＹＷＬＧＮＥＦＩＦＡＩＴＳＱＲＱＹＭＬＲＩＥＬＭＤＷＥＧＮＲＡＹＳＱＹＤ
ＲＦＨＩＧＮＥＫＱＮＹＲＬＹＬＫＧＨＴＧＴＡＧＫＱＳＳＬＩＬＨＧＡＤＦＳＴＫＤ
ＡＤＮＤＮＣＭＣＫＣＡＬＭＬＴＧＧＷＷＦＤＡＣＧＰＳＮＬＮＧＭＦＹＴＡＧＱＮＨ
ＧＫＬＮＧＩＫＷＨＹＦＫＧＰＳＹＳＬＲＳＴＴＭＭＩＲＰＬＤＦ（Ｘ）ＥＰＫＳＳＤＫ
ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶ
ＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶ
ＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱ
ＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥ
ＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶ
ＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：４７）

【００５０】

一実施態様において、二量体は、配列番号：１７または１８のアミノ酸配列に対して少

なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む単量体を含み、括弧中の残基は、任意選択的である。括弧中の残基は、アミノ酸リンカー（これらの例では、ＧＳに富むリンカー）、Ｈｉｓタグ、または分泌シグナル（斜体：これらは、非存在であってよく、存在してよく、あるいは他の任意の分泌シグナルで置換されてもよい）のいずれかである。

【化４】

（*METDTLLLWVLLLWVPGSTG*）（HHHHHH）（ＧＧＳ）ＫＡＥＬＡＳＥＫＰＦＲＤＣＡＤＶＹＱＡＧＦＮＫＳＧＩＹＴＩＹＩＮＮＭＰＥＰＫＫＶＦＣＮＭＤＶＮＧＧＧＷＴＶＩＱＨＲＥＤＧＳＬＤＦＱＲＧＷＫＥＹＫＭＧＦＧＮＰＳＧＥＹＷＬＧＮＥＦＩＦＡＩＴＳＱＲＱＹＭＬＲＩＥＬＭＤＷＥＧＮＲＡＹＳＱＹＤＲＦＨＩＧＮＥＫＱＮＹＲＬＹＬＫＧＨＴＧＴＡＧＫＱＳＳＬＩＬＨＧＡＤＦＳＴＫＤＡＤＮＤＮＣＭＣＫＣＡＬＭＬＴＧＧＷＷＦＤＡＣＧＰＳＮＬＮＧＭＦＹＴＡＧＱＮＨＧＫＬＮＧＩＫＷＨＹＦＫＧＰＳＹＳＬＲＳＴＴＭＭＩＲＰＬＤＦ（ＧＧＳＧＧＳ）ＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号：１７）

（*METDTLLLWVLLLWVPGSTG*）ＫＡＥＬＡＳＥＫＰＦＲＤＣＡＤＶＹＱＡＧＦＮＫＳＧＩＹＴＩＹＩＮＮＭＰＥＰＫＫＶＦＣＮＭＤＶＮＧＧＧＷＴＶＩＱＨＲＥＤＧＳＬＤＦＱＲＧＷＫＥＹＫＭＧＦＧＮＰＳＧＥＹＷＬＧＮＥＦＩＦＡＩＴＳＱＲＱＹＭＬＲＩＥＬＭＤＷＥＧＮＲＡＹＳＱＹＤＲＦＨＩＧＮＥＫＱＮＹＲＬＹＬＫＧＨＴＧＴＡＧＫＱＳＳＬＩＬＨＧＡＤＦＳＴＫＤＡＤＮＤＮＣＭＣＫＣＡＬＭＬＴＧＧＷＷＦＤＡＣＧＰＳＮＬＮＧＭＦＹＴＡＧＱＮＨＧＫＬＮＧＩＫＷＨＹＦＫＧＰＳＹＳＬＲＳＴＴＭＭＩＲＰＬＤＦ（ＧＧＳＧＧＳ）ＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（ＧＧＳＨＨＨＨＨＨ）　（配列番号：１８）

【００５１】

上記のいずれかの実施態様の特定の一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ四量体を含む。上記のいずれかの実施態様の別の特定の一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ三量体を含む。

【００５２】

別の一実施態様において、本開示は、Ｆｃドメインを含むＴｉｅ２受容体抗体、および／またはＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）の二量体を含む本明細書のいずれかの実施態様の複数の粒子を含む組成物を提供する。組成物は、例えば、本開示の方法および用途において用いられてよい

。一実施態様において、組成物中のすべての抗体または二量体は、同一である。別の一実施態様において、組成物中の抗体または二量体は、全体で、同一ではない。例えば、組成物は、Ｔｉｅ２抗体を含む粒子およびＦドメイン二量体を含む粒子を含んでよい。別の一実施態様において、組成物は、異なるＴｉｅ２抗体を含む粒子および／または異なるアミノ酸配列を有するＦドメイン二量体を含んでよい。

【００５３】

別の一実施態様において、本開示は、本明細書に記載する実施態様のＴｉｅ２粒子または組成物、および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を含む。医薬組成物は、例えば、本開示の方法および用途において、用いられてよい。

【００５４】

別の一実施態様において、本開示は、実施例に記載の用途を含むがこれらに限定されない、任意の好適な用途のためのＴｉｅ２粒子、組成物または医薬組成物の用途を提供する。一実施態様において、本開示は、細菌感染またはウイルス感染の合併症、あるいは血管機能不全に起因するいずれかの疾病または症候群を治療するための方法を提供し、細菌感染またはウイルス感染を治療するために有効な、本明細書に記載の粒子、組成物、または医薬組成物、あるいは実施態様または実施態様の組み合わせの量を、細菌感染またはウイルス感染あるいは血管機能不全に起因するいずれかの疾病または症候群を有する対象に投与することを含む。方法は、看護する医療関係者により適切であると考えられるような細菌感染またはウイルス感染、あるいは血管機能不全に起因するいずれかの疾病または症候群を治療するために用いられてよい。一実施態様において、治療することは、敗血症、急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、急性肺障害、急性腎障害、滲出型加齢黄斑変性、開放隅角緑内障、糖尿病性網膜症、および糖尿病性腎症を含むがこれらに限定されない、血管機能不全に起因する疾患または症候群の発症を治療することまたは制限することを含む。

【００５５】

別の一実施態様において、本開示は、本開示の粒子および組成物を作成するためのキットを提供する。一実施態様において、キットは、

（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、括弧中の残基は、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；かつ任意選択的に、本明細書に開示の実施態様において開示されるような、ポリペプチド；および

（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むＴｉｅ２抗体、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）

を含む。

【００５６】

この実施態様において、２種類の構成要素が組み合わされると、粒子は、Ｆｃ結合界面を有する抗体または二量体の相互作用を介して自発的に集合する。

【００５７】

別の一実施態様において、キットは：

（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基は、

任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）、ポリペプチドは、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；
かつ任意選択的に本明細書に開示の実施態様において開示されるようである、宿主細胞、および
（ｂ）配列番号：１１～１２；配列番号：１３～１４；および配列番号：１５～１６から成る群から選択される重鎖および軽鎖の対のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるＴｉｅ２抗体のアミノ酸配列、および／または配列番号：１７～１８および４７から成る群から選択されるアミノ酸配列を任意選択的に含むＦｃドメインに融合されたアンジオポイエチンに由来するフィブロネクチン様ドメイン（Ｆドメイン）を発現できる宿主細胞
を含む。

【００５８】

この実施態様において、２種類の構成要素が、宿主細胞により生産され、次いで組み合わされ、それにより粒子が、Ｆｃ結合界面を有する抗体または二量体の相互作用を介して自発的に集合し得る。

【００５９】

別の一実施態様において、本開示は、配列番号：１７～１８および４７のいずれか１種類のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのアミノ酸配列から成るポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、本明細書に開示のＴｉｅ２粒子の生産することにおいて用いられてよい。

【００６０】

別の一局面において、本開示は、配列番号：１７～１８および４７のいずれか１つのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのアミノ酸配列から成るポリペプチドをコードする核酸を提供する。核酸配列は、ゲノムまたはｃＤＮＡ形態において一本鎖または二本鎖のＲＮＡまたはＤＮＡを含んでよく、あるいはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドを含み、そのそれぞれが、化学的または生化学的に修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含んでよい。そのような核酸配列は、コードされるポリペプチドの発現の促進および／またはそのポリペプチドの精製に有用な付加的配列を含んでよく、ポリＡ配列、修飾コザック配列、ならびにエピトープタグをコードする配列、移行シグナルをコードする配列、および分泌シグナルをコードする配列、核局在化シグナルをコードする配列、および細胞膜局在シグナルをコードする配列を含むが、これらに限定されない。当業者であれば、本明細書の記述に基づきどのような核酸配列が本開示のポリペプチドをコードするかを理解するであろう。

【００６１】

別の一局面において、本開示は、制御配列に制御可能に連結された本開示の核酸を含む発現ベクターを提供する。「発現ベクター」は、遺伝子産物の発現をもたらし得る任意の制御配列に核酸コード領域または遺伝子を制御可能に連結するベクターを含む。本開示の核酸配列に制御可能に連結される「制御配列」は、核酸分子の発現をもたらすことのできる核酸配列である。制御配列は、それらがその発現を指令するように働く限り、核酸配列と連続的である必要はない。つまり、例えば、翻訳されないが転写される介在配列がプロモーター配列と核酸配列の間に存在してよく、プロモーター配列は、コード配列に「制御可能に連結された」と依然として見なされてよい。他のそのような制御配列は、ポリＡ化シグナル、終結シグナル、およびリボソーム結合部位を含むが、これらに限定されない。そのような発現ベクターは、いかなる種類のものであってよく、プラスミドおよびウイルスを基盤とする発現ベクターを含むが、これらに限定されない。哺乳動物システムにおいて本開示の核酸配列の発現を指令する目的で用いられる制御配列は、構成的であってよく（様々なプロモーターのいずれかにより指令される；ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＲＳＶ、アクチン、ＥＦを含むが、これらに限定されない）、あるいは誘導可能であってもよい（複数の

誘導可能プロモーターのいずれかにより指令される；テトラサイクリン、エクジソン、ステロイド応答性のものを含むが、これらに限定されない）。発現ベクターは、エピソームとして、あるいは宿主染色体ＤＮＡへの組み込みにより、宿主生物において複製可能でなければならない。様々な実施態様において、発現ベクターは、プラスミド、ウイルスを基盤としたベクター、または他の任意の好適な発現ベクターを含み得る。

【００６２】

さらなる一実施態様において、本開示は、本明細書に開示されるいずれかの実施態様のポリペプチド、核酸、および／または発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。様々な実施態様において、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞のいずれかであり得る。

【００６３】

別の一局面において、本開示は、

（ａ）複数のポリペプチド多量体であって、

（ｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：１のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：２のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：３のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｉｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：４のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖ）多量体中の各単量体が、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：６のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；

（ｖｉｉｉ）多量体中の各単量体が、配列番号：８のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；または

（ｉｘ）多量体中の各単量体が、配列番号：９のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含み；括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）；

複数のポリペプチド多量体および

（ｂ）Ｆｃドメインを含む複数のα－ＴＮＦＲＳＦ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー）抗体であって；（ｉ）複数の抗体中の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、第１のＦｃドメインおよび第２のＦｃドメインを含み、
（ｉｉ）複数の各α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、
（Ａ）第１のＦｃドメインを介して第１の多量体の１つのポリペプチド単量体鎖に非共有結合され、（Ｂ）第２のＦｃドメインを介して第２の多量体の１つのポリペプチド単量体に非共有結合され；および
（ｉｉｉ）各多量体の各ポリペプチド単量体鎖は、１つのＦｃドメインに非共有結合される；
複数のα－ＴＮＦＲＳＦ抗体
を含む粒子を提供し、粒子は、二面体、四面体、八面体、または二十面体対称性を含む。

【００６４】

後の実施例で示されるように、細胞表面ＴＮＦＲＳＦ受容体を標的とする本開示の粒子は、遊離の抗体またはＦｃ融合物と比較して、ＤＲ５媒介性アポトーシスにおけるシグナル伝達を促進する；かつ腫瘍細胞アポトーシスを誘導すると示された。すなわち、本組成物は、腫瘍を治療するために用いられてよい。

【００６５】

この局面において、「抗体」は、Ｆｃドメインを含むＴＮＦＲＳＦを選択的に結合する完全長および任意の機能性抗体断片；Ｆｃドメインは自然に二量体を形成するので二量体化する、ＴＮＦＲＳＦを結合する蛋白質およびＦｃドメインを含む融合蛋白質；およびＦｃドメインは自然に二量体を形成するので二量体化する、ＴＮＦＲＳＦを結合する蛋白質へと化学修飾されたＦｃ断片、への言及を含む。

【００６６】

α－ＴＮＦＲＳＦ抗体と組み合わされると、高次のケージ様多面体構造が、Ｆｃ結合界面での抗体間相互作用により自発的にアセンブルする。結果として生じる高次構造は、Ｆｃの位置でＣ２周期対称性および各ホモオリゴマー化ドメイン界面で２、３、４、または５周期対称を有する。

【００６７】

本明細書に開示のポリペプチド単量体の全ての実施態様は、本開示のこの局面に等しく適用される。すなわち、各種の非限定的な実施態様において、表２において定義されるような、多量体界面に存在する残基は、配列番号：１～９のいずれか１つのポリペプチドの多量体において保存されてよく；表３において定義されるような配列番号：１～９のいずれか１つのＦｃ結合界面に存在する残基は、保存さてよく；配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換は、参照ポリペプチド中の極性残基での置換を含んでよく、本質的にそのような置換から成てよく、あるいはそのような置換から成ってよく；配列番号：１～９のいずれか１つの参照配列に対する置換は、参照ポリペプチド中で、表４において定義されるような、ループ部位での非Ｇｌｙ／非Ｐｒｏ残基にて極性残基で置換を含んでよく、本質的にそのような置換から成ってよく、あるいはそのような置換から成ってよく；および／または配列番号：１～９のいずれか１つの参照ポリペプチドからのアミノ酸変化は、保存的アミノ酸置換であってよい。すべての実施態様において、ポリペプチド単量体は、アミノ末端および／またはカルボキシ末端に共有結合で連結される機能性ポリペプチドをさらに含んでよい。各種の非限定的な実施態様において、機能性ポリペプチドは、蛍光性ポリペプチドまたは発光性ポリペプチドなどの検出可能ポリペプチド、受容体結合ドメインなどを含むが、これらに限定されない。

【００６８】

一実施態様において、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体を生産するために、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体の重鎖および軽鎖を細胞中で共発現でき、それは次いで、その多量体と混合されて本開示の粒子を形成できる。

【００６９】

いくつかの実施態様において、各多量体のポリペプチド単量体は１００％同一であり、

多量体は、ホモオリゴマーである。他の実施態様では、多量体は、各単量体が参照ポリペプチドに対し必要とされるアミノ酸配列同一性を有する限り、いくつかのアミノ酸に差異を有する単量体を含んでよい。これらの実施態様において、多量体は、ホモオリゴマーである必要はない。この観点から、当業者であれば理解することであるが、所定の粒子中の複数の多量体は、すべてのホモオリゴマーを含んでよく、粒子がホモオリゴマーではない多量体を含んでよく、あるいはそれらの組み合わせであってもよい。同様に、粒子は、すべてのホモオリゴマーを含んでよく、各ホモオリゴマーは、同一であってよく、あるいは複数のホモオリゴマーは、２種類以上の異なるホモオリゴマーを含んでよい。

【００７０】

一実施態様において、複数の多量体は、配列番号：１～３から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの二量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を付加することは、粒子当たり２抗体を含むＤ２二面体構造物の自発的アセンブリを生じる。

【００７１】

別の一実施態様において、複数の多量体は、配列番号：４～６から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの三量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を付加することは、粒子当たり６抗体を含むＴ３２四面体構造物の自発的アセンブリを生じる。

【００７２】

さらなる一実施態様において、複数の多量体は、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの四量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を付加することは、粒子当たり１２抗体を含むＯ４２八面体構造物の自発的アセンブリを生じる。

【００７３】

一実施態様において、複数の多量体は、配列番号：８～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの五量体を含む。これらの実施態様において、列挙されるポリペプチドにα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を付加することは、粒子当たり３０抗体を含むＩ５２二十面体構造物の自発的アセンブリを生じる。

【００７４】

任意のＴＮＦＲＳＦが、粒子およびその組成物の意図される用途のために適切であるとして、標的にされてよい。様々な実施態様において、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、ＤＲ５／ＴＲＡＩＬ－Ｒ２／ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ／ＣＤ２６２、ＣＤ４０、４－１ＢＢ、およびＴＷＥＡＫＲ（アポトーシス受容体の腫瘍壊死因子様の弱い誘導剤）／ＴＮＦＲＳＦ１２Ａ／ＣＤ２６６の１種類以上を標的とする。さらなる各種の実施態様において、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体は、以下から成る群から選択される重鎖と軽鎖の対（重鎖および軽鎖の両方が必要とされる場合）のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む：

配列番号：１～９および２０；

配列番号：２１および２２；

配列番号：２３および２４；
配列番号：２５および２６；
配列番号：２７および２８；
配列番号：２９；
配列番号：３０；
配列番号：３１および３２；
配列番号：３３；
配列番号：３４および３５；
配列番号：３６および３７；
配列番号：３８および３９；
配列番号：４０および４１；
配列番号：４２および４３；
配列番号：４４および４５；
配列番号：４４および４６；
配列番号：４８および４９；
配列番号：５０および５１；
配列番号：５２および５３；
配列番号：５４および５５；
配列番号：５６；
米国特許出願公開：ＵＳ２００９００７４７１１において開示されるようなＬｏｂ７／６の重鎖および軽鎖（本参考文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる）；および
米国特許出願公開：ＵＳ２０１８０９４３００において開示される重鎖と軽鎖の対（本参考文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる）。

【００７５】

【表５】

表５：抗体配列
ＣＤ４０標的抗体
セリクレルマブ
（重鎖）
ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥ　ＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶ　ＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴ　ＧＹＹＭＨＷＶ
ＲＱＡ　ＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷ　ＩＮＰＤＳＧＧＴＮＹ
ＡＱＫＦＱＧＲＶＴＭ　ＴＲＤＴＳＩＳＴＡＹ　ＭＥＬＮＲＬＲＳＤＤ　ＴＡＶＹＹＣＡ
ＲＤＱ　ＰＬＧＹＣＴＮＧＶＣ　ＳＹＦＤＹＷＧＱＧＴ
ＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫ　ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣ　ＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡ　ＬＧＣＬＶＫＤ
ＹＦＰ　ＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ　ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰ
ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳ　ＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳ　ＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮ　ＶＤＨＫＰＳＮ
ＴＫＶ　ＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶ　ＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶ
ＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰ　ＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ　ＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤ　ＶＳＨＥＤＰＥ
ＶＱＦ　ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨ　ＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱ
ＦＮＳＴＲＦＶＶＳＶ　ＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮ　ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮ　ＫＧＬＰＡＰＩ
ＥＫＴ　ＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥ　ＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲ
ＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬ　ＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳ　ＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧ　ＱＰＥＮＮＹＫ
ＴＴＰ　ＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦ　ＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳ
ＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣ　ＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨ　ＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰ　ＧＫ　（配列番号：１～９）
（軽鎖）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳ　ＶＳＡＳＶＧＤＲＶＴ　ＩＴＣＲＡＳＱＧＩＹ　ＳＷＬＡＷＹＱ
ＱＫＰ　ＧＫＡＰＮＬＬＩＹＴ　ＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤ　ＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ　ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱ　ＡＮＩＦＰＬＴ
ＦＧＧ　ＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶ　ＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡ　ＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹ　ＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶ　ＤＮＡＬＱＳＧ
ＮＳＱ　ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤ　ＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴ
ＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫ　ＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ　ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮ　ＲＧＥＣ　（配列番号：２０）

ブレセルマブ
（重鎖）
ＱＬＱＬＱＥＳＧＰＧ　ＬＬＫＰＳＥＴＬＳＬ　ＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳ　ＳＰＧＹＹＧＧ
ＷＩＲ　ＱＰＰＧＫＧＬＥＷＩ　ＧＳＩＹＫＳＧＳＴＹ
ＨＮＰＳＬＫＳＲＶＴ　ＩＳＶＤＴＳＫＮＱＦ　ＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡ　ＤＴＡＶＹＹＣ
ＴＲＰ　ＶＶＲＹＦＧＷＦＤＰ　ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦ　ＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳ　ＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶ　ＫＤＹＦＰＥＰ
ＶＴＶ　ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧ　ＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶ　ＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫ　ＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰ　ＳＮＴＫＶＤＫ
ＲＶＥ　ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣ　ＰＡＰＥＦＥＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤ　ＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶ　ＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥ　ＤＰＥＶＱＦＮ
ＷＹＶ　ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴ　ＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴ
ＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬ　ＨＱＤＱＬＮＧＫＥＹ　ＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰ　ＳＳＩＥＫＴＩ
ＳＫＡ　ＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹ　ＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶ　ＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶ　ＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮ　ＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤ　ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲ　ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥ
ＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨ　ＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ　ＳＬＳＬＳＬＧＫ　（配列番号：２１）
（軽鎖）

ＡＩＱＬＴＱＳＰＳＳ　ＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴ　ＩＴＣＲＡＳＱＧＩＳ　ＳＡＬＡＷＹＱ
ＱＫＰ　ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＤ　ＡＳＮＬＥＳＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤ　ＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ　ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱ　ＦＮＳＹＰＴＦ
ＧＱＧ　ＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡ　ＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳ
ＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳ　ＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰ　ＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤ　ＮＡＬＱＳＧＮ
ＳＱＥ　ＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳ　ＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬ
ＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶ　ＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬ　ＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲ　ＧＥＣ　（配列番号：２２）

４－１ＢＢ標的抗体

ウレルマブ

（重鎖）

ＱＶＱＬＱＱＷＧＡＧ　ＬＬＫＰＳＥＴＬＳＬ　ＴＣＡＶＹＧＧＳＦＳ　ＧＹＹＷＳＷＩ
ＲＱＳ　ＰＥＫＧＬＥＷＩＧＥ　ＩＮＨＧＧＹＶＴＹＮ
ＰＳＬＥＳＲＶＴＩＳ　ＶＤＴＳＫＮＱＦＳＬ　ＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴ　ＡＶＹＹＣＡＲ
ＤＹＧ　ＰＧＮＹＤＷＹＦＤＬ　ＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦ　ＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳ　ＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶ　ＫＤＹＦＰＥＰ
ＶＴＶ　ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧ　ＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶ　ＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫ　ＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰ　ＳＮＴＫＶＤＫ
ＲＶＥ　ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣ　ＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤ　ＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶ　ＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥ　ＤＰＥＶＱＦＮ
ＷＹＶ　ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴ　ＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴ
ＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬ　ＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹ　ＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰ　ＳＳＩＥＫＴＩ
ＳＫＡ　ＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹ　ＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶ　ＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶ　ＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮ　ＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤ　ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲ　ＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥ
ＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨ　ＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ　ＳＬＳＬＳＬＧＫ　（配列番号：２３）

（軽鎖）

ＥＩＶＬＴＱＳＰＡＴ　ＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴ　ＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳ　ＳＹＬＡＷＹＱ
ＱＫＰ　ＧＱＡＰＲＬＬＩＹＤ　ＡＳＮＲＡＴＧＩＰＡ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤ　ＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰ　ＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱ　ＲＳＮＷＰＰＡ
ＬＴＦ　ＣＧＧＴＫＶＥＩＫＲ　ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦ
ＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧ　ＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮ　ＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷ　ＫＶＤＮＡＬＱ
ＳＧＮ　ＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳ　ＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴ
ＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫ　ＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨ　ＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳ　ＦＮＲＧＥＣ
（配列番号：　２４）

ウトミルマブ

（重鎖）

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥ　ＶＫＫＰＧＥＳＬＲＩ　ＳＣＫＧＳＧＹＳＦＳ　ＴＹＷＩＳＷＶ
ＲＱＭ　ＰＧＫＧＬＥＷＭＧＫ　ＩＹＰＧＤＳＹＴＮＹ
ＳＰＳＦＱＧＱＶＴＩ　ＳＡＤＫＳＩＳＴＡＹ　ＬＱＷＳＳＬＫＡＳＤ　ＴＡＭＹＹＣＡ
ＲＧＹ　ＧＩＦＤＹＷＧＱＧＴ　ＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫ
ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣ　ＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡ　ＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰ　ＥＰＶＴＶＳＷ
ＮＳＧ　ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰ　ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳ
ＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳ　ＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮ　ＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶ　ＤＫＴＶＥＲＫ
ＣＣＶ　ＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶ　ＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰ
ＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ　ＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤ　ＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦ　ＮＷＹＶＤＧＶ
ＥＶＨ　ＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱ　ＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶ
ＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮ　ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮ　ＫＧＬＰＡＰＩＥＫＴ　ＩＳＫＴＫＧＱ

ＰＲＥ　ＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲ　ＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬ
ＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳ　ＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧ　ＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰ　ＰＭＬＤＳＤＧ
ＳＦＦ　ＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳ　ＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣ
ＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨ　ＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰ　ＧＫ　（配列番号：２５）
（軽鎖）
ＳＹＥＬＴＱＰＰＳＶ　ＳＶＳＰＧＱＴＡＳＩ　ＴＣＳＧＤＮＩＧＤＱ　ＹＡＨＷＹＱＱ
ＫＰＧ　ＱＳＰＶＬＶＩＹＱＤ　ＫＮＲＰＳＧＩＰＥＲ
ＦＳＧＳＮＳＧＮＴＡ　ＴＬＴＩＳＧＴＱＡＭ　ＤＥＡＤＹＹＣＡＴＹ　ＴＧＦＧＳＬＡ
ＶＦＧ　ＧＧＴＫＬＴＶＬＧＱ　ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦ
ＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ　ＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤ　ＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷ　ＫＡＤＳＳＰＶ
ＫＡＧ　ＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳ　ＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬ
ＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨ　ＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥ　ＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰ　ＴＥＣＳ　（配列番号：２６）

ＤＲ５／ＴＲＡＩＬＲ２標的抗体
ドロジツマブ
（重鎖、下線を附したＦｃ領域）
ＥＶＱＬＶＱＳＧＧＧ　ＶＥＲＰＧＧＳＬＲＬ　ＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤ　ＤＹＡＭＳＷＶ
ＲＱＡ　ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧ　ＩＮＷＱＧＧＳＴＧＹ
ＡＤＳＶＫＧＲＶＴＩ　ＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹ　ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤ　ＴＡＶＹＹＣＡ
ＫＩＬ　ＧＡＧＲＧＷＹＦＤＹ　ＷＧＫＧＴＴＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦ　ＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳ　ＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶ　ＫＤＹＦＰＥＰ
ＶＴＶ　ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧ　ＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶ　ＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ　ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰ　ＳＮＴＫＶＤＫ
ＫＶＥ　ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣ　ＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫ　ＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴ　ＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶ　ＳＨＥＤＰＥＶ
ＫＦＮ　ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮ　ＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹ
ＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬ　ＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ　ＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫ　ＡＬＰＡＰＩＥ
ＫＴＩ　ＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰ　ＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥ
ＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴ　ＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤ　ＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱ　ＰＥＮＮＹＫＴ
ＴＰＰ　ＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬ　ＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲ
ＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳ　ＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹ　ＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ　Ｋ　（配列番号：２７）
（軽鎖）
ＳＥＬＴＱＤＰＡＶＳ　ＶＡＬＧＱＴＶＲＩＴ　ＣＳＧＤＳＬＲＳＹＹ　ＡＳＷＹＱＱＫ
ＰＧＱ　ＡＰＶＬＶＩＹＧＡＮ　ＮＲＰＳＧＩＰＤＲＦ
ＳＧＳＳＳＧＮＴＡＳ　ＬＴＩＴＧＡＱＡＥＤ　ＥＡＤＹＹＣＮＳＡＤ　ＳＳＧＮＨＶＶ
ＦＧＧ　ＧＴＫＬＴＶＬＧＱＰ　ＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰ
ＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫ　ＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦ　ＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫ　ＡＤＳＳＰＶＫ
ＡＧＶ　ＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮ　ＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳ
ＬＴＰＥＱＷＫＳＨＫ　ＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧ　ＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴ　ＥＣＳ　（配列番号：２８）

ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ
重鎖のみ必要とされる、下線を附したＦｃ領域
ＱＲＶＡＡＨＩＴＧＴＲＧＲＳＮＴＬＳＳＰＮＳＫＮＥＫＡＬＧＲＫＩＮＳＷＥＳＳＲＳ
ＧＨＳＦＬＳＮＬＨＬＲＮＧＥＬＶＩＨＥＫＧＦＹＹＩＹＳＱＴＹＦＲＦＱＥＥＩＫＥＮ
ＴＫＮＤＫＱＭＶＱＹＩＹＫＹＴＳＹＰＤＰＩＬＬＭＫＳＡＲＮＳＣＷＳＫＤＡＥＹＧＬ
ＹＳＩＹＱＧＧＩＦＥＬＫＥＮＤＲＩＦＶＳＶＴＮＥＨＬＩＤＭＤＨＥＡＳＦＦＧＡＦＬ
ＶＧＧＳＧＳＧＮＧＳＲＶＡＡＨＩＴＧＴＲＧＲＳＮＴＬＳＳＰＮＳＫＮＥＫＡＬＧＲＫ

ＩＮＳＷＥＳＳＲＳＧＨＳＦＬＳＮＬＨＬＲＮＧＥＬＶＩＨＥＫＧＦＹＹＩＹＳＱＴＹＦ
ＲＦＱＥＥＩＫＥＮＴＫＮＤＫＱＭＶＱＹＩＹＫＹＴＳＹＰＤＰＩＬＬＭＫＳＡＲＮＳＣ
ＷＳＫＤＡＥＹＧＬＹＳＩＹＱＧＧＩＦＥＬＫＥＮＤＲＩＦＶＳＶＴＮＥＨＬＩＤＭＤＨ
ＥＡＳＦＦＧＡＦＬＶＧＧＳＧＳＧＮＧＳＲＶＡＡＨＩＴＧＴＲＧＲＳＮＴＬＳＳＰＮＳ
ＫＮＥＫＡＬＧＲＫＩＮＳＷＥＳＳＲＳＧＨＳＦＬＳＮＬＨＬＲＮＧＥＬＶＩＨＥＫＧＦ
ＹＹＩＹＳＱＴＹＦＲＦＱＥＥＩＫＥＮＴＫＮＤＫＱＭＶＱＹＩＹＫＹＴＳＹＰＤＰＩＬ
ＬＭＫＳＡＲＮＳＣＷＳＫＤＡＥＹＧＬＹＳＩＹＱＧＧＩＦＥＬＫＥＮＤＲＩＦＶＳＶＴ
ＮＥＨＬＩＤＭＤＨＥＡＳＦＦＧＡＦＬＶＧＧＰＧＳＳＳＳＳＳＳＧＳＣＤＫＴＨＴＣＰ
ＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳ
ＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＳＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴ
ＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱ
ＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰ
ＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶ
ＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：２９）

ＫＭＴＲ２

Ｈ１ｓｃＦｖ　重鎖　（軽鎖を必要としない、下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＳＴＴＶＡＷＤＷＩＲ
ＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＥＹＡＶＳＶＫＳＲＩＴＩＮＶＤＴＳＫＮ
ＱＩＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＰＤＡＧＲＧＡＦＤＩＷＧＱＧＴＴＶＴ
ＳＰＬＲＷＧＲＦＧＷＲＧＬＧＲＧＷＬＲＳＰＶＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳ
ＣＲＡＳＱＳＶＳＳＳＨＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＳＲＡＴＧＩＰＤＲ
ＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＲＳＮＷＰＰＲＡＶＦＧ
ＱＧＴＲＬＥＩＫＧＧＳＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦ
ＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧ
ＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣ
ＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮ
ＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤ
ＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬ
ＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：３０）

Ｈ１重鎖　（Ｌ１との対、下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＳＴＴＶＡＷＤＷＩＲ
ＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＥＹＡＶＳＶＫＳＲＩＴＩＮＶＤＴＳＫＮ
ＱＩＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＰＤＡＧＲＧＡＦＤＩＷＧＱＧＴＴＶＴ
ＳＰＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴ
ＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴ
ＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲ
ＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰ
ＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨ
ＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：３１）

Ｌ１軽鎖　（Ｈ１との対）
ＬＲＳＰＶＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＳＨＬＡＷＹＱＱ
ＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＳＲＡＴＧＩＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬ
ＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＲＳＮＷＰＰＲＡＶＦＧＱＧＴＲＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦ
ＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳ

ＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶ
ＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：３２）

Ｈ６ｓｃＦｖ重鎖（軽鎖を必要としない、下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＧＲＶＱＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＮＮＮＡＡＷＹＷＩＲ
ＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＫＳＲＩＴＩＳＰＤＴＳＫＮ
ＱＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＤＧＮＳＹＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ
ＳＳＧＩＬＲＷＧＲＦＧＷＲＧＬＧＲＧＷＬＥＩＶＬＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴ
ＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＧＹＶＳＷＹＲＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＴＲＡＴＧＩＰ
ＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＨＱＹＧＳＳＰＮＴＹＧ
ＱＧＴＫＶＧＩＫＧＧＳＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦ
ＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧ
ＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣ
ＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮ
ＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤ
ＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬ
ＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：３３）

Ｈ６重鎖（Ｌ６との対、下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＧＲＶＱＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＮＮＮＡＡＷＹＷＩＲ
ＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＫＳＲＩＴＩＳＰＤＴＳＫＮ
ＱＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＤＧＮＳＹＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ
ＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴ
ＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴ
ＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮ
ＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲ
ＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰ
ＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨ
ＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：３４）

Ｌ６軽鎖　（Ｈ６との対）
ＬＥＩＶＬＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＧＹＶＳＷＹＲＱ
ＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＴＲＡＴＧＩＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬ
ＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＨＱＹＧＳＳＰＮＴＹＧＱＧＴＫＶＧＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦ
ＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮ
ＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨ
ＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：３５）

１Ｅ６２
重鎖、下線を附したＦｃ領域
ＥＶＱＬＶＱＳＧＧＧＶＥＲＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＧＭＳＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＮＷＮＧＧＳＴＧＹＡＤＳＶＫＧＲＶＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＩＬＧＡＧＲＧＷＹＦＤＬＷＧＫＧＴＴＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ
ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ
ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ

KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK （配列番号：３６）

軽鎖、下線を附したＦｃ領域
ＳＥＬＴＱＤＰＡＶＳＶＡＬＧＱＴＶＲＩＴＣＱＧＤＳＬＲＳＹＹＡＳＷＹＱＱＫＰＧＱ
ＡＰＶＬＶＩＹＧＫＮＮＲＰＳＧＩＰＤＲＦＳＧＳＳＳＧＮＴＡＳＬＴＩＴＧＡＱＡＥＤ
ＥＡＤＹＹＣＮＳＲＤＳＳＧＮＨＶＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬＧＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰ
ＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＳＳＰＶＫＡＧＶ
ＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＫＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧ
ＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣ （配列番号：３７）

コナツムマブ／ＡＭＧ ６５５
コナツムマブ ／／ ＡＭＧ６５５重鎖 （下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＳＧＤＹＦＷＳＷＩＲ
ＱＬＰＧＫＧＬＥＷＩＧＨＩＨＮＳＧＴＴＹＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴ ＩＳＶＤＴＳＫＫＱ
ＦＳＬＲＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＤＲＧＧＤＹＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴ
ＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＤＫＹＦＰＥＰＶ
ＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧ
ＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫ ＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥ
ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶ
ＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷ
ＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰ
ＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴ
ＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＬＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨ
ＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ （配列番号：３８）

コナツムマブ／ＡＭＧ６５５軽鎖
ＥＩＶＬＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＧＩＳＲＳＹＬＡＷＹＱＱＫ
ＰＧＱＡＰＳＬＬＩＹＧＡＳＳＲＡＴＧＩＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥ
ＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＦＧＳＳＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ （配列番号：３９）

ＴＷＥＡＫＲ標的抗体
エナバツズマブ
（重鎖、下線を附したＦｃ領域）
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧ ＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬ ＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳ ＳＹＷＭＳＷＶ
ＲＱＡ ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＥ ＩＲＬＫＳＤＮＹＡＴ
ＨＹＡＥＳＶＫＧＲＦ ＴＩＳＲＤＤＳＫＮＳ ＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡ ＥＤＴＡＶＹＹ
ＣＴＧ ＹＹＡＤＡＭＤＹＷＧ ＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡ
ＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬ ＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧ ＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤ ＹＦＰＥＰＶＴ
ＶＳＷ ＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨ ＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧ
ＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶ ＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹ ＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮ ＴＫＶＤＫＫＶ
ＥＰＫ ＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰ ＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ
ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ ＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥ ＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨ ＥＤＰＥＶＫＦ
ＮＷＹ ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫ ＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳ
ＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶ ＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥ ＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬ ＰＡＰＩＥＫＴ

ＩＳＫ　ＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶ　ＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭ
ＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬ　ＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡ　ＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥ　ＮＮＹＫＴＴＰ
ＰＶＬ　ＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳ　ＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱ
ＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭ　ＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱ　ＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号：４０）

（軽鎖）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳ　ＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴ　ＩＴＣＲＡＳＱＳＶＳ　ＴＳＳＹＳＹＭ
ＨＷＹ　ＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬ　ＬＩＫＹＡＳＮＬＥＳ
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧ　ＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳ　ＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹ　ＹＣＱＨＳＷＥ
ＩＰＹ　ＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩ　ＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦ
ＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫ　ＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬ　ＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶ　ＱＷＫＶＤＮＡ
ＬＱＳ　ＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱ　ＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳ
ＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹ　ＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶ　ＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴ　ＫＳＦＮＲＧＥ
Ｃ　（配列番号：４１）

ダセツズマブ　（ＷＯ２０１６０６９９１９）
ｈＳ２Ｃ６重鎖（配列番号：４２）

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

ｈＳ２Ｃ６　軽鎖　（配列番号：４３）

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

ルカツムマブ： ＷＯ２０１２０７５１１１）

ＨＣＤ１２２ヒト抗ＣＤ４０抗体の軽鎖 （配列番号：４４）

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
20 25 30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

ＨＣＤ１２２ヒト抗ＣＤ４０抗体の重鎖 （配列番号：４５）

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

ＨＣＤ１２２ヒト抗ＣＤ４０抗体の変異体の重鎖　（配列番号：４６）

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

```
        35                  40                  45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65                  70                  75                  80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
                85                  90                  95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
        115                 120                 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
    130                 135                 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
                165                 170                 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
            180                 185                 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
        195                 200                 205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
    210                 215                 220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225                 230                 235                 240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
                245                 250                 255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            260                 265                 270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        275                 280                 285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    290                 295                 300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305                 310                 315                 320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                325                 330                 335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        355                 360                 365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    370                 375                 380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385                 390                 395                 400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                405                 410                 415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
            420                 425                 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
```

435 440 445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

ＧＩＴＲ標的抗体

【化５】

ＡＭＧ２２８重鎖　（下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＶＡＳＧＦＴＦＳＳＹＧＭＨＷＩＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＶＩＷＹＥＧＳＮＫＹＹＡＥＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＧＲＬＧＬＤＹＹＳＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴ
ＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶ
ＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧ
ＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬ
ＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫ
ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬ
ＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳ
ＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴ
ＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮ
ＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：４８）

ＡＭＧ２２８軽鎖
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＲＬＩＹＡＴＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＬＱＨＮＴＹＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：４９）

ＴＲＸ５１８重鎖　（下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＴＬＫＥＳＧＰＧＩＬＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＳＦＳＧＦＳＬＳＴＳＧＭＧＶＧＷＩＲ
ＱＰＳＧＫＧＬＥＷＬＡＨＩＷＷＤＤＤＫＹＹＮＰＳＬＫＳＱＬＴＩＳＫＤＴＳＲＮＱＶ
ＦＬＫＩＴＳＶＤＴＡＤＡＡＴＹＹＣＡＲＴＲＲＹＦＰＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡ
ＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷ
ＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹ
ＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ
ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ
ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥ
ＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬ
ＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬ
ＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱ
ＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　（配列番号：５０）

ＴＲＸ５１８軽鎖
ＤＩＶＭＴＱＳＱＫＦＭＳＴＳＶＧＤＲＶＳＶＴＣＫＡＳＱＮＶＧＴＮＶＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＱＳＰＫＡＬＩＹＳＡＳＹＲＹＳＧＶＰＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＮＮＶＨＳ
ＥＤＬＡＥＹＦＣＱＱＹＮＴＤＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　（配列番号：５１）

ＭＫ－４１６６　重鎖　（下線を附したＦｃ領域）
ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＳＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＳＩＳＳＧＧＴＴＹＹＰＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬ
ＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＶＧＧＹＹＤＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳ
ＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮ

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK （配列番号：５２）

MK－４１６６軽鎖
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASESVDNYGVSFMNWY
QQKPGQAPRLLIYAASNQGSGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQTKEVTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号：５３）

BMS－９８６１５６ 重鎖 （下線を附したＦｃ領域）
QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGWIR
QPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSQLTISKDTSRNQV
FLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK （配列番号：５４）

BMS－９８６１５６ 軽鎖
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP
GQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVHS
EDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC （配列番号：５５）

ｓｃＧＩＴＲＬ－Ｆｃ（重鎖のみ必要とされる、下線を附したＦｃ領域）
ETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ
NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKS
KIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIILLA
NPQFISGSGSGNGSETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPP
CVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRL
YKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQ
VLKNNTYWGIILLANPQFISGSGSGNGSETAKEPCMAKFG
PLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAP
NANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELH
VGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIILLANPQFISGSSSSS

SSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号：
５６）

【００７６】
上記のいずれかの実施態様の特定の一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：７のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ四量体を含む。上記のいずれかの実施態様の別の特定の一実施態様において、複数のホモ多量体は、配列番号：５のアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモ三量体を含む。

【００７７】
別の一実施態様において、本開示は、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体を含む本明細書に記載の実施態様の複数の粒子を含む組成物を提供する。組成物は、例えば、本開示の方法および用途において利用されてよい。一実施態様において、組成物中のすべての抗体は、同一である。別の一実施態様において、抗体は、全体として、同一ではない。

【００７８】
別の一実施態様において、本開示は、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体粒子または本明細書に記載のいずれかの実施態様の組成物、および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を含む。医薬組成物は、例えば、本開示の方法および用途において利用されてよい。

【００７９】
別の一実施態様において、本開示は、実施例に記載のものを含むがこれらに限定されない、任意の好適な用途のためのα－ＴＮＦＲＳＦ抗体粒子、組成物または医薬組成物の用途を提供する。一実施態様において、本開示は、腫瘍を治療するための方法であって、腫瘍細胞アポトーシスを誘導するために有効な本明細書に記載の粒子、組成物、または医薬組成物、あるいはいずれかの実施態様または実施態様の組み合わせのある量を、腫瘍を有する対象に投与することを含む、方法を提供する。一実施態様において、腫瘍は、対照腫瘍または閾値ＤＲ５発現レベルと比較してＤＲ５を過剰発現する。後述の実施例に記載されるように、細胞表面ＴＮＦＲＳＦ受容体を標的とする本開示の粒子は、ＤＲ５媒介性アポトーシスにおいて遊離の抗体またはＦｃ融合物と比較してシグナル伝達を促進し、腫瘍細胞アポトーシスを誘導すると示された。すなわち、本組成物は、腫瘍を治療するために用いられてよい。

【００８０】
別の一実施態様において、本開示は、本開示のα－ＴＮＦＲＳＦ抗体粒子および組成物を作成するためのキットを提供する。一実施態様において、キットは、
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドであって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）；（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；かつ任意選択的に、本明細書に開示の実施態様においてさらに限定されるような、ポリペプチド、および
（ｂ）Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツマブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択されるを含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体であって、任意選択的に上記の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列によりさらに特定される、α－ＴＮＦＲＳＦ抗体
を含む。

【００８１】
この実施態様において、２種類の構成要素が組み合わされると、粒子は、Ｆｃ結合界面を有する抗体または二量体の相互作用を介して自発的にアセンブルする。

【００８２】
別の一実施態様において、キットは
（ａ）配列番号：１～９から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む１種類以上のポリペプチドを発現できる宿主細胞であって、括弧中の残基が、任意選択的であり（すなわち：パーセント同一性の要件において考慮されない）；ポリペプチドが、（ａ）ホモ多量体化へと集合でき、かつ（ｂ）ＩｇＧ抗体の定常領域に結合でき；
任意選択的に本明細書に開示の実施態様においてさらに限定されるようである、宿主細胞、および
（ｂ）任意選択的に上記の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列によりさらに特定される、Ｌｏｂ７／６、ルカツムマブ、ダセツズマブ、セリクレルマブ、ブレセルマブ、ウレルマブ、ウトミルマブ、ドロジツマブ、ｓｃＴＲＡＩＬ－Ｆｃ、ＫＭＴＲ２、１６Ｅ２、およびコナツムマブ（ＡＭＧ６５５ともよばれる）から成る群から選択される抗体を含むα－ＴＮＦＲＳＦ抗体を発現できる宿主細胞
を含む。
【００８３】
この実施態様において、２種類の構成要素が、宿主細胞により生産され、次いで組み合わされ、それにより粒子が、Ｆｃ結合界面を有する抗体または二量体の相互作用を介して自発的にアセンブリする。
【００８４】
実施例に記載されるように、粒子は、核酸または蛋白質カーゴのパッケージングに用いることのできる実質的内部容積を有する。すなわち、他の実施態様と組み合わされてよい別の一実施態様において、粒子は、粒子内部容積中にカーゴを含む。任意の好適なカーゴが、粒子内にパッケージされてよく、意図される目的のために有用な核酸またはポリペプチドを含むがこれらに限定されない。
【００８５】
本明細書に記載のポリペプチドは、化学的に合成されてよく、あるいは組換え技術により発現されてよい。粒子、ポリペプチド多量体、単量体、抗体、および／または二量体は、インビボ半減期の延長を促進するため、あるいは血液中または注射部位における安定性または活性の増強を促進するために、他の化合物に連結されてよい。そのような結合は、当業者に理解されるような共有結合または非共有結合であってよく、非限定的例として、化学的架橋、ＰＥＧ化、ＨＥＳ化、ＰＡＳ化、および／またはグリコシル化を含むがこれらに限定されない方法により、達成される。
【００８６】
別の一実施態様において、ポリペプチド多量体中の１つ以上の単量体は、インビボ半減期を延長するため、あるいは血液内または注射部位における安定性または活性の増強を促進するために、抗体または二量体のいずれかに共有結合で連結されてよい。
【００８７】
本開示の医薬組成物は、（ａ）本明細書に記載のいずれかの実施態様の粒子または組成物、または実施態様の組み合わせ、および（ｂ）薬学的に許容され得る担体、を含んでよい。医薬組成物は、（ａ）凍結乾燥保護剤；（ｂ）界面活性剤；（ｃ）容積増加性物質；（ｄ）等張化剤；（ｅ）安定化剤；（ｆ）防腐剤、および／または（ｇ）緩衝液、をさらに含んでよい。いくつかの実施態様において、医薬組成物中の緩衝液は、Ｔｒｉｓ緩衝液、ヒスチジン緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、または酢酸緩衝液である。組成物はまた、凍結乾燥保護剤、例えば、スクロース、ソルビトールまたはトレハロースを含んでよい。特定の実施態様において、組成物は、防腐剤、例えば、塩化ベンザルコニウム、ベンゼトニウム、クロルヘキシジン、フェノール、ｍ－クレゾール、ベンジルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、ｏ－クレゾール、ｐ－クレゾ

ール、クロロクレゾール、硝酸フェニル水銀、チメロサール、安息香酸、およびその様々な混合物を含む。他の実施態様において、組成物は、グリシンのような、容積増加性物質を含む。さらに別の実施態様において、組成物は、界面活性剤、例えば、ポリソルベート－２０、ポリソルベート－４０、ポリソルベート－６０、ポリソルベート－６５、ポリソルベート－８０ポリソルベート－８５、ポロクサマー－１８８、ソルビタンラウリン酸モノエステル、ソルビタンパルミチン酸モノエステル、ソルビタンステアリン酸モノエステル、ソルビタンオレイン酸モノエステル、ソルビタン三ラウリン酸エステル、ソルビタン三ステアリン酸エステル、ソルビタン三オレイン酸エステル、またはそれらの組み合わせを含む。組成物はまた、等張化剤、例えば、製剤をヒト血液と実質的に等張または等浸透圧にする化合物も含んでよい。等張化剤の例としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、メチオニン、マンニトール、デキストロース、イノシトール、塩化ナトリウム、アルギニンおよびアルギニン塩酸塩が挙げられる。他の実施態様において、組成物は、安定化剤、例えば、凍結乾燥形態または液体形態で、ナノ構造の化学的および／または物理的な不安定性を実質的に防止する、あるいは軽減する分子をさらに含む。安定化剤の例としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、イノシトール、塩化ナトリウム、メチオニン、アルギニン、およびアルギニン塩酸塩が挙げられる。

【００８８】

粒子または組成物は、組成物中で活性物質のみであってよく、あるいは組成物は、意図される用途に好適な１種類以上の他の物質をさらに含んでよい。

【００８９】

本明細書中の「治療する（ｔｒｅａｔ）」または「治療する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」は、以下の１つ以上を達成することを意味する：

（ａ）対象において障害の症状の重症度を軽減すること；（ｂ）対象において症状の増悪を制限すること；（ｃ）生存を延長させること；（ｄ）症状の持続時間を短縮すること；（ｅ）発症を制限する、あるいは予防すること；および（ｆ）入院の必要性を減らす、および／または障害の治療のための入院期間を短縮すること。

【００９０】

本明細書中の「制限する（こと）」は、そのような障害のリスクを有する対象において、障害の発症を制限することを意味する。

【００９１】

本明細書中の「有効量」は、障害を治療する、および／または障害の発症を制限するために有効な、粒子、組成物、または医薬組成物の量を指す。本明細書に記載のいずれかの実施態様の粒子、組成物、または医薬組成物は典型的には、上に開示されたものなどの、医薬組成物として製剤化され、薬学的に許容され得る従来の担体、アジュバント、および担体を含む用量単位の製剤として、経口、非経口、吸入噴霧によって、直腸に、または局所に、などの任意の好適な経路で投与できる。本明細書中の用語「非経口」は、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、胸骨内、腱内、髄腔内、頭蓋内、胸腔内、点滴技術、または腹腔内を含む。ポリペプチド組成物はまた、ミクロスフェア、リポソーム、免疫刺激複合体（ＩＳＣＯＭ）、または好適な組織（血液など）に導入される他の微粒子送達システムあるいは持続性放出性製剤を介して投与されてよい。用量レジメンを、所望の最適応答（例えば、治療応答または予防上の応答）を提供するために調整できる。好適な用量範囲は、例えば、０．１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ体重の粒子、組成物、またはその医薬組成物であってよい。組成物は、単一ボーラスで送達でき、あるいは介護する医療関係者により決定されるように、２回以上（例えば、２回、３回、４回、５回、またはそれより多い）の投与であってよい。

【００９２】

実施例

明確な構造を有する対称性構築物への任意の抗体のアセンブリを駆動する蛋白質の設計を行った。本発明者らは、対称性蛋白質構築物が、標的構造の二回回転軸上に抗体の対称軸を配置すること、および正しい配向で抗体を保持する第２の蛋白質を設計することによ

り、２回回転軸対称蛋白質であるＩｇＧ抗体から構築できると推論した。多くの異なる抗体に対し奏功する形態を企図したので、ＩｇＧの結晶化可能な定常断片（Ｆｃ）ドメインとＦｃ結合性ヘリックス束プロテインＡの間の相互作用をナノ粒子界面として選択した。

【００９３】

抗体ケージ設計についての一般的なコンピューター計算法

所望の構造のために正しい相対的配向でＩｇＧを保持する正しい幾何学的配置を有する、Ｆｃ結合界面で終わるホモオリゴマーを設計するために、本発明者らは、３種類の蛋白質構成要素を計算機的に互いに融合した：Ｆｃ結合剤、単量体、およびホモオリゴマー。Ｆｃ結合剤は、抗体とナノケージ形成設計物の間で第１のナノケージ界面を形成し；ホモオリゴマーは、設計蛋白質鎖間で第２のナノケージ界面を形成し；ならびに、単量体は、正しい配向で２つの界面を連結して、所望のナノ材料を形成する。

【００９４】

プロテインＡ自体よりも可用性の高いＦｃ結合構成要素を作成するために、設計ヘリックス反復蛋白質にプロテインＡの界面残基を移植することにより、第２のＦｃ結合構成要素を設計した（図６）。抗体ナノケージ（以降、抗体ケージをＡｂＣと略称する）を形成すると予測される設計物を創出するために、これらの２種類のＦｃ結合蛋白質、４２種類のデノボ設計ヘリックス反復蛋白質単量体、および１～３個のホモオリゴマー（２種類のＣ２、３種類のＣ３、１種類のＣ４、および１種類のＣ５）から成るライブラリーを利用した。平均で約１５０残基が、蛋白質－蛋白質界面に関与するすべての位置を避けて、蛋白質構成要素当たり融合のために利用可能であり、おおよそ１０７種類の可能な三部分（Ｆｃ結合剤／単量体／ホモオリゴマー）融合物をもたらした。これらの三部分融合物のそれぞれについて、ホモオリゴマー内界面とＦｃ結合界面の間の剛体変換を、その３種類の構成要素のそれぞれの形状、ならびに単一サブユニットへとそれらを連結する「境界部」の位置および幾何学的配置により決定する。

【００９５】

二面体、四面体、八面体、および二十面体ＡｂＣの形成に必要となる正味の剛体変換を有するものを同定するために、本発明者らの構成要素ライブラリーからすべての可能な融合物を迅速に取得する最近公表されたコンピューター計算プロトコル（ＷＯＲＭＳ）を用いた（２０、２１）。最終的なナノケージ構造を説明するために、構成要素の点群対称性および周期対称性を要約する命名規則に従った。例えば、Ｔ３２アセンブリは、四面体点群対称性を有し、Ｃ３周期対称性抗体結合性の設計オリゴマー、およびＣ２周期対称性抗体Ｆｃから作成される。抗体二量体はすべての構造において二回回転軸に沿って配置する一方で、設計された構成要素は、Ｄ２二面体構造では第２のホモ二量体であり；Ｔ３２四面体構造、Ｏ３２八面体構造、およびＩ３２二十面体構造ではホモ三量体であり；Ｏ４２八面体構造ではホモ四量体であり；かつＩ５２二十面体構造ではホモ五量体である。

【００９６】

融合物を作成するために、プロトコルはまず、ＦｃとＦｃ結合剤蛋白質のモデルを特定された構造のＣ２軸に沿って整列させる（図１ａ～ｂ）。Ｆｃ結合剤を次いで、単量体に融合し、これを今度はホモオリゴマーに融合する。剛体ヘリックス融合物が、各構成要素からのアルファヘリックス２次構造中の残基を重ね合わせることにより作成される；得られた融合構造物において、融合部位で１つの構成要素鎖が終了しもう一方が始まり、新規の連続するαヘリックスを形成する（図１ｃ）。適切なナノケージ・アセンブリが起こるために、抗体の二回回転軸とホモオリゴマーの対称軸が構造中央部において正確な角度で交差するように融合を行う（図１ｄ）。Ｄ２二面体、Ｔ３２四面体、Ｏ３２またはＯ４２八面体、およびＩ３２またはＩ５２二十面体のナノケージを形成するために、必要とされるそれぞれの交角は、９０．０°、５４．７°、３５．３°、４５．０°、２０．９°、および３１．７°である。最大でそれぞれ５．７°および０．５Åの理想的な構造からの角度偏位および距離偏位を許容した（「方法」を参照のこと）。候補融合モデルを、融合境界部まわりの接触数（構造物の剛性を評価するため）および骨格原子間の衝突に基づきさらに篩い分けした。次いで、新たに形成される構成要素境界部付近のアミノ酸同一性お

よびコンフォメーションを、Ｒｏｓｅｔｔａ（登録商標）のＳｙｍＰａｃｋＲｏｔａｍｅｒｓＭｏｖｅｒを用いて最適化して、アセンブリに必要とされる剛性融合体の幾何学的配置を維持した（図１ｅ）。配列設計後に、実験的特徴付けのために、ＡｂＣを形成すると予測される６種類のＤ２二面体、１１種類のＴ３２四面体、４種類のＯ３２八面体、２種類のＯ４２八面体、１４種類のＩ３２二十面体、および１１種類のＩ５２二十面体設計物を、選択した（図１ｆ）。

【００９７】

構造的特徴付け

Ｃ末端に６×ヒスチジンタグを付加した設計蛋白質配列をコードする合成遺伝子を、大腸菌で発現させた。設計物を、固定化金属親和性クロマトグラフィーを用いて澄明化溶解物（ＩＭＡＣ）から精製し、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を、最終精製工程として用いた。すべての幾何学的配置にわたり、４８種類のＡｂＣ形成設計物中３４種類が、設計モデルの予想サイズに概ね対応する対応ＳＥＣのピークを有した。設計物を次いで、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃと組み合わせ、そのアセンブリ物を、ＳＥＣにより再精製した。これらのＡｂＣを形成する設計物の８種類が、標的ナノ粒子の分子量と矛盾のない容積位置で単分散ピークとして溶出された分子種へと、Ｆｃにより集合した（図２ａ～ｂ；３種類のＤ２二面体、２種類のＴ３２四面体、１種類のＯ４２の八面体、および２種類のＩ５２二十面体ＡｂＣ）。ｉ５２．６設計物について、アセンブリ緩衝液に１００ｍＭのＬ－アルギニンを添加することは、Ｆｃと組み合わせた後の凝集を防止し；全ての他の設計物は、Ｔｒｉｓ－緩衝液性食塩水中で容易に自己アセンブリした。ほとんどの他の設計物は、ＳＥＣ、天然のゲルにより、または組み合わせ後にＦｃと明らかに沈殿することにより明らかなように、、依然としてＦｃに結合したが、おそらく標的融合物の幾何学的配置からの偏位が原因で、ＳＥＣにより単一分散ナノ粒子を形成しなかった（表６）。

【００９８】

【表６】

表６：設計した抗体結合性ケージ形成オリゴマーの成功率

幾何学的配置	数次	可溶性要素	良好な SEC 要素	Fc でケージを形成する
D2 二面体	6	5	4	3
T32 四面体	11	8	7	2
032 八面体	4	3	3	0
042 八面体	2	1	1	1
I32 二十面体	14	14	10	0
I52 二十面体	11	11	10	2
全体	48	42	35	8

溶解性（カラム２）は、ＳＤＳゲルにより検出されるような、溶解後、遠心分離後、プレＩＭＡＣの可溶性画分中の蛋白質の存在を指す。良好なＳＥＣ構成要素（カラム３）は、ナノケージ形成設計モデルのおおよその予測サイズに対応するいくつかのピークを有するＳＥＣトレースを指す。Ｆｃを含むケージ形成のデータを、図２および３に示す。

【００９９】

ＮＳ－ＥＭ顕微鏡写真および２次元クラス平均は、設計モデルに対応する形状とサイズを有するナノケージを明らかにした（図２ｃ）。ＡｂＣはまた、無損傷抗体（ＦｃドメインおよびＦａｂドメインを有するＩｇＧ）で構築した場合にも形成し、ＳＥＣおよびＮＳ－ＥＭにより示されるように、やはり単分散性ナノケージを生じた（図２ｄ～ｅ）。Ｆｃ

－ＦａｂヒンジのＦｃ－ＡｂＣよりもＩｇＧ－ＡｂＣの電子顕微鏡写真において柔軟性のかなり多い証拠が存在する。いずれの場合においても、無損傷ＩｇＧで作成したＡｂＣのＮＳ－ＥＭデータから算出した２Ｄクラス平均は依然として、アセンブリ物の非柔軟部分に対応する密度を決定できた（図２ｅ）。

【０１００】

Ｆｃで形成されたＡｂＣの単一粒子ＮＳ－ＥＭおよび低温電子顕微鏡で再構築した３Ｄマップは、コンピューター設計モデルとほぼ一致する（図３）。二面体（ｄ２．３、ｄ２．４、ｄ２．７）、四面体（ｔ３２．４、ｔ３２．８）、ならびに二十面体（ｉ５２．６）ナノケージの１つに関する陰性染色ＥＭ再構成は明瞭に、コンピューター計算によって予測されるように共に一致する、二量体「Ｕ」字型Ｆｃおよびより長い設計された蛋白質領域を示す。ｏ４２．１設計物についての単一粒子低温電子顕微鏡再構成は、Ｃ４頂点に位置する６種類の設計された四量体の明確な密度を有し、それは、八面体構造の稜線に沿ってねじれて１２個の二量体型Ｆｃを結合し、８つのＣ３面を非占有状態に残す。Ｆｃを有するｉ５２．３の低温ＥＭ密度は同様に、正二十面体の２０個の面形状を繰り返し、Ｃ５頂点で外側に突出する１２個の設計された五量体を有し（単量体またはＦｃ結合剤と比較してより長いＣ５組み立てブロックの長さによる）、稜線の中心で３０個の二量体Ｆｃに結合し、２０個の非占有Ｃ３面を有する。いずれの場合においても、計算機で設計したモデルは、ＥＭ密度に明瞭に合致する。

【０１０１】

ＡｂＣによる細胞シグナル伝達の増強

設計したＡｂＣは、シグナル伝達経路活性化に対する、クラスターへと細胞表面受容体を会合させることの効果を調べるための一般的プラットフォームを提供する。細胞表面受容体への抗体の結合は、天然リガンドの働きが阻害されるため、シグナル伝達の拮抗的作用をもたらし得る（２５）。場合によっては受容体のクラスター化は活性化を起こすと示されているが（１１、２６、２７）、多くの異なるシグナル伝達経路に容易に適用され得る受容体連結の連結価と幾何学的配置を変化させる体系的なアプローチは存在しない。数多く存在する、ほとんど全ての受容体結合性抗体は、本発明者らのＡｂＣ形成設計物を用いて、様々な異なる構造へと容易にアセンブルされ得るという事実を活用して、シグナル伝達に及ぼす受容体クラスター化の効果を調べた。本発明者らは、様々なシグナル伝達経路を標的とする抗体およびＦｃの融合物をナノ粒子へとアセンブルし、以降の段落に記載されるように、それらの効果を調べた。

【０１０２】

敗血症およびＡＲＤＳの治療のために設計したＴｉｅ２作用薬

この仕事は、血管形成シグナル伝達を増強するためにアンジオポイエチン－１　Ｆ－ドメインへの結晶化可能抗体断片（Ｆｃ）融合物の利用に焦点を当てる。

【０１０３】

Ｆｃ－アンジオポイエチン１ナノケージによるＴｉｅ２経路活性化

アンジオポイエチン１受容体（Ｔｉｅ２）などの特定の受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）は、クラスター化されると下流のシグナル伝達カスケードを活性化する（３１、３２）。ナノ粒子上にアンジオポイエチン－１のＦドメイン（Ａ１Ｆ）を足場形成させることは、ＡＫＴおよびＥＲＫのリン酸化を誘導し、インビトロの細胞遊走および管形成を促進し、およびインビボにおける傷害後の創傷治癒を改善する（３２）。これらの活性を有する治療薬は、敗血症および急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）などの、細胞死および炎症によって特徴付けられる病態の治療に有用であり得る。そのような作用薬を作成するためにＡｂＣプラットフォームを用いることができるかを決定するために、本発明者らは、Ａ１ＦへのＦｃ融合物を有する４２．１およびｉ５２．３　ＡｂＣを構築（アセンブル）した（図４ｇ、図４ａ～ｂ）。八面体および二十面体のＡ１Ｆ－ＡｂＣは、ＡＫＴおよびＥＲＫ１／２のリン酸化をベースラインよりも有意に増加させ（図４ｈ～ｉ）、細胞遊走および血管安定性を増大させた（図４ｊ～ｋ、図８ｃ～ｄ）が、Ｆｃのみの対照または遊離Ｆｃ－Ａｎｇ１Ｆは、増大させなかった。上記の結果は、ＡｂＣは、遊離Ａ１Ｆ－Ｆｃより

も強力な血管形成誘導物質であること、およびその構成要素は容易に大規模生産できるため、それらが有望な治療薬候補であることを、示している。

【０１０４】

抗体ケージによるＴＮＦＲスーパーファミリー作動性

設計したＡｂＣは、シグナル伝達経路活性化に対する、クラスターへと細胞表面受容体を会合させることの効果を調べるための一般的プラットフォームを提供する。細胞表面受容体への抗体の結合は、天然リガンドの関与が阻害されるため、シグナル伝達の拮抗作用をもたらし得る（６）。多くの異なるシグナル伝達経路に容易に適用され得る受容体連結の連結価と幾何学的配置を変化させる体系的なアプローチは存在していない。数多く存在する、ほとんど全ての受容体結合性抗体は、本発明者らのＡｂＣ形成設計物を用いて、様々な異なる構造へと容易にアセンブルされ得るという利点を活用して、シグナル伝達に及ぼす受容体クラスター化の効果を調べた。この仕事は、２種類の腫瘍壊死ファミリー受容体スーパーファミリーメンバーである死受容体５（ＤＲ５）およびＣＤ４０を標的とする抗体の利用に焦点を当てる。

【０１０５】

α－ＤＲ５ナノケージによる腫瘍細胞アポトーシスの誘導

死受容体５（ＤＲ５）は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー細胞表面蛋白質であり、その三量体性天然リガンドであるＴＮＦ関連アポトーシス誘導性リガンド（ＴＲＡＩＬ）によって架橋されると、細胞死で終了するカスパーゼ媒介性アポトーシスシグナル伝達カスケードを開始する（９、１０、２７～３０）。このファミリーの他のメンバーのように、ＤＲ５は、ＮＦ－κＢ炎症性経路、およびリガンド結合時に増殖と遊走を促進する経路などの、非アポトーシス型シグナル伝達経路を活性化する別のシグナル伝達複合体を形成することも可能である（２９）。Ｒ５はいくつかの腫瘍で過剰発現されるので、ＤＲ５を活性化するためにα－ＤＲ５　ｍＡｂおよび組換えＴＲＡＩＬなどの複数の治療薬候補が開発されているが、これらは、低い効力および腫瘍細胞集団におけるＴＲＡＩＬ耐性の発生により臨床試験を不成功に終えた（２９、３０）。三量体ＴＲＡＩＬを二価α－ＤＲ５　ＩｇＧと組み合わせることは、単独のいずれかの構成要素単体よりももっと強力なアポトーシス応答をもたらし、これはおそらく細胞表面上の２次元アレイの形成を介する大規模なＤＲ５クラスター化の誘導による（２７）。

【０１０６】

同じＩｇＧ（コナツムマブ）で形成されるα－ＤＲ５　ＡｂＣが非結合アレイの形成なしに、類似の抗腫瘍効果を有し得るか否かを調べた。連結価および形状の範囲を代表するように４種類の幾何学的配置にわたり、５種類の設計物（ｄ２．４、ｔ３２．４、ｔ３２．８、ｏ４２．１、およびｉ５２．３）を選択した（図４ａ）。すべてのα－ＤＲ５　ＡｂＣは、ＳＥＣで単一ピークを形成すると見出され、構築された粒子の形成と一致した対応するＮＳ－ＥＭ顕微鏡写真を生じた（図２ｄ～ｅ）。

【０１０７】

５種類のα－ＤＲ５　ＡｂＣはいずれも、結腸直腸腫瘍細胞株において、ＴＲＡＩＬと類似のレベルでカスパーゼ３／７－媒介性アポトーシスを惹起したが、抗体のみ、もしくは裸のＦｃで形成されたＡｂＣは、試験した最高濃度においてすら、カスパーゼ－３／７活性または細胞死を起こさなかった（図４ａ、７ａ～ｂ）。ＴＲＡＩＬ耐性腎細胞癌株ＲＣＣ４に関して、全てのα－ＤＲ５　ＡｂＣがカスパーゼ－３、７活性を誘導し（図４ｂ）、設計物ｔ３２．４、ｔ３２．８、およびｏ４２．１は１５０ｎＭの濃度で細胞生存率を大幅に低下させた（図４ｃ）ことを見出した。設計物ｔ３２．４およびｏ４２．１は、１００倍低濃度（１．５ｎＭ）でカスパーゼを活性化し、１５０ｎＭでのα－ＤＲ５　ＡｂＣ　ｔ３２．４およびｏ４２．１によるＲＣＣ４の延長された処理は、６日後にほぼ全ての細胞の死滅をもたらし、ＲＣＣ４細胞がナノケージに対して耐性を獲得しないことを示唆する（図４ｅ）。遊離のα－ＤＲ５抗体、ＴＲＡＩＬ、（図４ｂ～ｃ）、およびＦｃのみのＡｂＣ（図４ｄ、７ｃ）は、ＲＣＣ４腫瘍細胞株においてカスパーゼを活性化せず細胞死をもたらさなかった。

【０１０８】
次いで、アポトーシス活性の尺度である切断されたＰＡＲＰ、ならびにＮＦ－ｋＢの標的ｃＦＬＩＰに対するα－ＤＲ５　ＡｂＣの効果を分析することにより、α－ＤＲ５　ＡｂＣにより活性化された下流経路を調べた。カスパーゼおよび細胞生存率のデータと一致して、ｏ４２．１α－ＤＲ５　ＡｂＣは、切断ＰＡＲＰを増加させたが、遊離のα－ＤＲ５抗体、ＴＲＡＩＬまたはｏ４２．１　Ｆｃ　ＡｂＣは、ベースラインを超える切断ＰＡＲＰの増加をもたらさなかった（図４ｆ～ｇ）。他のすべてのα－ＤＲ５　ＡｂＣもまた、切断されたＰＡＲＰを増加させることが明らかになった（図７ｆ）。これらの結果は、α－ＤＲ５　ＡｂＣが、抗アポトーシス経路を阻害することによりＴＲＡＩＬ耐性を克服でき、それは、ＤＲ５超クラスター化により誘導されるアポトーシスカスケードを増強することを示唆している。最後に、α－ＤＲ５　ＡｂＣは、健常初代腎尿細管細胞においてアポトーシスを誘導しなかった（図７ｄ～ｅ）。

【０１０９】
α－ＣＤ４０ナノケージは、ＣＤ４０－発現ＣＨＯ細胞を活性化する
抗原提示樹状細胞上およびＢ細胞上で発現されるＴＮＦＲスーパーファミリーメンバーであるＣＤ４０は、Ｔ細胞上の三量体ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０ＬまたはＣＤ１５４）により架橋され、シグナル伝達および細胞増殖をもたらす（３３、３４）。ナノケージへと非作用薬α－ＣＤ４０抗体（ＬＯＢ７／６）をアセンブルすることが細胞表面提示の必要性を代替し得るか否かを調べた。八面体ＡｂＣを、ＬＯＢ７／６　ＩｇＧでアセンブルした；ＳＥＣ、動的光散乱（ＤＬＳ）、およびＮＳ－ＥＭ（図５ａ～ｄ）による特徴付けは、これらが予想される八面体形態を有する単分散であることを示した。八面体αＣＤ４０　ＬＯＢ７／６　ＡｂＣは、ＣＤ４０発現性レポーターＣＨＯ細胞（Ｊ２１５Ａ、Ｐｒｏｍｅｇａ）において、α－ＣＤ４０活性化対照抗体（Ｐｒｏｍｅｇａ）よりも百倍低い濃度で、安定なＣＤ４０活性化を誘導すると見出され、他方、遊離のＬＯＢ７／６抗体または非ＣＤ４０結合性ＩｇＧで形成される八面体ＡｂＣについて活性化は認められなかった（図５ｅ、表７）。これは、ナノケージアセンブリが、非作用薬α－ＣＤ４０　ｍＡｂをＣＤ４０経路作用薬に変換することを実証する。

【０１１０】
【表７】

表７：ＣＤ４０活性化の実験からのＥＣ５０

	EC50 log(μM)	95% CI log(μM)
o42.1 IgG 対照	-1.422	非検出
α-CD40	1.466	1.247～1.833
LOB7/6	-1.471	非検出
o42.1 LOB7/6	0.1134	-0.001058～0.2037

ＥＣ５０値は、応答に対するｌｏｇ（作用薬）を用いて作成した応答曲線から補間した；Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）ソフトウェアを用いてフィットした変数スロープ（４種類のパラメータ）

【０１１１】

【表８】

表８：最小サイズ排除クロマトグラフィーにより確認されたケージへと形成された抗体のリスト

Ab反応性	Abサブクラス	設計物（最小SECにより検証）	注記
α-CD4	mIgG2b	o42.1	OKT4
α-CD40	mIgG2aまたはmIgG2b	o42.1	LOB7/6または82111（それぞれ）
α-DR5（ヒト）	hIgG1	d2.3、d2.4、d2.7、t32.4、t32.8、42.1、i52.3、i52.6	コナツムマブ（conatumumab）
α-DR5（マウス）	アルメニアンハムスターIgG	t32.4、o42.1	MD5-1
α-EGFR	hIgG1	mIgG2b	セツキシマブ（cetuximab）
α-LRP6	hIgG1	t32.4、o42.1	YW210.09
α-RSV F	hIgG1	d2.3、d2.4、d2.7、t32.4、t32.8、o42.1、i52.3、i52.6	mpe8
非特異	ウサギIgG	d2.4、o42.1	ウサギ血清IgG

抗体の標的反応性、抗体種および抗体アイソタイプ、ならびに用いた設計物により列挙した良好に形成されたケージ（ＳＥＣによる）

【０１１２】

【表９】

表９：最小サイズ排除クロマトグラフィーにより確認されたケージへと形成されたＦｃ融合物のリスト

Fc-融合リガンド	Fc サブクラス	設計物（最小SECにより検証）	注記
アンジオポイエチン-1 F-ドメイン	hIgG1	d2.4、t32.4、t32.8、o42.1、i52.3	
アンジオテンシン変換酵素２（ACE2）	hIgG1	o42.1	
CD80	hIgG1	o42.1	
mRuby2	hIgG1	d2.4、t32.4、t32.8、o42.1、i52.3	
sfGFP	hIgG1	d2.4、t32.4、t32.8、o42.1、i52.3	
VEGF-a	hIgG1	t32.4、o42.1	
VEGF-c	hIgG1	t32.4、o42.1	

ＦｃにＦｃ融合されたリガンド、Ｆｃ配列種およびＦｃのアイソタイプ、ならびに用いた設計物により列挙した良好に形成されたケージ（ＳＥＣによる）

【０１１３】

考察

本発明者らのアプローチは、形態と機能を統合することにより機能性ナノ材料を創出するこれまでの計算機設計上の試みから大きく進歩している；本発明者らのＡｂＣは、構造および機能上の構成要素の両方として抗体を用いる。設計した抗体結合性ケージ形成性オリゴマーを剛性ヘリックス融合物で成形することにより、広範な幾何学的配置および配向を達成できる。この設計方略は、目的の他のホモオリゴマーをケージ様構造に組み込むために一般化可能である。例えば、ナノケージは、ヘリックス抗原結合蛋白質で終わる要素を用いてウイルス糖蛋白質抗原と、あるいは連続反応で働く活性部位の近接性を最も高めるための融合に利用可能な露出ヘリックスを有する対称性酵素からアセンブルできた。ＡｂＣは、機能性ドメインアプローチの以前の融合物と比較して、モジュール構成に関して、かなり大きな利点を提供し；充分なプロテインＡ結合を有する何千もの公知の抗体のいずれかが、適切な設計物と単に混合されて所望の対称性アセンブリの形成を駆動でき、本発明者らは、複数の異なるＩｇＧおよびＦｃ融合物を用いてこの原理を実証した（表８～９）。ＥＭおよびＳＥＣは、ＩｇＭと同等でかつ（本発明者らの知る限り）他の抗体蛋白質ナノ粒子製剤のいずれによっても達成されない単分散性を示す。

【０１１４】

ＡｂＣは、シグナル伝達経路の作用薬として、かなり有望である。ＡｂＣ中へのＲＴＫ－およびＴＮＦＲ－ファミリー細胞表面受容体に対する抗体のアセンブルは、細胞死、増殖、および分化に関与する多様な下流シグナル伝達経路の活性化をもたらした。抗体媒介性クラスター化がシグナル伝達経路を活性化することはこれまでに見出されていたが（１１、２７、３３）、本発明者らのアプローチは、さらに高い構造均一性という利点を有し、表現型効果のより正確な調整およびより制御された製剤化を可能にする。ＡｂＣはまた、抗体媒介性ウイルス中和を増強した。二十面体Ａｂは、核酸または蛋白質カーゴのパッケージングに利用できる実質的内部容積（推定内部半径が１５．５ｎｍであることに基づけば約１５，０００ｎｍ^{3}の容積である）を有し、原則として異なる標的特異性を達成す

ることは、ある抗体を別の抗体と単に交換するように簡単であるので、標的送達への非常に興味深い応用がある。既存の抗体の大規模なレパートリーと共役される、本明細書の記載のように開発されたＡｂＣは、生体臨床医学での広範な応用にわたり広く有用であろうと、本発明者らは予想する。

【０１１５】

参考文献および注記：

【表１０】

参考文献

1. R.－M. Lu, Y.－C. Hwang, I.－J. Liu, C.－C. Lee, H.－Z. Tsai, H.－J. Li, H.－C. Wu, Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J. Biomed. Sci. 27, 1 (2020).

2. H. J. Kang, Y. J. Kang, Y.－M. Lee, H.－H. Shin, S. J. Chung, S. Kang, Developing an antibody－binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatform. Biomaterials. 33, 5423-5430 (2012).

3. H. Kim, Y. J. Kang, J. Min, H. Choi, S. Kang, Development of an antibody－binding modular nanoplatform for antibody－guided targeted cell imaging and delivery. RSC Advances. 6 (2016), pp. 19208-19213.

4. A. M. Cuesta, N. Sainz－Pastor, J. Bonet, B. Oliva, L. Alvarez－Vallina, Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. Trends Biotechnol. 28, 355-362 (2010).

5. N. Nuñez－Prado, M. Compte, S. Harwood, A. Álvarez－Méndez, S. Lykkemark, L. Sanz, L. Álvarez－Vallina, The coming of age of engineered multivalent antibodies. Drug Discovery Today. 20 (2015), pp. 588-594.

6. A. Miller, S. Carr, T. Rabbitts, H. Ali, Multimeric antibodies with increased valency surpassing functional affinity and potency thresholds using novel formats. MAbs. 12, 1752529 (2020).

7. M. Klement, J. Zheng, C. Liu, H.－L. Tan, V. V. T. Wong, A. B.－H. Choo, D.－Y. Lee, D. S.－W. Ow, Antibody engineering of a cytotoxic monoclonal antibody 84 against human embryonic stem cells: Investigating the effects of multivalency on cytotoxicity. Journal of Biotechnology. 243 (2017), pp. 29-37.

8. N. S. Laursen, R. H. E. Friesen, X. Zhu, M. Jongeneelen, S. Blokland, J. Vermond, A. van Eijgen, C. Tang, H. van Diepen, G. Obmolova, M. van der Neut Kolfschoten, D. Zuijdgeest, R. Straetemans, R. M. B. Hoffman, T. Nieusma, J. Pallesen, H. L. Turner, S. M. Bernard, A. B. Ward, J. Luo, L. L. M. Poon, A. P. Tretiakova, J. M. Wilson, M. P. Limberis, R. Vogels, B. Brandenburg, J. A. Kolkman, I. A. Wilson, U

niversal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. Science. 362, 598-602 (2018).
9. O. Seifert, A. Plappert, S. Fellermeier, M. Siegemund, K. Pfizenmaier, R. E. Kontermann, Tetravalent Antibody-scTRAIL Fusion Proteins with Improved Properties Molecular Cancer Therapeutics. 13 (2014), pp. 101-111.
10. M. Siegemund, F. Schneider, M. Hutt, O. Seifert, I. Müller, D. Kulms, K. Pfizenmaier, R. E. Kontermann, IgG-single-chain TRAIL fusion proteins for tumour therapy. Sci. Rep. 8, 7808 (2018).
11. R. S. Riley, E. S. Day, Frizzled7 Antibody-Functionalized Nanoshells Enable Multivalent Binding for Wnt Signaling Inhibition in Triple Negative Breast Cancer Cells. Small. 13 (2017), doi:10.1002/smll.201700544.
12. E. Hiramoto, A. Tsutsumi, R. Suzuki, S. Matsuoka, S. Arai, M. Kikkawa, T. Miyazaki, The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. Sci Adv. 4, eaau1199 (2018).
13. N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya, B. S. Vollmar, J. P. Sumida, I. André, T. Gonen, T. O. Yeates, D. Baker, Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. Science. 336, 1171-1174 (2012).
14. J. B. Bale, S. Gonen, Y. Liu, W. Sheffler, D. Ellis, C. Thomas, D. Cascio, T. O. Yeates, T. Gonen, N. P. King, D. Baker, Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. Science. 353, 389-394 (2016).
15. G. Ueda, A. Antanasijevic, J. A. Fallas, W. Sheffler, J. Copps, D. Ellis, G. Hutchinson, A. Moyer, A. Yasmeen, Y. Tsybovsky, Y.-J. Park, M. J. Bick, B. Sankaran, R. A. Gillespie, P. J. M. Brouwer, P. H. Zwart, D. Veesler, M. Kanekiyo, B. S. Graham, R. Sanders, J. P. Moore, P. J. Klasse, A. B. Ward, N. King, D. Baker, Tailored Design of Protein Nanoparticle Scaffolds for Multivalent Presentation of Viral Glycoprotein Antigens, , doi:10.11

01／2020.01.29.923862.
16. M. Graille, E. A. Stura, A. L. Corper, B. J. Sutton, M. J. Taussig, J.－B. Charbonnier, G. J. Silverman, Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B－cell receptors and superantigen activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97 (2000), pp. 5399-5404.
17. T. J. Brunette, F. Parmeggiani, P.－S. Huang, G. Bhabha, D. C. Ekiert, S. E. Tsutakawa, G. L. Hura, J. A. Tainer, D. Baker, Exploring the repeat protein universe through computational protein design Nature. 528, 580-584 (2015).
18. J. A. Fallas, G. Ueda, W. Sheffler, V. Nguyen, D. E. McNamara, B. Sankaran, J. H. Pereira, F. Parmeggiani, T. J. Brunette, D. Cascio, T. R. Yeates, P. Zwart, D. Baker, Computational design of self－assembling cyclic protein homo－oligomers. Nat. Chem. 9, 353-360 (2017).
19. P.－S. Huang, G. Oberdorfer, C. Xu, X. Y. Pei, B. L. Nannenga, J. M. Rogers, F. DiMaio, T. Gonen, B. Luisi, D. Baker, High thermodynamic stability of parametrically designed helical bundles. Science. 346, 481-485 (2014).
20. I. Vulovic, Q. Yao, Y.－J. Park, A. Courbet, A. Norris, F. Busch, A. Sahasrabuddhe, H. Merten, D. D. Sahtoe, G. Ueda, J. A. Fallas, S. J. Weaver, Y. Hsia, R. A. Langan, A. Plückthun, V. H. Wysocki, D. Veesler, G. J. Jensen, D. Baker, Generation of ordered protein assemblies using rigid three－body fusion, , doi:10.1101／2020.07.18.210294.
21. Y. Hsia, R. Mout, W. Sheffler, N. I. Edman, I. Vulovic, Y.－J. Park, R. L. Redler, M. J. Bick, A. K. Bera, A. Courbet, A. Kang, T. J. Brunette, U. Natterman n, E. Tsai, A. Saleem, C. M. Chow, D. Ekiert, G. Bhabha, D. Veesler, D. Baker, Hierarchical design of multi－scale protein complexes by combinatorial assembly of oligomeric helical bundle and repeat protein building blocks (2020).
22. T. O. Yeates, Y. Liu, J. Laniado,

The design of symmetric protein nanomaterials comes of age in theory and practice. Curr. Opin. Struct. Biol. 39, 134-143 (2016).
23. B. M. Baynes, D. I. C. Wang, B. L. Trout, Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. Biochemistry. 44, 4919-4925 (2005).
24. D. Schneidman-Duhovny, M. Hammel, J. A. Tainer, A. Sali, Accurate SAXS profile computation and its assessment by contrast variation experiments. Biophys. J. 105, 962-974 (2013).
25. J. L. Taupin, P. Legembre, J. Bitard, S. Daburon, V. Pitard, F. Blanchard, L. Duplomb, A. Godard, Y. Jacques, J. F. Moreau, Identification of agonistic and antagonistic antibodies against gp190, the leukemia inhibitory factor receptor, reveals distinct roles for its two cytokine-binding domains. J. Biol. Chem. 276, 47975-47981 (2001).
26. K. Mohan, G. Ueda, A. R. Kim, K. M. Jude, J. A. Fallas, Y. Guo, M. Hafer, Y. Miao, R. A. Saxton, J. Pichler, V. G. Sankaran, D. Baker, K. C. Garcia, Topological control of cytokine receptor signaling induces differential effects in hematopoiesis. Science. 364 (2019), doi:10.1126/science.aav7532.
27. J. D. Graves, J. J. Kordich, T.-H. Huang, J. Piasecki, T. L. Bush, T. Sullivan, I. N. Foltz, W. Chang, H. Douangpanya, T. Dang, J. W. O'Neill, R. Mallari, X. Zhao, D. G. Branstetter, J. M. Rossi, A. M. Long, X. Huang, P. M. Holland, Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. Cancer Cell. 26, 177-189 (2014).
28. J. Naval, D. de Miguel, A. Gallego-Lleyda, A. Anel, L. Martinez-Lostao, Importance of TRAIL Molecular Anatomy in Receptor Oligomerization and Signaling. Implications for Cancer Therapy. Cancers. 11 (2019), doi:10.3390/cancers11040444.
29. D. de Miguel, J. Lemke, A. Anel, H. Walczak, L. Martinez-Lostao, Onto better TRAILs for cancer treatment. Cell Death

Differ. 23, 733-747 (2016).
30. M. H. Tuthill, A. Montinaro, J. Zinngrebe, K. Prieske, P. Draber, S. Prieske, T. Newsom-Davis, S. von Karstedt, J. Graves, H. Walczak, TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. Oncogene. 34, 2138-2144 (2015).
31. V.-M. Leppänen, P. Saharinen, K. Alitalo, Structural basis of Tie2 activation and Tie2/Tie1 heterodimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 4376-4381 (2017).
32. Y.-T. Zhao, J. A. Fallas, S. Saini, G. Ueda, L. Somasundaram, Z. Zhou, I. Xavier, D. Ehnes, C. Xu, L. Carter, S. Wrenn, J. Mathieu, D. L. Sellers, D. Baker, H. Ruohola-Baker, F-domain valency determines outcome of signaling through the Angiopoietin pathway (2020).
33. R. S. Kornbluth, M. Stempniak, G. W. Stone, Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. Int. Rev. Immunol. 31, 279-288 (2012).
34. R. H. Vonderheide, M. J. Glennie, Agonistic CD40 Antibodies and Cancer Therapy. Clinical Cancer Research. 19 (2013), pp. 1035-1043.
35. E. R. Steenblock, S. H. Wrzesinski, R. A. Flavell, T. M. Fahmy, Antigen presentation on artificial acellular substrates: modular systems for flexible, adaptable immunotherapy. Expert Opin. Biol. Ther. 9, 451-464 (2009).
36. J. V. Kim, J.-B. Latouche, I. Rivière, M. Sadelain, The ABCs of artificial antigen presentation. Nat. Biotechnol. 22, 403-410 (2004).
39. E. E. Idusogie, L. G. Presta, H. Gazzano-Santoro, K. Totpal, P. Y. Wong, M. Ultsch, Y. G. Meng, M. G. Mulkerrin, Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J. Immunol. 164, 4178-4184 (2000).
40. F. DiMaio, N. Echols, J. J. Headd, T. C. Terwilliger, P. D. Adams, D. Baker, Improved low-resolution crystallographic refinement with Phenix and Rosetta. Nature Methods. 10 (2013), pp. 1102-1104.

41. F. W. Studier, F. William Studier, Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification. 41 (2005), pp. 207-234.
42. J. K. Leman, B. D. Weitzner, S. M. Lewis, J. Adolf-Bryfogle, N. Alam, R. F. Alford, M. Aprahamian, D. Baker, K. A. Barlow, P. Barth, B. Basanta, B. J. Bender, K. Blacklock, J. Bonet, S. E. Boyken, P. Bradley, C. Bystroff, P. Conway, S. Cooper, B. E. Correia, B. Coventry, R. Das, R. M. De Jong, F. DiMaio, L. Dsilva, R. Dunbrack, A. S. Ford, B. Frenz, D. Y. Fu, C. Geniesse, L. Goldschmidt, R. Gowthaman, J. J. Gray, D. Gront, S. Guffy, S. Horowitz, P.-S. Huang, T. Huber, T. M. Jacobs, J. R. Jeliazkov, D. K. Johnson, K. Kappel, J. Karanicolas, H. Khakzad, K. R. Khar, S. D. Khare, F. Khatib, A. Khramushin, I. C. King, R. Kleffner, B. Koepnick, T. Kortemme, G. Kuenze, B. Kuhlman, D. Kuroda, J. W. Labonte, J. K. Lai, G. Lapidoth, A. Leaver-Fay, S. Lindert, T. Linsky, N. London, J. H. Lubin, S. Lyskov, J. Maguire, L. Malmström, E. Marcos, O. Marcu, N. A. Marze, J. Meiler, R. Moretti, V. K. Mulligan, S. Nerli, C. Norn, S. Ó'Conchúir, N. Ollikainen, S. Ovchinnikov, M. S. Pacella, X. Pan, H. Park, R. E. Pavlovicz, M. Pethe, B. G. Pierce, K. B. Pilla, B. Raveh, P. Douglas Renfrew, S. S. Roy Burman, A. Rubenstein, M. F. Sauer, A. Scheck, W. Schief, O. Schueler-Furman, Y. Sedan, A. M. Sevy, N. G. Sgourakis, L. Shi, J. B. Siegel, D.-A. Silva, S. Smith, Y. Song, A. Stein, M. Szegedy, F. D. Teets, S. B. Thyme, R. Y.-R. Wang, A. Watkins, L. Zimmerman, R. Bonneau, Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. Nat. Methods. 17, 665-680 (2020).
43. L. Jendeberg, P. Nilsson, A. Larsson, P. Denker, M. Uhlén, B. Nilsson, P.-Å. Nygren, Engineering of Fc1 and Fc3 from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. Journal of Immunological Methods. 201 (1997), pp. 25-34.
44. D. Corti, S. Bianchi, F. Vanzetta,

A. Minola, L. Perez, G. Agatic, B. Guarino, C. Silacci, J. Marcandalli, B. J. Marsland, A. Piralla, E. Percivalle, F. Sallusto, F. Baldanti, A. Lanzavecchia, Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. Nature. 501, 439-443 (2013).
45. K. N. Dyer, M. Hammel, R. P. Rambo, S. E. Tsutakawa, I. Rodic, S. Classen, J. A. Tainer, G. L. Hura, High-throughput SAXS for the characterization of biomolecules in solution: a practical approach. Methods Mol. Biol. 1091, 245-258 (2014).

【０１１６】
材料および方法
Ｆｃ結合剤ヘリックス反復蛋白質（ＤＨＲ７９－ＦｃＢ）のコンピューター設計と試験
Ｆｃ断片との複合体中の黄色ブドウ球菌プロテインＡのＢドメイン（ＰＤＢ　ＩＤ：１Ｌ６Ｘ）の結晶構造を、Ｐｈｅｎｉｘ　Ｒｏｓｅｔｔａ（登録商標）を用いて構造因子により緩和した（３９、４０）。簡単に説明すると、ＲｏｓｅｔｔａＳｃｒｉｐｔｓ（登録商標）ＭｏｔｉｆＧｒａｆｔ　ｍｏｖｅｒを用いて、以前に設計されたヘリックス反復蛋白質（ＤＨＲ７９）（１７）中への１Ｌ６Ｘから抽出されたプロテインＡ結合モチーフの挿入に対する好適解を評価した。具体的には、最小プロテインＡ結合モチーフを、用手的に決定し抽出し、ＤＨＲ７９の全骨格整列の鋳型として用い、一方でＦｃ／ＤＨＲ界面で結晶構造中のＦｃドメインと相互作用するユーザーが特定したホットスポット残基を保持し、かつ全ての他の位置における天然のＤＨＲ残基を保持した。このＭｏｔｉｆＧｒａｆｔ整列の後に、５反復のＦａｓｔＤｅｓｉｇｎおよび５反復のＦａｓｔＲｅｌａｘを行い、その際、Ｆｃの構造は完全に固定したままでＤＨＲ側鎖および骨格回転異性体を移動させた。最良の設計物を、ヒューリスティックフィルター値のリストに基づき選択した。設計中に用いた完全なＸＭＬファイルに関する補足資料を参照のこと。図６１ａは、ＤＨＲ７９－ＦｃＢの設計モデルを示す。

【０１１７】
設計物をまず、ビオチン化Ｆｃ蛋白質への酵母表面ディスプレイ結合によって評価した。定性的結合シグナルの確認時に、設計物を、Ｃ末端Ｈｉｓタグを有するｐＥＴ２９ｂ発現ベクター中に挿入した。蛋白質を、２７℃にて２２５ｒｐｍで２０時間、自己誘導培地（１０ｍＬの５０×Ｍ、１０ｍＬの５０ｘ５０５２、４８０ｍＬのほぼＴＢ、１×　クロラムフェニコール、１×　カナマイシン）中でＢＬ２１　ＤＥ３にて発現させた（４１）。細胞を、溶解緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３０ｍＭイミダゾール、１ｍＭ　ＰＭＳＦ、５％グリセロール（ｖ／ｖ）、ｐＨ８．０）に再懸濁し、１８０００ＰＳＩでマイクロフルイダイザーを用いて溶解した。可溶性画分を、２４，０００×ｇでの遠心分離により分離した。Ｎｉ－ＮＴＡバッチ樹脂によるＩＭＡＣを、初期精製に用いた；簡単に説明すると、ニッケル－ニトリロ三酢酸（Ｎｉ－ＮＴＡ）樹脂を、結合緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）で平衡化し、可溶性溶解物を、カラムに添加し、カラムを、２０カラム容積（ＣＶ）の結合緩衝液で洗浄し、５ＣＶの溶出緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）で溶出した。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラムによるサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を、洗練化工程に用いた（図６ｂ）。ＳＥＣ緩衝液は、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌであった。

【０１１８】
ビオチン化ＩｇＧ１およびビオチン化Ｆｃ蛋白質に対するＤＨＲ７９－ＦｃＢの親和性を、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）バイオレイヤー干渉法を用いて評価した（ＢＬＩ）。ＤＨＲ７９－ＦｃＢは、ＩｇＧ１（完全抗体）に対し７１．７ｎＭの親和性、およびＩｇＧ１Ｆｃ蛋白質に対し１１３ｎＭの親和性を示した（図６ｃ）。
【０１１９】
抗体ナノケージのコンピューター設計
入力ｐｄｂファイルをコンパイルして、抗体ケージの作成のための構成要素として用いた。プロテインＡ結合剤モデルについては、黄色ブドウ球菌プロテインＡのドメインＤ（ＰＤＢ　ＩＤ　１ＤＥＥ）を、Ｆｃに結合されたプロテインＡのＢドメイン（ＰＤＢ　ＩＤ　１Ｌ６Ｘ）（１６、３９）に対して整列させた。プロテインＡがヘリックス反復蛋白質に移植された、もう一方のＦｃ結合設計構造物も、１Ｌ６ＸからのＦｃとモデル化した。少なくともＳＡＸＳにより検証済みの単量体ヘリックス反復蛋白質リンカー（４２）および環状オリゴマー（２種類のＣ２、３種類のＣ３、１種類のＣ４、および２種類のＣ５）に関するＰＤＢファイルモデルは、本発明者らの研究室における以前の研究から編集した（１７～１９）。構成要素モデルを、どのアミノ酸が既存の蛋白質－蛋白質界面を破壊することなく融合物を作成するために好適であるかを決定するために、用手的に検査した。
【０１２０】
これらの構成要素を、特定された幾何学的配置および融合物の配向と共に、αヘリックス融合ソフトウェアへの入力として用いた（ＷＯＲＭＳの操作法に関する記述については、補足の文章を参照のこと）　（２０、２１）。融合物を、全ての可能な許容されるアミノ酸部位でヘリックスセグメントを重ねることにより作成した。融合物を次いで、幾何学的基準にしたがって交差する周期対称軸に関する偏位について評価する：Ｄ２、Ｔ３２、Ｏ３２、Ｏ４２、Ｉ３２、およびＩ５２の交角は、それぞれ４５．０°、５４．７°、３５．３°、４５．０°、２０．９°、および３１．７であり（２２）、角度公差および距離公差は、最大でそれぞれ５．７および０．５Åである。融合後ｐｄｂファイルを、ＦｃドメインのＮ末端がケージから外方を向き、それによりＩｇＧのＦａｂがケージ表面に対して外側に存在するように、用手的に篩い分けした。配列設計を、融合境界部の位置およびその近傍の残基についてＲｏｓｅｔｔａ（登録商標）対称配列設計（ＲｏｓｅｔｔａＳｃｒｉｐｔｓ（登録商標）のＳｙｍＰａｃｋＲｏｔａｍｅｒｓＭｏｖｅｒ）を用いて実施し（４２）、できるだけ多くの天然残基を維持することに重点を置いた。残基は、それらが他の残基と衝突したならば、もしくはそれらの化学的環境が融合後に変化した（例えば、以前はコアに面していた残基が今度は溶媒に曝露された場合）ならば、再設計された。指標残基セレクターを用いて、Ｆｃ残基位置での設計を防いだ。
【０１２１】
抗体ナノケージの構造的特徴付け
遺伝子を、各設計された抗体ナノケージ形成オリゴマーの細菌による発現のためにコドン最適化し、Ｃ末端グリシン／セリン・リンカーおよびＣ末端６×ヒスチジンタグを付加した。合成遺伝子を、ＮｄｅＩ制限部位とＸｈｏＩ制限部位の間でｐｅｔ２９ｂ＋ベクター中にクローン化した；このプラスミドは、カナマイシン耐性遺伝子および蛋白質発現用のＴ７プロモーターを含む。プラスミドを、製造元（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）により記載されるように１５秒間の熱ショック処理を用いて、化学的受容性のＬｅｍｏ２１（ＤＥ３）大腸菌中に形質転換した。形質転換された細胞を、上記のように、自己誘導発現培地に加え、２００ｒｐｍで振盪しながら、３７℃で１６時間インキュベートした（４１）。細胞を、４０００×ｇの遠心分離により沈殿させ、溶解緩衝液（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、プロテアーゼ阻害剤およびＤＮＡｓｅを添加した）中に再懸濁した。超音波を用いて、８５％の強度で細胞を溶解し、合計で２分間の超音波処理時間につき１５秒間のオン／オフ・サイクルを用いた。可溶性画分を、１６０００×ｇでの遠心分離により分離した。ＩＭＡＣを用いて上記のように

可溶性画分中のＨｉｓタグ付加蛋白質を分離した。ＩＭＡＣ溶出液を、１０Ｋ　ＭＷＣＯスピン型濃縮器を用いておおよそ１ｍＬに濃縮し、０．２２μＭ　スピンフィルターで濾過し、最終洗練化工程としてＳＥＣを通した（ＳＥＣ泳動緩衝液：１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０）。

【０１２２】

それらの予想保持容量付近に単分散ＳＥＣピークを与えた設計物を、ヒトＩｇＧ１由来のＦｃと組み合わせた。Ｆｃを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞でのもしくは大腸菌での発現用に標準的な方法のいずれかを用いて組換え技術で作成した（４３）。ケージ構成要素を、少なくとも３０分間４℃でインキュベーションした。１００ｍＭ　Ｌ－アルギニンを、ｉ５２．６設計物と形成されるＡｂＣへのアセンブリ中に添加した；その理由は、これが、設計されたＡｂＣ　ｉ５２．６の形成を最大化し、かつ可視的に「潰れた」凝集体の形成を最小化すると観察されたからである（２３）。Ｆｃ結合およびケージ形成を、ＳＥＣによって確認した；保持時間における早い側へのシフト（いずれかの構成要素のみを流した場合と比較して）は、より大型の構造物の形成を示す。ＮＳ－ＥＭを、これらの工程を終えた設計物の構造を確認するために、上述のように用いた。

【０１２３】

無損傷ＩｇＧを含むＡｂＣ構造を確認するために、ヒトＩｇＧ１（ｈＩｇＧ１）を、Ｆｃケージを作成するための同じプロトコルにしたがって、ＡｂＣ形成設計物と組み合わせた。本明細書において後述するすべてのＩｇＧ融合ＡｂＣまたはＦｃ融合ＡｂＣについても、このアセンブリ法にしたがった。図２ｄ～ｅのデータは、以下の設計物：ｄ２．３、ｄ２．４、ｄ２．７、ｔ３２．４、ｏ４２．１、およびｉ５２．３についてα－ＤＲ５抗体ＡＭＧ－６５５（２３）で形成されたＡｂＣを示す。図２ｄ～ｅに示される設計物ｔ３２．８およびｉ５２．６に関するデータは、ｈＩｇＧ１抗体ｍｐｅ８（４４）で形成されたＡｂＣ由来である。表８および９は、ＡｂＣへと形成されたＩｇＧおよびＦｃの融合物のリストを示す。

【０１２４】

動的光散乱測定（ＤＬＳ）を、ＵＮｃｌｅ（登録商標）（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ）で既定の「選別と多分散性の方法（Ｓｉｚｉｎｇ　ａｎｄ　Ｐｏｌｙｄｉｓｐｅｒｓｉｔｙ　ｍｅｔｈｏｄ）」を用いて実施した。８．８μＬのＡｂＣを、提供されたクラスキュベット中にピペットで添加した。ＤＬＳ測定を、２５℃で三回行い、インキュベーション時間は１秒であり；結果を、各回にわたり平均し、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いてプロットした。推定される流体力学的直径を、下に示す全てのＤＬＳピークの隣に列挙する。

【０１２５】

Ｆｃ　ＡｂＣおよびＩｇＧ　ＡｂＣのＮＳ－ＥＭ分析

ｏ４２．１　Ｆｃおよびｉ５２．３　Ｆｃを除くすべての試料について、ＴＢＳ（ｐＨ８．０）中で０．００８～０．０１４ｍｇ／ｍＬの各ＳＥＣ精製された試料の３．０μＬを、４００－メッシュまたは２００－メッシュのＣｕグリッドグロー放電炭素コーティング銅グリッドに２０秒間載せ、その後３．０μＬの２％のｎａｎｏ－Ｗ　ｓｔａｉｎを２回適用した。顕微鏡写真を、公称倍率６７，０００（画素サイズ、１．６Å／画素）または公称倍率５２，０００（画素サイズ、２．０７Å）で、１．５～２．５μｍのデフォーカス範囲にて、Ｇａｔａｎ　Ｕｌｔｒａｓｃａｎ（登録商標）４０００　４ｋ　×　４ｋ　ＣＣＤカメラを搭載する１２０ｋＶ　ＦＥＩ　Ｔｅｃｎａｉ　Ｇ２　Ｓｐｉｒｉｔ（登録商標）でＬｅｇｉｎｏｎソフトウェアを用いて記録した。粒子を、ＤｏＧＰｉｃｋｅｒまたはｃｉｓＴＥＭのいずれかを用いて選別した；両方とも無参照ピッカーである。コントラスト伝達関数を、ＧＣＴＦまたはｃｉｓＴＥＭを用いて推定した。２Ｄクラス平均を、ｃｒｙｏＳＰＡＲＣまたはｃｉｓＴＥＭで生成した。各データセットからの選択された２Ｄクラス平均の無参照アブイニシオ３Ｄ再構成を、ｃｒｙｏＳＰＡＲＣまたはｃｉｓＴＥＭで実施した（表１０）。

【０１２６】

【表１１】

表１０：異なるナノケージ試料のデータ収集およびデータ処理の詳細

試料の名称	染色	電圧(kV)	拡大倍率	画素サイズ(Å/画素)	粒子選別	CTFの推定	2Dクラス平均	3D再構築
d2.3 Fc	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
d2.4 Fc	UF	120	67,000	1.6	DoG picker	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
d2.7 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
t32.4 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
t32.8 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
o42.1 Fc	cryo	200	36,000	1.16	用手選択	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
i52.3 Fc	cryo	200	36,000	1.16	用手選択	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
i52.6 Fc	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
d2.3 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
d2.4 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
d2.7 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
t32.4 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
t32.8 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
o42.1 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	DoG picker	GCTF	cryoSPARC	N/A
i52.3 hIgG1	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
i52.6 hIgG1	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cryoSPARC	N/A
D3-08 Fc	nano-W	120	57,000	2.52	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
D3-36 Fc	nano-W	120	57,000	2.52	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM

【０１２７】

ｏ４２．１　ＡｂＣおよびｉ５２．３　ＡｂＣの低温ＥＭ分析

１００ｍＭアルギニンを含有するＴＢＳ（ｐＨ８．０）中の０．８ｍｇ／ｍＬでのｉ５２．３　Ｆｃ試料の３．０μＬを、Ｃ－ｆｌａｔ　１．２μｍグロー放電銅グリッドに載せた。グリッドを次いで、ブロッティング時間＝６秒およびブロッティング力＝０でＦＥＩ　ＭＫ４　Ｖｉｔｒｏｂｏｔを用いて、液体窒素で冷却した液体エタン中でプランジ凍結した。このブロッティング過程は、２０℃かつ１００％湿度でＶｉｔｒｏｂｏｔチャンバー内で行われた。データの取得を、２００ｋＶでのＦＥＩ　Ｔａｌｏｓ電子顕微鏡およびＧａｔａｎ　Ｋ２　Ｓｕｍｍｉｔカメラで、Ｌｅｇｉｎｏｎデータ収集ソフトウエアに

より実施した。公称倍率は３６，０００×であり、画素サイズは１．１６Å／画素であった。線量率を、８カウント／画素／秒に調整した。各動画を、２００ミリ秒／フレームの５０フレームに分割されるカウンティングモードで取得した。フレームの整列を、ＭｏｔｉｏｎＣｏｒｒ２で行った。粒子を、Ａｐｐｉｏｎインターフェイス内で用手的に選別した。デフォーカスパラメーターを、ＧＣＴＦで推定した。ｃｒｙｏＳＰＡＲＣによる無参照２Ｄ分類を用いて、ｃｒｙｏＳＰＡＲＣでのアブイニシオ３Ｄ再構成関数のために粒子のサブセットを選択した。

【０１２８】

データの収集および処理の概要を、表１１に示す。

【０１２９】

ＤＲ５およびＡ１Ｆ－Ｆｃの実験

細胞培養

結腸直腸腺癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５、および腎細胞癌細胞株ＲＣＣ４を、ＡＴＣＣから取得した。初代腎尿細管上皮細胞ＲＡＭ００９は、Ａｋｉｌｅｓｈ博士（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）から提供された。Ｃｏｌｏ２０５細胞を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）およびペニシリン／ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ１６４０培地で増殖させた。ＲＣＣ４細胞を、１０％ＦＢＳおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地で増殖させた。ＲＡＭ００９を、１０％ＦＢＳ、ＩＴＳ－サプリメント、ペニシリン／ストレプトマイシンおよび非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ）を含むＲＰＭＩで増殖させた。全ての細胞株を、５％CO_2を含む高湿環境下３７℃で維持した。

【０１３０】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ、Ｌｏｎｚａ、Ｇｅｒｍａｎｙ、カタログ番号Ｃ２５１９ＡＳ）を、ＥＧＭ２培地中で０．１％ゼラチンでコートした３５ｍｍ細胞培養ディッシュで増殖させた。簡単に説明すると、ＥＧＭ２は、２０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、１％Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号３５０５００６１）、１％内皮細胞増殖因子（３１）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、７．５ｍＭＨＥＰＥＳ、０．０８ｍｇ／ｍＬヘパリン、０．０１％アンフォテリシンＢ、最終容積中で５．６ｍＭのグルコース濃度となるようにグルコースを加えたまたは加えない１×　ＲＰＭＩの混合物、から成る。培地を、０．４５μｍフィルターで濾過した。継代７でのＨＵＶＥＣを、Ｔｉｅ２シグナル伝達および細胞遊走実験で用いた。継代６のＨＵＶＥＣを、管形成アッセイで用いた。

【０１３１】

カスパーゼ－３／７Ｇｌｏアッセイ

細胞を、トリプシンを用いて継代し、２０，０００細胞／ウェルを、９６穴白色組織培養プレートに播種し、適切な培地中で増殖させた。培地、翌日に交換し（１００μＬ／ウェル）、細胞を、非ケージ型α－ＤＲ５　ＡＭＧ６５５抗体（１５０ｎＭ）、組み換えヒトＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ｒｈＴＲＡＩＬ；１５０ｎＭ）、ＦｃのみのＡｂＣまたはα－ＤＲ５　ＡｂＣ（１５０ｎＭ、１．５ｎＭ、１５ｐＭ）のいずれかで処理し、３７℃で２４時間インキュベートした。翌日に、１００μＬ／ウェルのカスパーゼＧＬＯ（登録商標）試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、ＵＳＡ）を、培地の上に添加し、３７℃で２時間インキュベートした。発光を次いで、Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｎＶｉｓｉｏｎマイクロプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて記録した。統計的比較を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）を用いて実施した（全詳細については表１１を参照のこと）。

【０１３２】

【表１２】

表１１：ＤＲ５実験に関する統計情報

実験（図）	条件	濃度	n	検定	比較された平均	α	概要	調整されたP値
カスパーゼ-3,7 RCC4 (4b)	PBS	15 pM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
		1.5 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9994
	TRAIL	15 pM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		1.5 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9668
	α-DR5	15 pM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9997
		1.5 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.2005
	d2.4 α-DR5	15 pM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9995
		1.5 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9988
		150 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	t32.4 α-DR5	15 pM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9998
		1.5 nM	6	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001

		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	t32.8 α-DR5	15 pM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.984
		1.5 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.6177
		150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	o42.1 α-DR5	15 pM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9991
		1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	i52.3 α-DR5	15 pM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9442
		1.5 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.8227
		150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
生存率4日目 RCC4 (4c)	PBS	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	TRAIL	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.5207
	α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996
	d2.4 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	*	0.0238
	t32.4 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	t32.8 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001

	o42.1 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	i52.3 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0079
生存率4日目 dRCC4 Fc ケージ (4d)	PBS	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	d2.4 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.7157
	t32.4 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9976
	t32.8 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.8556
	o42.1 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.2309
	i52.3 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9302
生存率6日目 RCC4 (4e)	PBS	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	TRAIL	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996
	α-DR5	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	>0.9999
	t32.4 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9591
	o42.1 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9593
	t32.4 α-DR5	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	o42.1 α-DR5	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	***	0.0001
c-PARP 定量 (4g)	PBS	150 nM	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A

	TRAIL	150 nM	4	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.0845
	α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.4746
	o42.1 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9979
	o42.1 α-DR5	150 nM	3	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
カスパーゼ-3,7 Colo205	PBS	15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
		1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
	TRAIL	15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	***	0.0006
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	α-DR5	15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9997
		1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
	d2.4 α-DR5	15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001

		15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.1074
	t32.4 α-DR5	1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
	t32.8 α-DR5	1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	0.6538
	o42.1 α-DR5	1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		15 pM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
	i52.3 α-DR5	1.5 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	二元配置分散分析ダネットの事後検定	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
カスパーゼ-3,7 RCC4 Fc	PBS	150 nM	3	一元配置分散分析ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	d2.4 Fc	150 nM	6	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	*	0.0129
	t32.4 Fc	150 nM	6	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	*	0.046
	t32.8 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9198

	o42.1 Fc	150 nM	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.2112
	i52.3 Fc	150 nM	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996
RAM009 カスパーゼ-3,7	PBS	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	N/A	N/A
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.3848
	TRAIL	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9726
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.0525
	α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9566
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.2752
	d2.4 α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9677
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0076
	t32.4 α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9703
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0028
	t32.8 α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0067
	o42.1 α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9991
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0038

	i52.3 α-DR5	1.5 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9994
		150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	***	0.0006
	d2.4 Fc	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9966
	t32.4 Fc	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9997
	t32.8 Fc	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9992
	o42.1 Fc	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9994
	i52.3 Fc	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9995
RAM009 生存率	PBS	150 nM	6	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05		
	TRAIL	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9901
	α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9995
	d2.4 α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996
	t32.4 α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9212
	t32.8 α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.7875
	o42.1 α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.7485
	i52.3 α-DR5	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.1419
	d2.4 Fc	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9996

	t32.4 Fc	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9718
	t32.8 Fc	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.999
	o42.1 Fc	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9913
	i52.3 Fc	150 nM	3	二元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9837

【０１３３】

Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏ細胞生存アッセイ（４日目生存率）

細胞を、２０，０００細胞／ウェルで９６穴プレートに播種した。翌日、細胞を、４日間１５０ｎＭのα－ＤＲ５　ＡｂＣ、ｒｈＴＲＡＩＬおよびα－ＤＲ５抗体で処理した。４日目に、１００μＬのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．ＵＳＡ、＃Ｇ７５７０）を、ウェル当たり１００μＬの培地に添加し、３７℃で１０分間インキュベートし、発光を、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダーを用いて測定した。

【０１３４】

Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ細胞生存アッセイ（６日目生存率）

細胞を、５０，０００細胞／ウェルで１２穴組織培養プレートに播種した。翌日、細胞を、１５０ｎＭ濃度にてα－ＤＲ５　ＡｂＣｓ、ｒｈＴＲＡＩＬ、またはα－ＤＲ５抗体で処理した。３日後に、細胞を、３０，０００細胞／ウェルで継代し、３日間１５０ｎＭのα－ＤＲ５ケージ、ｒｈＴＲＡＩＬおよびα－ＤＲ５抗体で処理した。６日目に、培地を、４５０μＬ／ウェルの新鮮培地で置き換え、５０μＬのＡｌａｍａｒ（登録商標）ｂｌｕｅ試薬（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＳＡ、＃ＤＡＬ１０２５）を、次いで添加した。３７℃での４時間のインキュベーションの後に、５０μＬの培地を、９６穴乳白色プレートに移し、蛍光強度を、製造元の指示にしたがいプレートリーダーを用いて測定した。

【０１３５】

蛋白質分析

細胞を、４０，０００細胞／ウェルで１２穴プレートに継代し、細胞被覆率が８０％に達するまで増殖させた。処理前に、培地を、５００μＬの新鮮培地と交換した。ＤＲ５実験については、培地に、ＡＭＧ－６５５抗体およびｒｈＴＲＡＩＬを、１５０ｎＭの濃度で添加し、Ｆｃのみのナノケージまたはα－ＤＲ５ナノケージを、１５０ｎＭ、１．５ｎＭおよび１５ｐＭの濃度で添加し、蛋白質単離の前に３７℃で２４時間インキュベートした。

【０１３６】

死細胞を含む培地を、１．５ｍｌエッペンドルフチューブに移し、細胞を、１×　リン酸緩衝生理食塩水で穏やかにすすいだ。１×　トリプシンを、３分間細胞に加えた。全ての細胞を、死細胞を有する培地を含み１．５ｍＬエッペンドルフ中に集めた。細胞を、ＰＢＳ　１×で１回洗浄し、それらのそれぞれのチューブ中で、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５％グリセロール、１％　Ｔｒｉｔｏｎ、３％　ＳＤＳ、２５ｍＭ　β－グリセロリン酸塩、５０ｍＭ　ＮａＦ、１０ｍＭ　ピロリン酸ナトリウム、０．５％オルトナジウム酸塩、１％　ＰＭＳＦ（全ての化学物質はＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯから）、２５Ｕベンゾナーゼヌクレアーゼ（ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｇｉｂｂｓｔｏｗｎ、ＮＪ）、プロテアーゼ阻害

剤カクテル（Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標）プロテアーゼ阻害剤ミニ錠剤、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＳＡ）、およびホスファターゼ阻害剤カクテル２（カタログ番号Ｐ５７２６）を含む７０μＬの溶解緩衝液を用いて溶解した。全蛋白質試料を次いで、１μＬのベンゾナーゼ（Ｎｏｖａｇｅｎ、ＵＳＡ）で処理し、３７℃で１０分間インキュベートした。１０％βメルカプトエタノールを含む２１．６μＬの４× Ｌａｅｍｍｌｉ試料緩衝液（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＵＳＡ）を、細胞溶解物に添加し、その後、９５℃で１０分間加熱した。沸騰させた試料を、ウエスタンブロット分析に用いた、あるいは－８０℃で保存した。

【０１３７】

Ａ１Ｆ－Ｆｃの生産

合成遺伝子を、哺乳動物での発現のために最適化し、ＣＭＶ／Ｒベクター（ＶＲＣ８４００；ＰＭＩＤ：１５９９４７７６）にサブクローン化した。ＸｂａＩ制限部位およびＡｖｒＩＩ制限部位を、Ａ１Ｆ－Ｆｃの挿入のために用いた。遺伝子の合成とクローニングを、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔにより行った。Ｅｘｐｉ２９３細胞を、１５０ＲＰＭ、５％CO_2、湿度７０％、３７℃にてＥｘｐｉ２９３発現培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて懸濁液で、増殖させた。約２．５×10^6細胞／ｍＬの細胞被覆率で、細胞を、形質転換試薬としてＰＥＩ ＭＡＸ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、Ａ１Ｆ－Ｆｃをコードするベクター（細胞１Ｌ当たり１０００μｇ）細胞で形質転換した。細胞を、９６時間インキュベートし、その後それらを、遠心分離（４，０００×ｇ、１０分間、４℃）により沈降させ、蛋白質を含む上清を、真空濾過（０．４５μｍ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｓｉｇｍａ）でさらに澄明化した。ニッケル親和性クロマトグラフィー工程の準備では、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ、３５０ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）を、澄明化上清に加えた。上清の各リットル当たり、４ｍＬのＮｉ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）エクセル樹脂（ＧＥ）を、上清に添加し、その後４℃で一晩振盪した。１６～２４時間後に、樹脂を、混合物から収集し分離し、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、３００ｍイミダゾール（ｐＨ８．０）で所望の蛋白質を溶出する前に、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、３０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）で２回洗浄した。溶出液を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００Ｉｎｃｒｅａｓｅカラムを用いるＳＥＣにより精製した。

【０１３８】

ウエスタンブロット法

蛋白質試料を、解凍し９５℃で１０分間加熱した。ウェル当たり１０μＬの蛋白質試料を、４～１０％ ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに載せ２５０ボルトで３０分間分離した。蛋白質を次いで、セミドライターボ転写ウエスタンブロット装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＵＳＡ）を用いて、ニトロセルロース膜に１２分間転写した。転写後に、膜を、５％脱脂粉乳中で１時間ブロックした。１時間後に、膜を、それぞれの抗体で調べた：切断されたＰＡＲＰ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）、１：２０００希釈にて；ｃＦＬＩＰ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、ＵＳＡ）、１：１０００希釈にて；ｐＥＲＫ１／２（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、１：５０００希釈にて；ｐＦＡＫ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、１：１０００希釈にて；ｐ－ＡＫＴ（Ｓ４７３）（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、１：２０００希釈にて；およびアクチン（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）、１：１０，０００希釈にて。それとは別に、ｐ－ＡＫＴ（Ｓ４７３）については、膜を、５％ＢＳＡで３時間ブロックし、その後１次抗体を添加した。膜と１次抗体を、振盪機で４℃にて、一晩インキュベートした。翌日、膜を、１× ＴＢＳＴ（３回、１０分間間隔）で洗浄し、それぞれのＨＲＰ共役２次抗体（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＵＳＡ）（１：１０，０００）を、添加し、室温で１時間インキュベートした。ｐ－ＡＫＴ（Ｓ４７３）については、洗浄後に、膜を、５％乳汁中で室温１時間ブロックし、次いで、２時間５％乳汁中で調製したそれぞれのＨＲＰ共役２次抗体（１：２０００）中でインキュベートした。２次抗体とのインキュベーション後に、すべての膜を、１× ＴＢＳＴ（３解、１０分間間隔）で洗浄し、Ｌｕｍｉｎｏｌ試薬を用いて現像し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＣｈｅｍｉＤｏｃ（登録

商標）撮像装置を用いて撮像した。データを、ＩｍａｇｅＪ（登録商標）ソフトウエアを用いて定量して、バンド強度を分析した。定量を、各バンドのピーク面積を算出することにより行った。各シグナルを、同じゲルのそのレーンからのアクチン定量に対し正規化して、ゲル間の比較を可能にした。倍数変化を次いで、Ａ１Ｆ－Ｆｃのウエスタンブロットについて報告されたｐＡＫＴ（比較のための充分なｐＡＫＴシグナルがなかったため、ｏ４２．１　Ａ１Ｆ－Ｆｃを正規化に用いた）を除くすべての試料について、ＰＢＳと比較して算出した。統計的比較を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）を用いて実施した（全詳細については表１１、１２を参照のこと）。

【０１３９】

細胞遊走（「スクラッチ」）アッセイ

継代７のＨＵＶＥＣを、３５ｍｍの、０．１％ゼラチンコートしたプレートに播種し、ＥＧＭ－２中で培養した。細胞の単層が確立されたら、引っ掻き傷を、２００μＬピペットの先を用いて細胞層につける。培地を、２％ウシ胎仔血清を補充したＤＭＥＭ低グルコースに交換する。足場を、１８ｎＭのＡ１Ｆ－Ｆｃ濃度で培地に添加した。撮像を、０時間および１２時間の時点で位相差下１０×の倍率にてＬｅｉｃａ顕微鏡で行った。画像を、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを用いて定量して、初期創傷領域に対する創傷領域における変化の比として、細胞遊走のレベルを算出する。細胞遊走のレベルを、ＰＢＳに対して正規化した。統計的比較を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて実施した（全詳細については、表１２を参照のこと）。

【０１４０】

【表１３】

表１２：Ａ１Ｆ－Ｆｃ実験についての統計情報

実験(図)	条件	n	検定	それに対し比較された平均	α	概要	調整されたＰ値
pAKT (4j, 9c (H8))	PBS	13	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	>0.9999
	o42.1 Fc	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	>0.9999
	i52.3 Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	>0.9999
	o42.1 A1F-Fc	9	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	i52.3 A1F-Fc	8	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	H8-A1F	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
pERK1-2 (4j; 9c (H8))	PBS	13	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9997
	o42.1 Fc	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9957
	i52.3 Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9997

	o42.1 A1F-Fc	9	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	**	0.0032
	i52.3 A1F-Fc	8	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	H8-A1F	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	*	0.0112
血管安定性 (4k; 9c (H8))	PBS	7	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.9932
	o42.1 Fc	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	>0.9999
	i52.3 Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	ns	0.8699
	o42.1 A1F-Fc	6	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	***	0.0006
	i52.3 A1F-Fc	5	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	****	<0.0001
	H8-A1F	4	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	PBS	0.05	*	0.0208
pAKT (HS exp.)	PBS	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	o42.1 A1F-Fc	0.05	***	<0.0001
	o42.1 A1F-Fc	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	o42.1 A1F-Fc	0.05	N/A	N/A
	10% HS	3	一元配置分	o42.1	0.05	***	0.0002

			散分析 ダネットの事後検定	A1F-Fc			
	o42.1 A1F-Fc 10% HS 4° C	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	o42.1 A1F-Fc	0.05	ns	0.9431
	o42.1 A1F-Fc 10% HS	3	一元配置分散分析 ダネットの事後検定	o42.1 A1F-Fc	0.05	ns	0.9998

【０１４１】

管形成アッセイ（血管安定性）

管形成を、Ｌｉａｎｇら（２００７）からの修正プロトコルを用いて行った。簡単に説明すると、継代数６のＨＵＶＥＣを、２４時間０．５％ＦＢＳを補充した低グルコースＤＭＥＭ培地中で、８９ｎＭのＡ１Ｆ－Ｆｃ濃度での足場またはＰＢＳと共に１５０，０００細胞／ウェルの密度で、１５０μＬの１００％冷マトリゲル（登録商標）（Ｃｏｒｎｉｎｇ、ＵＳＡ）で事前コートされた２４穴プレートに播種した。２４時間の時点で、古い培地を、吸引し、足場なしの新鮮な培地と交換した。細胞を、７２時間までインキュベートし続けた。細胞を、４８時間および７２時間の時点で、位相差下、１０Ｘの倍率にてＬｅｉｃａの顕微鏡を用いて撮像した。その後、管形成を、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアの血管形成分析プラグインを用いてノード数、メッシュ数および管数を算出することにより定量した。血管安定性を、ノード数、メッシュ数および管数を平均すること、次いでＰＢＳに対して正規化することにより算出した。統計的比較を、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）を用いて実施した（全詳細については、表１２を参照のこと）。

【０１４２】

免疫細胞活性化の材料と方法

ＣＤ４０発光アッセイ

非作動性抗体（クローンＬＯＢ７／６、製品コードＭＣＡ１５９０Ｔ、ＢｉｏＲａｄ）を、上記のような八面体ｏ４２．１　ＡｂＣ形成設計物と組み合わせ、ＡｂＣを、ＤＬＳおよびＮＳ－ＥＭにより特徴付けた（図５）。陰性対照ｏ４２．１　ＡｂＣを、ＲＳＶスパイク蛋白質（４５）に結合する非ＣＤ４０結合性ＩｇＧ（ｍｐｅ８）を用いて作成した。これら２種類のＡｂＣを、非ケージＬＯＢ７／６および陽性対照ＣＤ４０活性化ＩｇＧ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｋ１１８Ａ）と共に、希釈して、１．２μＭで始まる三重の技術的反復のために、１０点の、３倍希釈系列をで調製した。陽性対照のＣＤ４０活性化ＩｇＧ（Ｋ１１８Ａ）は、マウスＩｇＧ１ａ抗体であり、そのためそれは、おそらくプロテインＡとｍＩｇＧ１ａの間の低結合性界面に起因してｏ４２．１設計物とのアセンブリには適合性でなかった（データ非提示）。

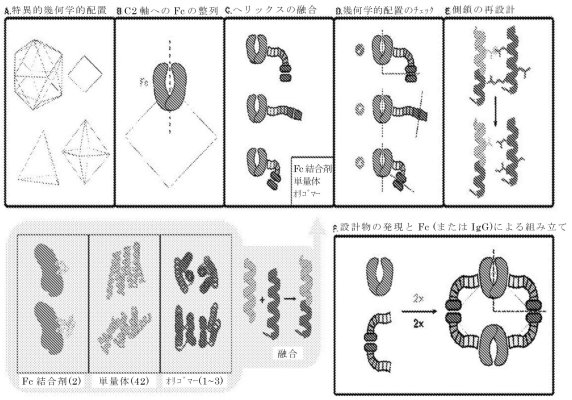
【０１４３】

ＣＤ４０活性化をアッセイするために、ＩｇＧ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ＪＡ２１５１）などの外部刺激に対するＣＤ４０応答の効力を測定する生物発光細胞アッセイのための製造元の指示にしたがった。簡単に説明すると、アッセイプロトコルにしたがって、ＣＤ４０エフェクターチャイニーズ・ハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を培養し、試薬を調製した。抗体およびＡｂＣを、３７℃、５％CO_2で８時間ＣＤ４０エフェクターＣＨＯ細胞と共にインキュベートした。アッセイキットに含まれるＢｉｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｇ７９４１）を用いて、プレートリーダーからの発光読み取りから、ＣＤ４０の活性化を視覚化した。Ｂｉｏ－Ｇｌｏ（登録商標）試薬を、細胞に添加し、発光を、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２プレートリーダーで３０分間、毎分、検出した。デ

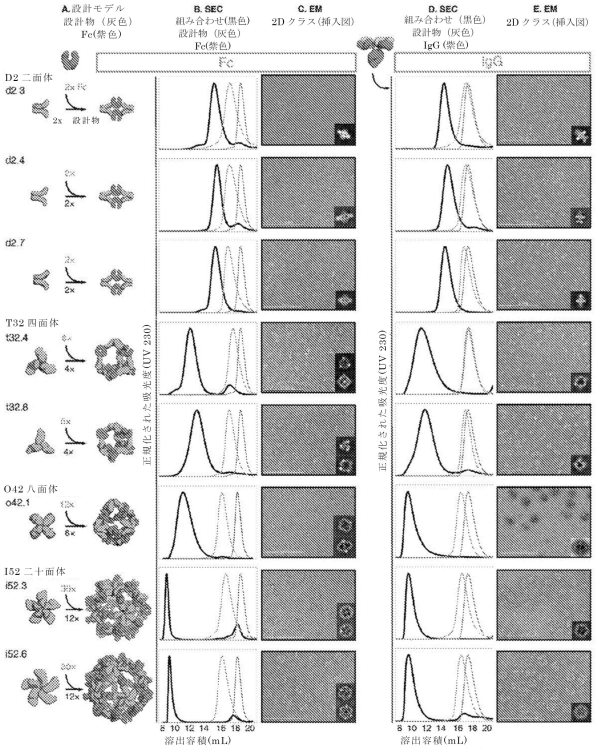
ータを、繰り返し測定間で発光を平均することおよびプレートのバックグラウンドを減算することにより分析した。ＣＤ４０結合応答の倍数誘導を、抗体を含まない対照のＲＬＵに対して正規化された試料のＲＬＵにより決定した。データ曲線をプロットし、ＥＣ５０を、応答に対するｌｏｇ（作用薬）（変数スロープ（４種類のパラメータ））を用いるＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）を用いて算出した；ＥＣ５０値および９５％ＣＩ値については、表７を参照のこと。

【図面】

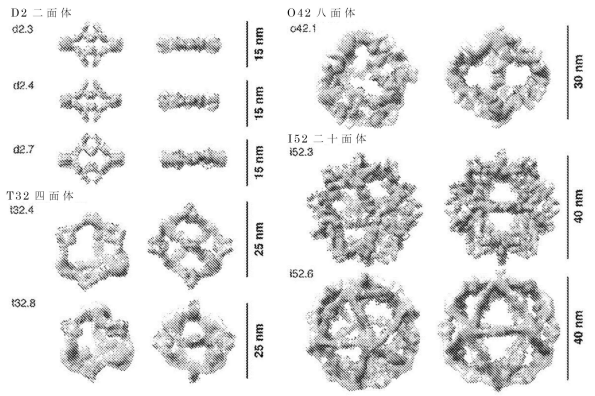
【図１】



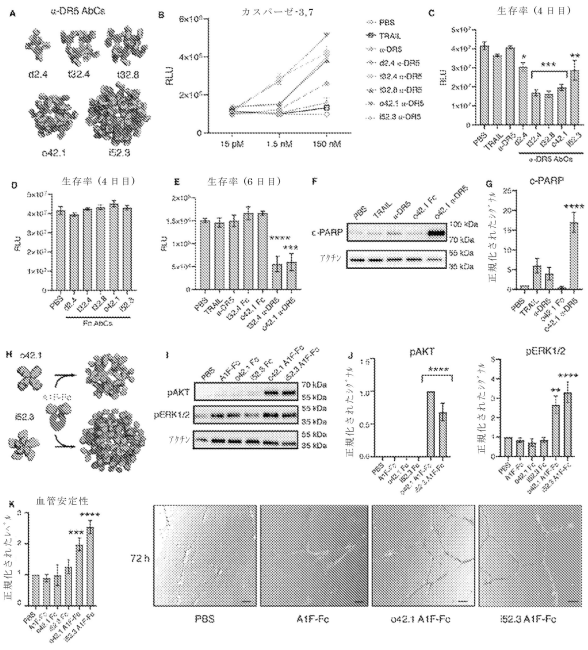
【図２】



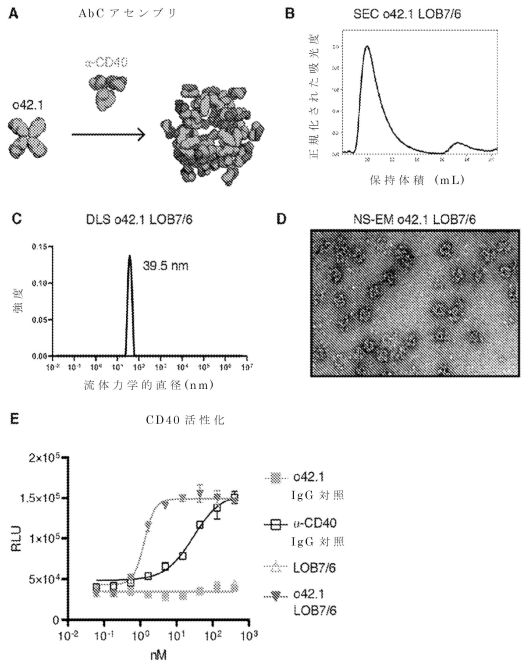
【図３】



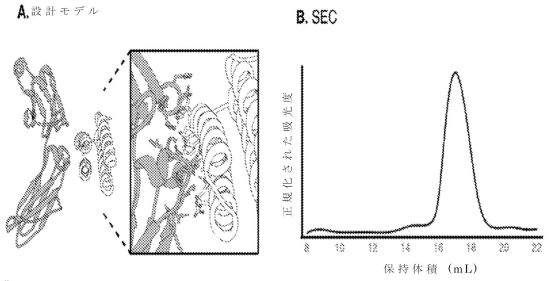
【図４】



【図５】

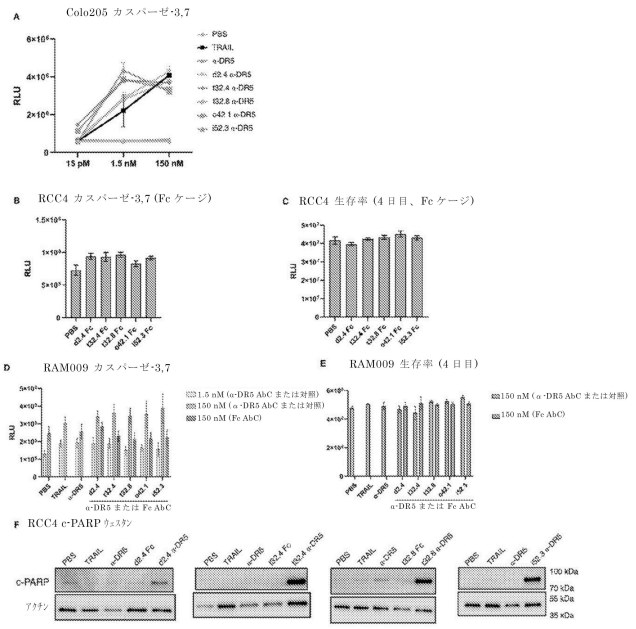


【図６】

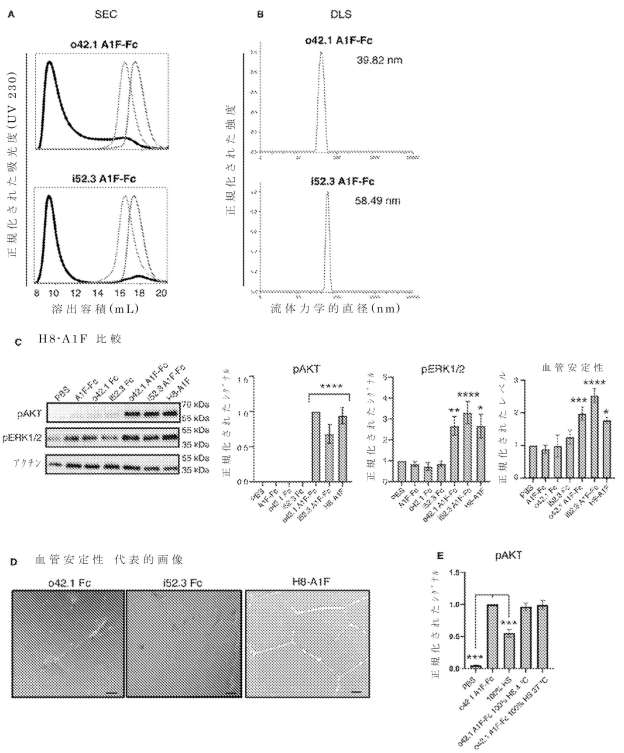


標的	K_D (M)	K_D 誤差	k_{on} (1/Ms)	k_{on} 誤差	k_{dis} (1/s)	k_{dis} 誤差
Fc	1.13E-07	7.69E-09	7.30E+05	4.74E+04	8.25E-02	1.68E-03
IgG1	7.17E-08	1.24E-09	5.44E+05	9.03E+03	3.90E-02	1.92E-04

【図７】


A
Colo205 カスパーゼ-3,7
RLU
PBS
TRAIL
α-DR5
i52.4 α-DR5
i52.4 α-DR5
i52.8 α-DR5
o42.1 α-DR5
i52.3 α-DR5
15 pM
1.5 nM
150 nM
B
RCC4 カスパーゼ-3,7 (Fc ケージ)
C
RCC4 生存率 (4 日目、Fc ケージ)
D
RAM009 カスパーゼ-3,7
1.5 nM (α-DR5 AbC または対照)
150 nM (α -DR5 AbC または対照)
150 nM (Fc AbC)
α-DR5 または Fc AbC
E
RAM009 生存率 (4 日目)
150 nM (α -DR5 AbC または対照)
150 nM (Fc AbC)
α-DR5 または Fc AbC
F
RCC4 c-PARP ウェスタン
c-PARP
アクチン
100 kDa
70 kDa
55 kDa
35 kDa

【図８】


A
SEC
o42.1 A1F-Fc
i52.3 A1F-Fc
正規化された吸光度 (UV 230)
溶出容積 (mL)
B
DLS
o42.1 A1F-Fc
39.82 nm
i52.3 A1F-Fc
58.49 nm
正規化された強度
流体力学的直径 (nm)
C
H8-A1F 比較
pAKT
pERK1/2
アクチン
70 kDa
55 kDa
35 kDa
正規化されたシグナル
血管安定性
正規化されたレベル
D
血管安定性 代表的画像
o42.1 Fc
i52.3 Fc
H8-A1F
E
pAKT
正規化されたシグナル
PBS
A1F-Fc
o42.1 A1F-Fc + 100% HS
o42.1 A1F-Fc 100% HS 37 °C
i52.3 A1F-Fc 100% HS 37 °C

【手続補正書】
【提出日】令和５年２月１６日(２０２３.２.１６)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
20235315940000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/036117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 A61K9/51 C07K14/32 C07K14/435 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C12R C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HYO JIN KANG ET AL: "Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatform", BIOMATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 33, no. 21, 15 March 2012 (2012-03-15), pages 5423-5430, XP028487151, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.03.055 [retrieved on 2012-03-20] throughout, e.g. abstract, Materials and Methods ----- -/--	1-27, 32-62

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 October 2021	19/01/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Wimmer, Georg

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/036117

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM HANSOL ET AL: "Development of an antibody-binding modular nanoplatform for antibody-guided targeted cell imaging and delivery", RSC ADVANCES, vol. 6, no. 23, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 19208-19213, XP055842694, GB ISSN: 2046-2069, DOI: 10.1039/C6RA00233A throughout, e.g. abstract, pg. 19209	1-27, 32-62
X	LIM SUNG IN ET AL: "Self-assembled protein nanocarrier for intracellular delivery of antibody", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 249, 7 January 2017 (2017-01-07), pages 1-10, XP029927777, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2017.01.007 throughout, e.g. abstract, introduction, pgs. 3-6	1-27, 32-62
X	US 2019/240282 A1 (BALDWIN GEOFFREY [GB] ET AL) 8 August 2019 (2019-08-08) [0082]-[0085]	1-27, 32-62
X	JESSICA MARCANDALLI ET AL: "Induction of Potent Neutralizing Antibody Responses by a Designed Protein Nanoparticle Vaccine for Respiratory Syncytial Virus", CELL, vol. 176, no. 6, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 1420-1431.e17, XP055699521, Amsterdam NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.046 throughout, e.g. abstract, pgs. 1421-1425	1-27, 32-62

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/036117

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/036117

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

1-27, 32-62(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2021/036117

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27, 32-62(all partially)

A particle comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence at least 50% identical to SEQ ID NO. 1, and any one of
- a plurality of Tie2 receptor domain antibodies comprising Fc domains
- dimers of fibrinogen-like domain derived from angiopoietin fused to an Fc domain
- a plurality of anti-TNFRSF antibodies comprising Fc domains

---

2-9. claims: 1-27, 32-62(all partially)

As invention 1, but with SEQ ID NOs. 2-9, respectively.

---

10. claims: 28-33(partially)

A polypeptide comprising SEQ ID NO 17.

---

11. claims: 28-33(partially)

A polypeptide comprising SEQ ID NO 18.

---

12. claims: 28-33(partially)

A polypeptide comprising SEQ ID NO 47.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/036117

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2019240282 A1	08-08-2019	EP 3528849 A1	28-08-2019
		GB 2555131 A	25-04-2018
		JP 2019535246 A	12-12-2019
		US 2019240282 A1	08-08-2019
		WO 2018073593 A1	26-04-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 14/78 (2006.01)		C07K	14/78	
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	A
A61P 31/04 (2006.01)		A61K	39/395	H
A61P 31/12 (2006.01)		A61P	31/04	
A61P 11/00 (2006.01)		A61P	31/12	
A61P 13/12 (2006.01)		A61P	11/00	
A61P 27/02 (2006.01)		A61P	13/12	
A61P 9/00 (2006.01)		A61P	27/02	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	9/00	
A61K 9/51 (2006.01)		A61P	35/00	
		A61K	9/51	

(32)優先日　令和2年10月7日(2020.10.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/088,576
(32)優先日　令和2年10月7日(2020.10.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　ウエダ，ジョージ
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　ラザロヴィッツ，ジェームズ
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　ファラス，ジョージ
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　ベイカー，デイビッド
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　ルオホラ－ベイカー，ハンネレ
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　ディヴァイン，ロバート
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー，ユニバーシティー　オブ　ワシントン内
(72)発明者　チャオ，ヤン（ブレア），ティン
アメリカ合衆国，ワシントン州　９８１０５－４７２１，シアトル，スイート　４００，４５４５

ルーズベルト ウェイ エヌイー，ユニバーシティー オブ ワシントン内
(72)発明者 マチュー，ジュリー
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，スイート ４００，４５４５
ルーズベルト ウェイ エヌイー，ユニバーシティー オブ ワシントン内
(72)発明者 キング，ニール，ピー．
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，スイート ４００，４５４５
ルーズベルト ウェイ エヌイー，ユニバーシティー オブ ワシントン内
(72)発明者 トゥーリー，マルティ，レイ
アメリカ合衆国，ワシントン州 ９８１０５－４７２１，シアトル，スイート ４００，４５４５
ルーズベルト ウェイ エヌイー，ユニバーシティー オブ ワシントン内

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA65 BB01 BB13 BB15 BB16 CC10 CC15 CC17 CC31 CC35
EE41 FF70
4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 EE01 EE03 EE05 GG01 GG02 GG03
GG04 GG06 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA72
FA74