

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534853
(P2024-534853A)

(43)公表日 令和6年9月26日(2024.9.26)

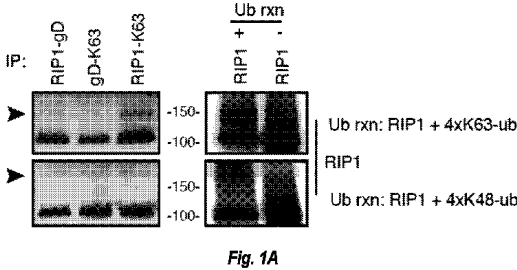
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全145頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-513293(P2024-513293)			(71)出願人	509012625
(86)(22)出願日	令和4年8月29日(2022.8.29)				ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年4月15日(2024.4.15)				アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86)国際出願番号	PCT/US2022/075595				ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87)国際公開番号	WO2023/034750				ウェイ 1
(87)国際公開日	令和5年3月9日(2023.3.9)			(74)代理人	110002077
(31)優先権主張番号	63/238,749				園田・小林弁理士法人
(32)優先日	令和3年8月30日(2021.8.30)			(72)発明者	マツモト, マリッサ リン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(31)優先権主張番号	63/247,776				8 0, サウス サンフランシスコ, デ
(32)優先日	令和3年9月23日(2021.9.23)				ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(72)発明者	ジェネンテック, インコーポレイテッド
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				ヴチッチ, ドマゴイ
	最終頁に続く				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
					8 0, サウス サンフランシスコ, デ
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ポリビキチン多重特異性抗体

(57)【要約】

ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び受容体相互作用プロテインキナーゼ1（RIP1）又は受容体相互作用プロテインキナーゼ2（RIP2）などの炎症促進性タンパク質に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む多重特異性抗体、並びに該抗体を使用するための方法が提供される。

【選択図】 図1 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、ポリユビキチンを含み、ポリユビキチンに結合する第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の半抗体；及び炎症促進性タンパク質に結合する第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の半抗体を含む少なくとも 1 つの多特異性抗体に該試料を曝露することと、該試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する少なくとも 1 つの抗体の結合を決定することを含む、方法。

【請求項 2】

10

ポリユビキチン化タンパク質が、M 1 結合型ポリユビキチン及び／又は K 6 3 結合型ポリユビキチンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

炎症促進性タンパク質が 1 つ以上のシグナル伝達複合体の成分である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

炎症促進性タンパク質が、受容体相互作用プロテインキナーゼ 1 (R I P 1)、受容体相互作用プロテインキナーゼ 2 (R I P 2)、アポトーシスの細胞阻害剤 1 及び 2 (c - I A P 1 / 2)、腫瘍壊死因子受容体 1 (T N F R 1)、直鎖状ユビキチン鎖集合複合体 (L U B A C)、及び／又は核因子カッパ B (N F - κ B) 必須モジュレーター (N E M O) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

炎症促進性タンパク質が R I P 1 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

炎症促進性タンパク質が R I P 2 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において上昇したユビキチン化レベルを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

30

炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、1 倍 ~ 12 倍、2 倍 ~ 12 倍、3 倍 ~ 12 倍、4 倍 ~ 12 倍、5 倍 ~ 12 倍、6 倍 ~ 12 倍、7 倍 ~ 12 倍、8 倍 ~ 12 倍、9 倍 ~ 12 倍、10 倍 ~ 12 倍、又は 11 倍 ~ 12 倍のユビキチン化レベルを有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ユビキチン化のレベルの上昇が、炎症性疾患状態の重症度の増加と相関する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

40

炎症促進性タンパク質が、炎症性腸疾患、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に関連している、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

炎症促進性タンパク質がクローン病に関連している、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

炎症促進性タンパク質が潰瘍性大腸炎に関連している、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ポリユビキチンに結合する第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の半抗体；及び受容体相互作

50

用プロテインキナーゼ 1 (RIP1) に結合する第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の半抗体を含む多重特異性抗体。

【請求項 14】

ポリユビキチン化 RIP1 を選択的に認識する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

受容体相互作用プロテインキナーゼ 2 (RIP2) を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化 RIP1 を認識しない、請求項 13 又は 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

ポリユビキチンに結合する第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の半抗体；及び受容体相互作用プロテインキナーゼ 2 (RIP2) に結合する第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の半抗体を含む多重特異性抗体。

10

【請求項 17】

ポリユビキチン化 RIP2 を選択的に認識する、請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 18】

RIP1、XIAP 及び／若しくは c-IAP1 を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化 RIP2 を認識しない、請求項 16 又は 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

ポリユビキチンが均一なトポロジーを有する、請求項 13～18 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 20】

ポリユビキチンが K11 結合を含む、請求項 13～19 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 21】

ポリユビキチンが K48 結合を含む、請求項 13～20 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 22】

ポリユビキチンが K63 結合を含む、請求項 13～21 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 23】

ポリユビキチンが M1 結合を含む、請求項 13～22 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 24】

a) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；

30

b) (i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；

40

c) (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；又は

d) (i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、

50

(v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む第 1 の半抗体を含む、請求項 13～23 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 25】

a) (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；又は
b) (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む第 2 の半抗体を含む、請求項 13～15 又は 19～24 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 26】

(i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む第 2 の半抗体を含む、請求項 16～24 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 27】

a) 第 1 の半抗体が、
(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

b) 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

c) 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

d) 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

e) 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

10

20

30

40

50

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む；

f) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

10

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

20

を含む；

g) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

30

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む；

h) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

40

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、

50

- (i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含む；

i) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

10

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

20

を含む；

j) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

30

を含む；

k) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

40

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、

50

(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

l) 第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含み、

他の第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む、第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体を含む、請求項 13～26 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 28】

第 1 の半抗体が、

a) 配列番号 7 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 8 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列；

b) 配列番号 21 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 22 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列；

c) 配列番号 35 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 36 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列；又は

d) 配列番号 49 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 50 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列

を含む、請求項 13～27 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 29】

第 2 の半抗体が、

a) 配列番号 71 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列；又は

b) 配列番号 72 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VL 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する VH 配列

を含む、請求項 13～15、19～25、又は 27～28 のいずれか一項に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

第2の半抗体が、配列番号93に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列

を含む、請求項16～25、又は26～28のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 31】

a) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

10

第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号71に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

b) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号72に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

20

c) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号93に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

30

d) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号21に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号22に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号71に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

e) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号21に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号22に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

40

第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号72に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

f) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号21に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号22に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、

50

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 に対して少なくとも約 9

50

5 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 94 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する V H 配列を含む、請求項 10 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 32】

第 1 の半抗体が、

- a) 配列番号 7 の V L 配列及び配列番号 8 の V H 配列；
- b) 配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列；
- c) 配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列；又は
- d) 配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列

10

を含む、請求項 13 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 33】

第 2 の半抗体が、

- a) 配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列；又は
- b) 配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列

を含む、請求項 13 ~ 15、19 ~ 25、27 ~ 29、又は 31 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 34】

第 2 の半抗体が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む、請求項 16 ~ 24、26 ~ 28、又は 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 35】

a) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 の V L 配列及び配列番号 8 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

b) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 の V L 配列及び配列番号 8 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

c) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 の V L 配列及び配列番号 8 の V H 配列を含み、

30

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む；

d) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

e) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

40

f) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む；

g) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

h) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列

50

番号 36 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む；

j) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

k) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；又は

l) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む、請求項 13～34 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 36】

モノクローナル抗体である、請求項 13～35 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 37】

マウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である、請求項 13～36 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 38】

第 1 の抗原結合部位が、ヒトのものであるか又はヒト化されている、請求項 13～37 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 39】

第 2 の抗原結合部位が、ヒトのものであるか又はヒト化されている、請求項 13～38 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 40】

抗体が I g G 抗体である、請求項 13～39 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 41】

抗体が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、又は I g G 4 抗体である、請求項 13～40 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 42】

抗体が、I g G 1 抗体又は I g G 4 抗体である、請求項 13～41 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 43】

第 1 の半抗体が、ノブ変異を含む第 1 の重鎖定常領域を含み、第 2 の半抗体が、ホール変異を含む第 2 の重鎖定常領域を含む；又は、第 1 の半抗体が、ホール変異を含む第 1 の重鎖定常領域を含み、第 2 の半抗体が、ノブ変異を含む第 2 の重鎖定常領域を含む、請求項 13～42 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 44】

抗体が I g G 1 抗体であり、ノブ変異が T 366 W 変異を含む、請求項 43 に記載の抗体。

【請求項 45】

抗体が I g G 1 抗体であり、ホール変異が、T 366 S、L 368 A、及び Y 407 V から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、又は 3 つ、例えば 1～2 つ、1～3 つ、又は 2～3 つの変異を含む、請求項 43 又は請求項 44 に記載の抗体。

【請求項 46】

抗体が IgG4 抗体であり、ノブ変異が T366W 変異を含む、請求項 43 に記載の抗体。

【請求項 47】

抗体が IgG4 抗体であり、ホール変異が、T366S 変異、L368A 変異、及び Y407V 変異から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、又は 3 つ、例えば 1～2 つ、1～3 つ、又は 2～3 つの変異を含む、請求項 43 又は請求項 46 に記載の抗体。

【請求項 48】

第 1 の半抗体が、

a) 配列番号 2 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する軽鎖配列；

b) 配列番号 16 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する軽鎖配列；

c) 配列番号 30 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する軽鎖配列；又は

d) 配列番号 44 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する軽鎖配列

を含む、請求項 43～47 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 49】

第 1 の半抗体が、

a) 配列番号 4 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する重鎖配列；

b) 配列番号 18 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する重鎖配列；

c) 配列番号 32 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d) 配列番号 46 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する重鎖配列

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 13～48 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 50】

第 1 の半抗体が、

a) 配列番号 2 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 4 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する重鎖配列；

b) 配列番号 16 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 18 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する重鎖配列；

c) 配列番号 30 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 32 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d) 配列番号 44 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 46 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する重鎖配列

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 13～49 のいずれか一項に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

第 1 の半抗体が、

- a) 配列番号 6 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；
 - b) 配列番号 20 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；
 - c) 配列番号 34 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；又は
 - d) 配列番号 48 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列
- を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 13 ~ 48 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 5 2】

第 1 の半抗体が、

- a) 配列番号 2 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 6 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；
 - b) 配列番号 16 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 20 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；
 - c) 配列番号 30 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 34 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する重鎖配列；又は
 - d) 配列番号 44 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 48 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する重鎖配列
- を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 13 ~ 48 又は 51 のいずれか一項に記載の抗体。

20

30

【請求項 5 3】

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、請求項 13 ~ 15、19 ~ 25、27 ~ 29、31 ~ 33、又は 35 ~ 52 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5 4】

第 2 の半抗体が、配列番号 68 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C 末端リジンが重鎖から欠失している、請求項 13 ~ 15、19 ~ 15、27 ~ 29、31 ~ 33、又は 35 ~ 53 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 5 5】

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 68 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 13 ~ 15、19 ~ 25、27 ~ 29、31 ~ 33、又は 35 ~ 54 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5 6】

第 2 の半抗体が、配列番号 70 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、

50

９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが重鎖から欠失している、請求項１３～１５、１９～２５、２７～２９、３１～３３、又は３３～５３のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項５７】

第２の半抗体が、配列番号６０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号７０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが１つ以上の重鎖から欠失している、請求項１３～１５、１９～２５、２７～２９、３１～３３、３５～５３又は５６のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項５８】

第２の半抗体が、配列番号８４に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、請求項１６～２４、２６～２８、３０～３２、又は３４～５２のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項５９】

第２の半抗体が、配列番号９０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが１つ以上の重鎖から欠失している、請求項１６～２４、２６～２８、３０～３１、３４～５２又は５５２８のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項６０】

第２の半抗体が、配列番号８４に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号９０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが１つ以上の重鎖から欠失している、請求項１６～２４、２６～２８、３０～３２、３４～５２、又は５８～５９のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項６１】

第２の半抗体が、配列番号９２に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが１つ以上の重鎖から欠失している、請求項１６～２４、２６～２８、３０～３２、３４～５２又は５８のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項６２】

第２の半抗体が、配列番号８４に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号９２に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、Ｃ末端リジンが１つ以上の重鎖から欠失している、請求項１６～２４、２６～２８、３０～３２、３３～５２、５８又は６１のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項６３】

a) 第１の半抗体が、配列番号２に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号４に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

第２の半抗体が、配列番号６０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号７０に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

b) 第１の半抗体が、配列番号２に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号６に対して少なくとも約９５％、例えば９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同

50

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、

50

98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している

請求項13～15、19～25、27～29、31～33、又は35～57のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項64】

a) 第1の半抗体が、配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

10

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

b) 第1の半抗体が、配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

20

c) 第1の半抗体が、配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号18に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

30

d) 第1の半抗体が、配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

e) 第1の半抗体が、配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

f) 第1の半抗体が、配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号34に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配

50

列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

g) 第1の半抗体が、配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号46に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

h) 第1の半抗体が、配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号48に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している

請求項16～24、26～28、30～32、34～52、又は58～62のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項65】

第1の半抗体が、

- a) 配列番号2の軽鎖配列；
- b) 配列番号16の軽鎖配列；
- c) 配列番号30の軽鎖配列；又は
- d) 配列番号44の軽鎖配列

を含む、請求項13～64のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項66】

第1の半抗体が、

- a) 配列番号4の重鎖配列；
- b) 配列番号18の重鎖配列；
- c) 配列番号32の重鎖配列；又は
- d) 配列番号46の重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～65のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項67】

第1の半抗体が、

- a) 配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列；
- b) 配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列；
- c) 配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列；又は
- d) 配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～66のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項68】

第1の半抗体が、

- a) 配列番号6の重鎖配列；

- b) 配列番号 20 の重鎖配列；
- c) 配列番号 34 の重鎖配列；又は
- d) 配列番号 48 の重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～65のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項69】

第1の半抗体が、

- a) 配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列；
- b) 配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列；
- c) 配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列；又は
- d) 配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～65又は68のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項70】

第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列を含む、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～53、63、又は65～69のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項71】

第2の半抗体が、配列番号68の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、63、又は65～70のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項72】

第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～55、63、又は65～71のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項73】

第2の半抗体が、配列番号70の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、63、又は65～70のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項74】

第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、56、63、65～70又は73のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項75】

第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列を含む、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58又は64～69のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項76】

第2の半抗体が、配列番号90の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58～59、64～69又は75のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項77】

第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58～60、64～69又は75～76のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項78】

第2の半抗体が、配列番号92の重鎖を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58

10

20

30

40

50

、 61、64～69又は75のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項79】

第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58、61～62、64～69、75又は78のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項80】

a) 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
b) 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
c) 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
d) 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
e) 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
f) 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
g) 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
h) 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、又は65～74のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項81】

a) 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；
b) 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；
c) 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；
d) 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；
e) 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；
f) 配列番号30の鎖配列及び配列番号34の重鎖配列、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；
g) 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；
h) 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、
第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、又は75～79のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項82】

第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29

、 31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項83】

第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項84】

第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項85】

第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項86】

第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項87】

第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項88】

第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項89】

第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項90】

第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、請求項16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項91】

第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗

50

体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 90 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 92】

第 1 の半抗体が、配列番号 16 の軽鎖配列及び配列番号 18 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 92 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 93】

第 1 の半抗体が、配列番号 16 の軽鎖配列及び配列番号 20 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 90 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 94】

第 1 の半抗体が、配列番号 30 の軽鎖配列及び配列番号 32 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 92 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 95】

第 1 の半抗体が、配列番号 30 の軽鎖配列及び配列番号 34 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 90 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 96】

第 1 の半抗体が、配列番号 44 の軽鎖配列及び配列番号 46 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 92 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 97】

第 1 の半抗体が、配列番号 44 の軽鎖配列及び配列番号 48 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体が、配列番号 84 の軽鎖配列及び配列番号 90 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、請求項 16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79 又は 81 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 98】

二重特異性抗体である、請求項 13～97 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 99】

ダイアボディ、トリアボディ、又はテトラボディである、請求項 13～98 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 100】

標識にコンジュゲートしている、請求項 13～99 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 101】

標識が、蛍光標識、酵素標識、又は発色標識である、請求項 100 に記載の抗体。

【請求項 102】

50

標識が放射性同位体であり、任意選択で陽電子放出体であり、任意選択で⁸⁹Zrである、請求項100に記載の抗体。

【請求項103】

組成物が、単一特異性抗体、組み立てられていない半抗体、又は単一特異性抗体と組み立てられていない半抗体の両方を実質的に含まない、請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項104】

請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体と、細胞傷害性剤又は抗炎症剤とを含むイムノコンジュゲート。

【請求項105】

薬学的に許容される担体と、

a) 請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体；又は

b) 請求項104に記載のイムノコンジュゲート

の少なくとも1つを含む薬学的製剤であって、

任意選択で、組成物が、単一特異性抗体、組み立てられていない半抗体、又は単一特異性抗体と組み立てられていない半抗体の両方を実質的に含まない、薬学的製剤。

【請求項106】

追加の治療剤をさらに含む、請求項105に記載の薬学的製剤。

【請求項107】

請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項108】

請求項107に記載の核酸を含むベクター。

【請求項109】

請求項107に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項110】

抗体が産生される条件下で請求項106に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。

【請求項111】

抗体を宿主細胞から回収することをさらに含む、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

第1の半抗体と第2の半抗体から抗体を形成することを含む、請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体を作製する方法。

【請求項113】

医薬としての使用のための、請求項13～102のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項114】

ポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、試料を請求項13～102のいずれかに記載の抗体に曝露することと、試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する抗体の結合を決定することを含む、方法。

【請求項115】

試料中のK11結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K11結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を請求項13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【請求項116】

試料中のK48結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K48結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を請求項13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【請求項117】

試料中のK63結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K63結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を請求項13～102のいずれかに記載の抗

10

20

30

40

50

体と接触させることを含む、方法。

【請求項 118】

試料中の M1 結合型ポリユビキチン化タンパク質を非 M1 結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を請求項 13～102 のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【請求項 119】

細胞又は試料中のポリユビキチン化タンパク質の機能及び／又は活性を決定する方法であって、細胞又は試料を請求項 13～102 のいずれかに記載の抗体と接触させることと、細胞又は試料に対する前記接触させる工程の効果を評価することとを含む、方法。

【請求項 120】

ポリユビキチン化タンパク質が RIP1 を含む、請求項 114～119 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 121】

ポリユビキチン化タンパク質が RIP2 を含む、請求項 114～119 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

ポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、ポリユビキチンを含み、試料を請求項 10～99 のいずれかに記載の抗体に曝露することを含む、方法。

【請求項 123】

ポリユビキチン化タンパク質が、M1 結合型ポリユビキチン及び／又は K63 結合型ポリユビキチンを含む、請求項 122 に記載の方法。

【請求項 124】

炎症促進性タンパク質が 1 つ以上のシグナル伝達複合体の成分である、請求項 122 又は 123 に記載の方法。

【請求項 125】

炎症促進性タンパク質が RIP1 である、請求項 122～124 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 126】

炎症促進性タンパク質が RIP2 である、請求項 122～125 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 127】

炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において上昇したユビキチン化レベルを有する、請求項 122～126 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 128】

炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、1 倍～12 倍、2 倍～12 倍、3 倍～12 倍、4 倍～12 倍、5 倍～12 倍、6 倍～12 倍、7 倍～12 倍、8 倍～12 倍、9 倍～12 倍、10 倍～12 倍、又は 11 倍～12 倍のユビキチン化レベルを有する、請求項 122～127 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 129】

ユビキチン化のレベルの上昇が、炎症性疾患状態の重症度の増加と相関する、請求項 122～128 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 130】

炎症促進性タンパク質が、炎症性腸疾患、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に関連している、請求項 122～129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 131】

10

20

30

40

50

炎症促進性タンパク質がクローン病に関連している、請求項 1 2 2 ～ 1 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

炎症促進性タンパク質が潰瘍性大腸炎に関連している、請求項 1 2 2 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

【0 0 0 1】 本出願は、2 0 2 1 年 8 月 3 0 日に出願された米国仮出願第 6 3 / 2 3 8 , 7 4 9 号及び 2 0 2 1 年 9 月 2 3 日に出願された米国仮出願第 6 3 / 2 4 7 , 7 7 6 号の優先権の利益を主張し、これらの各出願は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の分野

【0 0 0 2】 本発明は、抗ポリユビキチン多重特異性抗体、並びにその作製方法及び使用方法に関する。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

20

【0 0 0 3】 ユビキチンは、様々な細胞経路において重要な調節役割を果たす小さなタンパク質である。これらの中で最もよく知られているのは、タンパク質分解におけるユビキチンの役割であり、ユビキチンが標的タンパク質に共有結合することにより、その標的タンパク質が 2 6 S プロテアソームによって認識され、破壊される (Wilkinson, Semin. Cell Devel. Biol. 11 (3): 141-148 (2000) を参照)。76 アミノ酸のタンパク質であるユビキチンの標的タンパク質への共有結合は、3 段階の酵素プロセスである (Pickart, Annu. Rev. Biochem. 70: 503-533 (2001))。最初に、ユビキチン活性化酵素 E 1 は、ATP 依存的反応でユビキチン-E 1 チオエステルを形成する。ユビキチンは、第 2 段階でユビキチン-E 1 チオエステルからユビキチン結合酵素 (E 2) ファミリーのメンバーに転移される。第 3 段階では、ユビキチン・プロテイン・リガーゼ (E 3) の助けを借りて、ユビキチンのカルボキシル末端と標的タンパク質上のリジン残基の ε - アミノ基との間にイソペプチド結合が形成される。脱ユビキチン化酵素と呼ばれる酵素が、標的タンパク質からユビキチン部分を除去する (Guterman and Glickman, Curr. Prot. Pep. Sci. 5: 201-210 (2004))。

30

【0 0 0 4】

【0 0 0 4】 ユビキチンは 7 つのリジン残基 (Lys 6、Lys 11、Lys 27、Lys 33、Lys 29、Lys 48、及び Lys 63) を含んでおり、したがってユビキチン自体がユビキチン化の標的タンパク質として機能する可能性がある (Peng et al., Nat. Biotechnol. 21: 921-926 (2003); Pickart and Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004))。ユビキチンタンパク質のユビキチン化によって生成される分子はポリユビキチン分子と呼ばれ、2 つ以上のユビキチン部分を含み得る。

40

【0 0 0 5】

【0 0 0 5】 さらに、ユビキチンの C 末端グリシンが別のユビキチン分子の N 末端メチオニンの α - アミノ基にコンジュゲートした直鎖状ポリユビキチン結合 (M1 結合とも呼ばれる) が形成される。Iwai and Tokunaga, EMBO Reports 10: 706-713 (2009)。直鎖状ポリユビキチンは、2 つのリングフィンガータンパク質、HOIL-1L と HOIP からなる直鎖状ユビキチン鎖集合複合体 (LUBAC) を介して形成される。Tokunaga et al., Nat. Cell

50

B i o l . 1 1 : 1 2 3 - 1 3 2 (2 0 0 9)。遺伝的にコードされ、アンカーされていない直鎖状ポリユビキチンは、そのC末端がイソペプチダーゼTによる切断を受けやすいため、細胞内に存在しないと考えられている。**I w a i a n d T o k u n a g a , E M B O R e p o r t s 1 0 : 7 0 6 - 7 1 3 (2 0 0 9)**。この観察結果は、直鎖状ポリユビキチンが翻訳後に基質タンパク質上に集合し、コンジュゲートした直鎖状ポリユビキチン分子がタンパク質の活性と機能の潜在的な調節因子であることを示唆している。**I d .** 例えば、NF-κB必須モジュレーター(NEMO)の直鎖状ポリユビキチン化は、NF-κB活性化に関与することが示されている。**I d .** 異なるユビキチン鎖は、細胞シグナル伝達の活性化若しくは抑制、又はタンパク質の安定性の調節につながる、特異的で異なる生化学的及び生物学的メッセージを伝達することができる(**I k e d a , F . , e t a l . , C e l l 1 4 3 : 6 7 7 - 6 8 1 (2 0 1 0) ; R a p e , M . , N a t R e v M o l C e l l B i o l 1 9 : 5 9 - 7 0 (2 0 1 8)**)。

【 0 0 0 6 】

【0006】 受容体相互作用プロテインキナーゼ（「RIP1」又は「RIPK1」）は、セリン／スレオニンプロテインキナーゼである。RIP1は、とりわけネクロトーシスなどのプログラム細胞死経路の媒介に関与する細胞シグナル伝達の調節因子である。最もよく研究されているネクロトーシスによる細胞死の形態は、TNF α （腫瘍壊死因子）によって開始されるが、ネクロトーシスは、TNF α 死リガンドファミリーの他のメンバー（Fas及びTRAIL／Apo2L）、インターフェロン、Toll様受容体（TLR）シグナル伝達、DNAセンサーDAI（DNA依存性インターフェロン調節因子活性化因子）を介したウイルス感染によっても誘導され得る。Van den Berghe et al. (2014) Nature Reviews. Molecular cell biology 15:135-147 (2014); Newton, K. Trends in Cell Biology 25:347-353 (2015); de Almagro, M. C. and Vucic, D. Semin Cell Dev Biol. 39:56-62 (2015)。TNFR1（TNF受容体1）へのTNF α の結合は、TNFR1の三量体化及び細胞内複合体Complex-Iの形成を促す。TRADD（TNF受容体関連デスドメインタンパク質）はTNFR1の細胞内デスドメインに結合し、両タンパク質に存在するデスドメインを介してプロテインキナーゼRIP1（受容体相互作用タンパク質1）をリクルートする。Chen, Z. J. Immunological reviews 246:95-106 (2012)。

【 0 0 0 7 】

【0007】 受容体相互作用セリン／スレオニンプロテインキナーゼ2（「RIP2」又は「RIPK2」）は、セリン／スレオニン／チロシンキナーゼであり、適応免疫応答及び自然免疫応答の調節において必須の役割を果たす。活性化されたNOD1及びNOD2によってCARD-CARDドメインを介してリクルートされると、RIPK2は自己リン酸化し、ユビキチンリガーゼXIAP、BIRC2、及びBIRC3によってK63結合型ポリユビキチン化を受ける。ポリユビキチン化されたタンパク質は、IKBK／NEMOのK63結合型ポリユビキチン化と、それに続くIKBK／IKKBの活性化を誘導する。続いて、NF- κ Bが放出されて核に移行し、そこで免疫応答、成長制御、又はアポトーシスからの保護に關与する数百の遺伝子の転写を活性化する。

【 0 0 0 8 】

〔０００８〕 ＲＩＰ１タンパク質とＲＩＰ２タンパク質の修飾を認識して区別できる組成物及び方法を提供すること、並びにポリユビキチン媒介経路を標的化し調節するのに有効な組成物及び方法を提供することは有益であろう。本開示は、これらのニーズのうちの１つ以上を満たすこと、又は他の利点を提供することを目的としている。

【 0 0 0 9 】

〔 0 0 0 9 〕 以下の非限定的な実施態様が提供される。

【 0 0 1 0 】

実施態様 1. ポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン

化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、ポリユビキチンを含み、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び炎症促進性タンパク質に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む少なくとも1つの多特異性抗体に該試料を曝露することと、該試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する少なくとも1つの抗体の結合を決定することを含む、方法。

【0011】

実施態様2．ポリユビキチン化タンパク質が、M1結合型ポリユビキチン及び／又はK63結合型ポリユビキチンを含む、実施態様1に記載の方法。

【0012】

実施態様3．炎症促進性タンパク質が1つ以上のシグナル伝達複合体の成分である、実施態様1又は2に記載の方法。

【0013】

実施態様4．炎症促進性タンパク質が、受容体相互作用プロテインキナーゼ1（RIP1）、受容体相互作用プロテインキナーゼ2（RIP2）、アポトーシスの細胞阻害剤1及び2（c-IAP1／2）、腫瘍壊死因子受容体1（TNFR1）、直鎖状ユビキチン鎖集合複合体（LUBAC）、及び／又は核因子カッパB（NF-κB）必須モジュレーター（NEMO）である、実施態様1～3のいずれか一項に記載の方法。

【0014】

実施態様5．炎症促進性タンパク質がRIP1である、実施態様1～4のいずれか一項に記載の方法。

【0015】

実施態様6．炎症促進性タンパク質がRIP2である、実施態様1～4のいずれか一項に記載の方法。

【0016】

実施態様7．炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において上昇したユビキチン化レベルを有する、実施態様1～6のいずれか一項に記載の方法。

【0017】

実施態様8．炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、1倍～12倍、2倍～12倍、3倍～12倍、4倍～12倍、5倍～12倍、6倍～12倍、7倍～12倍、8倍～12倍、9倍～12倍、10倍～12倍、又は11倍～12倍のユビキチン化レベルを有する、実施態様1～7のいずれか一項に記載の方法。

【0018】

実施態様9．ユビキチン化のレベルの上昇が、炎症性疾患状態の重症度の増加と相関する、実施態様1～8のいずれか一項に記載の方法。

【0019】

実施態様10．炎症促進性タンパク質が、炎症性腸疾患、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に関連している、実施態様1～9のいずれか一項に記載の方法。

【0020】

実施態様11．炎症促進性タンパク質がクローン病に関連している、実施態様1～10のいずれか一項に記載の方法。

【0021】

実施態様12．炎症促進性タンパク質が潰瘍性大腸炎に関連している、実施態様1～11のいずれか一項に記載の方法。

【0022】

実施態様13．ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；

10

20

30

40

50

及び受容体相互作用プロテインキナーゼ 1 (RIP1) に結合する第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の半抗体を含む多重特異性抗体。

【0023】

実施態様 14. ポリユビキチン化 RIP1 を選択的に認識する、実施態様 13 に記載の抗体。

【0024】

実施態様 15. 受容体相互作用プロテインキナーゼ 2 (RIP2) を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化 RIP1 を認識しない、実施態様 13 又は 14 に記載の抗体。

【0025】

実施態様 16. ポリユビキチンに結合する第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の半抗体；及び受容体相互作用プロテインキナーゼ 2 (RIP2) に結合する第 2 の抗原結合部位を含む第 2 の半抗体を含む多重特異性抗体。

【0026】

実施態様 17. ポリユビキチン化 RIP2 を選択的に認識する、実施態様 16 に記載の抗体。

【0027】

実施態様 18. RIP1、XIAP 及び／若しくは c-IAP1 を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化 RIP2 を認識しない、実施態様 16 又は 17 に記載の抗体。

【0028】

実施態様 19. ポリユビキチンが均一なトポロジーを有する、実施態様 13～18 のいずれか一項に記載の抗体。

【0029】

実施態様 20. ポリユビキチンが K11 結合を含む、実施態様 13～19 のいずれか一項に記載の抗体。

【0030】

実施態様 21. ポリユビキチンが K48 結合を含む、実施態様 13～20 のいずれか一項に記載の抗体。

【0031】

実施態様 22. ポリユビキチンが K63 結合を含む、実施態様 13～21 のいずれか一項に記載の抗体。

【0032】

実施態様 23. ポリユビキチンが M1 結合を含む、実施態様 13～22 のいずれか一項に記載の抗体。

【0033】

実施態様 24.

- a. (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；
- b. (i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；
- c. (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、

10

20

30

40

50

- (i v) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3；又は
- d. (i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3

を含む第 1 の半抗体を含む、実施態様 13～23 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【0034】

実施態様 25.

- a. (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3；又は
- b. (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3

を含む第 2 の半抗体を含む、実施態様 13～15 又は 19～24 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【0035】

実施態様 26.

- (i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3

を含む第 2 の半抗体を含む、実施態様 16～24 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【0036】

実施態様 27.

- a. 第 1 の半抗体が、
- (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、
- (v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R-H 2、及び
- (v i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R-H 3

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む H V R-L 1、
- (i i) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む H V R-L 2、
- (i i i) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R-L 3、
- (i v) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R-H 1、

40

50

(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

b. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

10

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

20

c. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

30

d. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

40

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

50

を含む；

e. 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

f. 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- 配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

g. 第1の半抗体が、

- (i) 配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、

第2の半抗体が、

- (i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む；

h. 第1の半抗体が、

10

20

30

40

50

(i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

10

i. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

20

第 2 の半抗体が、

(i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

30

を含む；

j. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含み、

第 2 の半抗体が、

40

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
(iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
(iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
(vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3
を含む；

k. 第 1 の半抗体が、

(i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
(ii) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、

50

- (i i i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含み、

第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

10

を含む；

し、第 1 の半抗体が、

- (i) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

20

を含み、

他の第 2 の半抗体が、

- (i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
- (i i i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
- (i v) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (v) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
- (v i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含む、第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体を含む、実施態様 1 3 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【 0 0 3 7 】

実施態様 2 8 . 第 1 の半抗体が、

a . 配列番号 7 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 8 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V H 配列；

b . 配列番号 2 1 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 2 2 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V H 配列；

40

c . 配列番号 3 5 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 3 6 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V H 配列；又は

d . 配列番号 4 9 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 5 0 に対して少なくとも約 9 5 % 、例えば 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する V H 配列

を含む、実施態様 1 3 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0 0 3 8 】

50

実施態様 29. 第2の半抗体が、

a. 配列番号 71 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列；又は

b. 配列番号 72 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列

を含む、実施態様 13～15、19～25、又は 27～28 のいずれか一項に記載の抗体

10

【0039】

実施態様 30. 第2の半抗体が、

(i) 配列番号 93 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 94 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、又は 100% の配列同一性を有する V H 配列

を含む、実施態様 16～25、又は 26～28 のいずれか一項に記載の抗体。

【0040】

実施態様 31.

a. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 8 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含む；

b. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 8 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 73 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含む；

c. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの一方が、配列番号 7 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 8 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 94 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含む；

d. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V L 配列、及び配列番号 22 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を有する V H 配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 に対して少なくとも約 95%、例えば 96%、97%、98%、99%、若しくは 100% の配列同一性を

20

30

40

50

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうちの他方が、配列番号71に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；

50

k. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号49に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号50に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号72に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む；又は

l. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号49に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号50に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号93に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有するVH配列を含む、実施態様10～27のいずれか一項に記載の抗体。

【0041】

実施態様32. 第1の半抗体が、

- a. 配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列；
- b. 配列番号21のVL配列及び配列番号22のVH配列；
- c. 配列番号35のVL配列及び配列番号36のVH配列；又は
- d. 配列番号49のVL配列及び配列番号50のVH配列

を含む、実施態様13～31のいずれか一項に記載の抗体。

【0042】

実施態様33. 第2の半抗体が、

- a. 配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列；又は
- b. 配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列

を含む、実施態様13～15、19～25、27～29、又は31～32のいずれか一項に記載の抗体。

【0043】

実施態様34. 第2の半抗体が、

(i) 配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列

を含む、実施態様16～24、26～28、又は30～32のいずれか一項に記載の抗体。

【0044】

実施態様35.

a. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；

b. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；

c. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、

(i) 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち他方が、配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列を含む；

d. 第1の半抗体及び第2の半抗体のうち的一方が、配列番号21のVL配列及び配

列番号 22 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

e . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

f . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 21 の V L 配列及び配列番号 22 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む；

g . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

h . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

i . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 35 の V L 配列及び配列番号 36 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む；

j . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 71 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；

k . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 72 の V L 配列及び配列番号 73 の V H 配列を含む；又は

l . 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの一方が、配列番号 49 の V L 配列及び配列番号 50 の V H 配列を含み、

(i) 第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体のうちの他方が、配列番号 93 の V L 配列及び配列番号 94 の V H 配列を含む、実施態様 13 ～ 34 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0045 】

実施態様 36 . モノクローナル抗体である、実施態様 13 ～ 35 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0046 】

実施態様 37 . マウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である、実施態様 13 ～ 36 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0047 】

実施態様 38 . 第 1 の抗原結合部位が、ヒトのものであるか又はヒト化されている、実施態様 13 ～ 37 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0048 】

実施態様 39 . 第 2 の抗原結合部位が、ヒトのものであるか又はヒト化されている、実施態様 13 ～ 38 のいずれか一項に記載の抗体。

【 0049 】

実施態様 40 . 抗体が I g G 抗体である、実施態様 13 ～ 39 のいずれか一項に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0050】

実施態様41. 抗体が、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、又はIgG4抗体である、実施態様13～40のいずれか一項に記載の抗体。

【0051】

実施態様42. 抗体が、IgG1抗体又はIgG4抗体である、実施態様13～41のいずれか一項に記載の抗体。

【0052】

実施態様43. 第1の半抗体が、ノブ変異を含む第1の重鎖定常領域を含み、第2の半抗体が、ホール変異を含む第2の重鎖定常領域を含む；又は、第1の半抗体が、ホール変異を含む第1の重鎖定常領域を含み、第2の半抗体が、ノブ変異を含む第2の重鎖定常領域を含む、実施態様13～42のいずれか一項に記載の抗体。

10

【0053】

実施態様44. 抗体がIgG1抗体であり、ノブ変異がT366W変異を含む、実施態様43に記載の抗体。

【0054】

実施態様45. 抗体がIgG1抗体であり、ホール変異が、T366S、L368A、及びY407Vから選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ、例えば1～2つ、1～3つ、又は2～3つの変異を含む、実施態様43又は実施態様44に記載の抗体。

【0055】

実施態様46. 抗体がIgG4抗体であり、ノブ変異がT366W変異を含む、実施態様43に記載の抗体。

20

【0056】

実施態様47. 抗体がIgG4抗体であり、ホール変異が、T366S変異、L368A変異、及びY407V変異から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ、例えば1～2つ、1～3つ、又は2～3つの変異を含む、実施態様43又は実施態様46に記載の抗体。

【0057】

実施態様48. 第1の半抗体が、

a. 配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列；

b. 配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列；

c. 配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列；又は

d. 配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列

を含む、実施態様43～47のいずれか一項に記載の抗体。

30

【0058】

実施態様49. 第1の半抗体が、

a. 配列番号4に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b. 配列番号18に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c. 配列番号32に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d. 配列番号46に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～48のいずれか一項に記載の抗体。

40

50

【0059】

実施態様50. 第1の半抗体が、

a. 配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b. 配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号18に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c. 配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d. 配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号46に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～49のいずれか一項に記載の抗体。

【0060】

実施態様51. 第1の半抗体が、

a. 配列番号6に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b. 配列番号20に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c. 配列番号34に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d. 配列番号48に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～48のいずれか一項に記載の抗体。

【0061】

実施態様52. 第1の半抗体が、

a. 配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b. 配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c. 配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号34に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d. 配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号48に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列

10

20

30

40

50

を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～48又は51のいずれか一項に記載の抗体。

【0062】

実施態様53．第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、又は35～52のいずれか一項に記載の抗体。

【0063】

実施態様54．第2の半抗体が、配列番号68に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～15、27～29、31～33、又は35～53のいずれか一項に記載の抗体。

【0064】

実施態様55．第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、又は35～54のいずれか一項に記載の抗体。

【0065】

実施態様56．第2の半抗体が、配列番号70に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、又は33～53のいずれか一項に記載の抗体。

【0066】

実施態様57．第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～53又は56のいずれか一項に記載の抗体。

【0067】

実施態様58．第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列を含む、実施態様16～24、26～28、30～32、又は34～52のいずれか一項に記載の抗体。

【0068】

実施態様59．第2の半抗体が、配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～31、34～52又は5528のいずれか一項に記載の抗体。

【0069】

実施態様60．第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、又は58～59のいずれか一項に記載の抗体。

【0070】

実施態様61．第2の半抗体が、配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば

96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52又は58のいずれか一項に記載の抗体。

【0071】

実施態様62. 第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、33～52、58又は61のいずれか一項に記載の抗体。

10

【0072】

実施態様63.

a. 第1の半抗体が、配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

20

b. 第1の半抗体が、配列番号2に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

c. 第1の半抗体が、配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号18に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

30

第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

d. 第1の半抗体が、配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

e. 第1の半抗体が、配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号60に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対し

50

て少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

f. 配列番号 30 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する鎖配列、及び配列番号 34 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列、

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 68 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

g. 第 1 の半抗体が、配列番号 44 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 46 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 70 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

h. 第 1 の半抗体が、配列番号 44 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 48 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体が、配列番号 60 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 68 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している

実施態様 13 ~ 15、19 ~ 25、27 ~ 29、31 ~ 33、又は 35 ~ 57 のいずれか一項に記載の抗体。

【0073】

実施態様 64.

a. 第 1 の半抗体が、配列番号 2 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 4 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体が、配列番号 84 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 92 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

b. 第 1 の半抗体が、配列番号 2 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 6 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体が、配列番号 84 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 90 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

c. 第 1 の半抗体が、配列番号 16 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 18 に対して少なくとも約 95 %、例えば 96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の

10

20

30

40

50

配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

d. 第1の半抗体が、配列番号16に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

10

e. 第1の半抗体が、配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

20

f. 第1の半抗体が、配列番号30に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号34に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

g. 第1の半抗体が、配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号46に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

30

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

h. 第1の半抗体が、配列番号44に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号48に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

第2の半抗体が、配列番号84に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約95%、例えば96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している

実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、又は58～62のいずれか一項に記載の抗体。

【0074】

実施態様65. 第1の半抗体が、

50

- a. 配列番号 2 の軽鎖配列；
- b. 配列番号 16 の軽鎖配列；
- c. 配列番号 30 の軽鎖配列；又は
- d. 配列番号 44 の軽鎖配列

を含む、実施態様 13～64 のいずれか一項に記載の抗体。

【0075】

実施態様 66. 第 1 の半抗体が、

- a. 配列番号 4 の重鎖配列；
- b. 配列番号 18 の重鎖配列；
- c. 配列番号 32 の重鎖配列；又は
- d. 配列番号 46 の重鎖配列

10

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、実施態様 13～65 のいずれか一項に記載の抗体。

【0076】

実施態様 67. 第 1 の半抗体が、

- a. 配列番号 2 の軽鎖配列及び配列番号 4 の重鎖配列；
- b. 配列番号 16 の軽鎖配列及び配列番号 18 の重鎖配列；
- c. 配列番号 30 の軽鎖配列及び配列番号 32 の重鎖配列；又は
- d. 配列番号 44 の軽鎖配列及び配列番号 46 の重鎖配列

20

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、実施態様 13～66 のいずれか一項に記載の抗体。

【0077】

実施態様 68. 第 1 の半抗体が、

- a. 配列番号 6 の重鎖配列；
- b. 配列番号 20 の重鎖配列；
- c. 配列番号 34 の重鎖配列；又は
- d. 配列番号 48 の重鎖配列

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、実施態様 13～65 のいずれか一項に記載の抗体。

【0078】

30

実施態様 69. 第 1 の半抗体が、

- a. 配列番号 2 の軽鎖配列及び配列番号 6 の重鎖配列；
- b. 配列番号 16 の軽鎖配列及び配列番号 20 の重鎖配列；
- c. 配列番号 30 の軽鎖配列及び配列番号 34 の重鎖配列；又は
- d. 配列番号 44 の軽鎖配列及び配列番号 48 の重鎖配列

を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、実施態様 13～65 又は 68 のいずれか一項に記載の抗体。

【0079】

実施態様 70. 第 2 の半抗体が、配列番号 60 の軽鎖配列を含む、実施態様 13～15、19～25、27～29、31～33、35～53、63、又は 65～69 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【0080】

実施態様 71. 第 2 の半抗体が、配列番号 68 の重鎖配列を含み；任意選択で、C 末端リジンが重鎖から欠失している、実施態様 13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、63、又は 65～70 のいずれか一項に記載の抗体。

【0081】

実施態様 72. 第 2 の半抗体が、配列番号 60 の軽鎖配列及び配列番号 68 の重鎖配列を含み；任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している、実施態様 13～15、19～25、27～29、31～33、35～55、63、又は 65～71 のいずれか一項に記載の抗体。

50

【0082】

実施態様73. 第2の半抗体が、配列番号70の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、63、又は65～70のいずれか一項に記載の抗体。

【0083】

実施態様74. 第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～54、56、63、65～70又は73のいずれか一項に記載の抗体。

【0084】

実施態様75. 第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列を含む、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58又は64～69のいずれか一項に記載の抗体。

【0085】

実施態様76. 第2の半抗体が、配列番号90の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～59、64～69又は75のいずれか一項に記載の抗体。

【0086】

実施態様77. 第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～60、64～69又は75～76のいずれか一項に記載の抗体。

【0087】

実施態様78. 第2の半抗体が、配列番号92の重鎖を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58、61、64～69又は75のいずれか一項に記載の抗体。

【0088】

実施態様79. 第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58、61～62、64～69、75又は78のいずれか一項に記載の抗体。

【0089】

実施態様80.

- a. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
- b. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
- c. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
- d. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
- e. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
- f. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含む；
- g. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含む；
- h. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～15、19～25

10

20

30

40

50

、27～29、31～33、35～57、63、又は65～74のいずれか一項に記載の抗体。

【0090】

実施態様81.

a. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；

b. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；

c. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；

d. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；

e. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；

f. 配列番号30の鎖配列及び配列番号34の重鎖配列、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含む；

g. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含む；

h. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、

任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、又は75～79のいずれか一項に記載の抗体。

【0091】

実施態様82. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0092】

実施態様83. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0093】

実施態様84. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0094】

実施態様85. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0095】

実施態様86. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み

、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0096】

実施態様87. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0097】

実施態様88. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0098】

実施態様89. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様13～15、19～25、27～29、31～33、35～57、63、65～74又は80のいずれか一項に記載の抗体。

【0099】

実施態様90. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0100】

実施態様91. 第1の半抗体が、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0101】

実施態様92. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0102】

実施態様93. 第1の半抗体が、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0103】

実施態様94. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の抗体。

【0104】

実施態様95. 第1の半抗体が、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0105】

実施態様96. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

10

【0106】

実施態様97. 第1の半抗体が、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体が、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している、実施態様16～24、26～28、30～32、34～52、58～62、64～69、75～79又は81のいずれか一項に記載の抗体。

【0107】

実施態様98. 二重特異性抗体である、実施態様13～97のいずれか一項に記載の抗体。

20

【0108】

実施態様99. ダイアボディ、トリアボディ、又はテトラボディである、実施態様13～98のいずれか一項に記載の抗体。

【0109】

実施態様100. 標識にコンジュゲートしている、実施態様13～99のいずれか一項に記載の抗体。

【0110】

実施態様101. 標識が、蛍光標識、酵素標識、又は発色標識である、実施態様100に記載の抗体。

30

【0111】

実施態様102. 標識が放射性同位体であり、任意選択で陽電子放出体であり、任意選択で ^{89}Zr である、実施態様100に記載の抗体。

【0112】

実施態様103. 組成物が、単一特異性抗体、組み立てられていない半抗体、又は単一特異性抗体と組み立てられていない半抗体の両方を実質的に含まない、実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【0113】

実施態様104. 実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体と、細胞傷害性剤又は抗炎症剤とを含むイムノコンジュゲート。

40

【0114】

実施態様105. 薬学的に許容される担体と、
a) 実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体；又は
b) 実施態様104に記載のイムノコンジュゲート
の少なくとも1つとを含む薬学的製剤であって、
b. 任意選択で、組成物が、単一特異性抗体、組み立てられていない半抗体、又は単一特異性抗体と組み立てられていない半抗体の両方を実質的に含まない、薬学的製剤。

【0115】

実施態様106. 追加の治療剤をさらに含む、実施態様105に記載の薬学的製剤。

50

【0116】

実施態様107. 実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【0117】

実施態様108. 実施態様107に記載の核酸を含むベクター。

【0118】

実施態様109. 実施態様107に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【0119】

実施態様110. 抗体が産生される条件下で実施態様106に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。

10

【0120】

実施態様111. 抗体を宿主細胞から回収することをさらに含む、実施態様110に記載の方法。

【0121】

実施態様112. 第1の半抗体と第2の半抗体から抗体を形成することを含む、実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体を作製する方法。

【0122】

実施態様113. 医薬としての使用のための、実施態様13～102のいずれか一項に記載の抗体。

20

【0123】

実施態様114. ポリユビキチン又はポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体に曝露することと、試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する抗体の結合を決定することを含む、方法。

【0124】

実施態様115. 試料中のK11結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K11結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【0125】

実施態様116. 試料中のK48結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K48結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

30

【0126】

実施態様117. 試料中のK63結合型ポリユビキチン化タンパク質を非K63結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【0127】

実施態様118. 試料中のM1結合型ポリユビキチン化タンパク質を非M1結合型ポリユビキチン化タンパク質から分離する方法であって、試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、方法。

40

【0128】

実施態様119. 細胞又は試料中のポリユビキチン化タンパク質の機能及び／又は活性を決定する方法であって、細胞又は試料を実施態様13～102のいずれかに記載の抗体と接触させることと、細胞又は試料に対する前記接触させる工程の効果を評価することを含む、方法。

【0129】

実施態様120. ポリユビキチン化タンパク質がRIP1を含む、実施態様114～119のいずれか一項に記載の方法。

【0130】

実施態様121. ポリユビキチン化タンパク質がRIP2を含む、実施態様114～

50

119のいずれか一項に記載の方法。

【0131】

実施態様122. ポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、ポリユビキチンを含み、試料を実施態様10～99のいずれかに記載の抗体に曝露することを含む、方法。

【0132】

実施態様123. ポリユビキチン化タンパク質が、M1結合型ポリユビキチン及び／又はK63結合型ポリユビキチンを含む、実施態様122に記載の方法。

【0133】

実施態様124. 炎症促進性タンパク質が1つ以上のシグナル伝達複合体の成分である、実施態様122又は123に記載の方法。

【0134】

実施態様125. 炎症促進性タンパク質がRIP1である、実施態様122～124のいずれか一項に記載の方法。

【0135】

実施態様126. 炎症促進性タンパク質がRIP2である、実施態様122～125のいずれか一項に記載の方法。

【0136】

実施態様127. 炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において上昇したユビキチン化レベルを有する、実施態様122～126のいずれか一項に記載の方法。

【0137】

実施態様128. 炎症促進性タンパク質が、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、1倍～12倍、2倍～12倍、3倍～12倍、4倍～12倍、5倍～12倍、6倍～12倍、7倍～12倍、8倍～12倍、9倍～12倍、10倍～12倍、又は11倍～12倍のユビキチン化レベルを有する、実施態様122～127のいずれか一項に記載の方法。

【0138】

実施態様129. ユビキチン化のレベルの上昇が、炎症性疾患状態の重症度の増加と相関する、実施態様122～128のいずれか一項に記載の方法。

【0139】

実施態様130. 炎症促進性タンパク質が、炎症性腸疾患、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に関連している、実施態様122～129のいずれか一項に記載の方法。

【0140】

実施態様131. 炎症促進性タンパク質がクローン病に関連している、実施態様122～130のいずれか一項に記載の方法。

【0141】

実施態様132. 炎症促進性タンパク質が潰瘍性大腸炎に関連している、実施態様122～131のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0142】

【図1A～1B】 【0010】 図1A～Dは、RIP1-K63二重特異性抗体とK63ユビキチン結合修飾RIP1との相互作用を示す。図1A及び1Bは、示された抗体が*in vitro*でK63鎖ユビキチン化及び直鎖状鎖ユビキチン化組換えRIP1タンパク質を免疫沈降させる能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図1C及び1Dは、WT（野生型、W）細胞及びRIP1 KO（ノックアウト）HT29細胞を使用して、示された抗体を用いて得られたTCL及び免疫沈降タンパク質のウェスタ

10

20

30

40

50

ンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 を認識する。

【図 1 C - 1 D】図 1 A ~ D は、R I P 1 - K 6 3 二重特異性抗体と K 6 3 ユビキチン結合修飾 R I P 1 との相互作用を示す。図 1 A 及び 1 B は、示された抗体が *in vitro* で K 6 3 鎖ユビキチン化及び直鎖状鎖ユビキチン化組換え R I P 1 タンパク質を免疫沈降させる能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 1 C 及び 1 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 1 K O (ノックアウト) H T 2 9 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 を認識する。

10

【図 2 A - 2 B】 [0 0 1 1] 図 2 A ~ D は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、線維肉腫 H T 1 0 8 0 細胞、及び A 5 4 9 細胞を含む様々な細胞株における R I P 1 ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体の相互作用を示す。具体的には、図 2 A ~ D は、R I P 1 - K 6 3 ユビキチン鎖二重特異性抗体が K 6 3 鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識することを示している。図 2 A 及び 2 B は、示された抗体を用いて得られた全細胞溶解物 (T C L) 及び免疫沈降タンパク質 (I P) のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。これらの結果は、図 2 C (A 5 4 9 細胞) 及び図 2 D (H T 1 0 8 0 細胞) に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 2 C - 2 D】図 2 A ~ D は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、線維肉腫 H T 1 0 8 0 細胞、及び A 5 4 9 細胞を含む様々な細胞株における R I P 1 ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体の相互作用を示す。具体的には、図 2 A ~ D は、R I P 1 - K 6 3 ユビキチン鎖二重特異性抗体が K 6 3 鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識することを示している。図 2 A 及び 2 B は、示された抗体を用いて得られた全細胞溶解物 (T C L) 及び免疫沈降タンパク質 (I P) のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。これらの結果は、図 2 C (A 5 4 9 細胞) 及び図 2 D (H T 1 0 8 0 細胞) に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

20

【図 3 A - 3 B】 [0 0 1 2] 図 3 A ~ D は、E V S A T、K u 8 1 2 F、及び H T 2 9 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 - K 6 3 二重特異性抗体と、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 との相互作用を示す。図 3 A 及び 3 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 を認識する。図 3 C 及び 3 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 1 K O (ノックアウト) H T 2 9 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。

30

【図 3 C - 3 D】図 3 A ~ D は、E V S A T、K u 8 1 2 F、及び H T 2 9 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 - K 6 3 二重特異性抗体と、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 との相互作用を示す。図 3 A 及び 3 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 を認識する。図 3 C 及び 3 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 1 K O (ノックアウト) H T 2 9 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。

40

【図 4 A - 4 B】 [0 0 1 3] 図 4 A ~ D は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、K u 8 1 2 F 細胞、及びマウス胎児線維芽細胞 (M E F) 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 ユビキチン、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 4 A ~ D は、R I P 1 - L i n ユビキチン鎖二重特異性抗体が直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識するのに対し、R I P 1 - g D 抗体及び g D - L i n 抗体、又は刺激なしの K 6 3 - L i n 抗体はユビキチン化 R I P 1 を免疫沈降させなかったことを示している。図 4 A 及び 4 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク

50

質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。これらの結果は、図 4 C (H T 2 9 細胞) 及び図 4 D (M E F 細胞) に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 4 C - 4 D】図 4 A ~ D は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、K u 8 1 2 F 細胞、及びマウス胎児線維芽細胞 (M E F) 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 ユビキチン、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 4 A ~ D は、R I P 1 - L i n ユビキチン鎖二重特異性抗体が直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識するのに対し、R I P 1 - g D 抗体及び g D - L i n 抗体、又は刺激なしの K 6 3 - L i n 抗体はユビキチン化 R I P 1 を免疫沈降させなかったことを示している。図 4 A 及び 4 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識する。これらの結果は、図 4 C (H T 2 9 細胞) 及び図 4 D (M E F 細胞) に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

10

【図 5 A - 5 B】[0 0 1 4] 図 5 A ~ C は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、D 6 4 5 細胞、及び T H P 1 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 ユビキチン鎖、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。図 5 A、5 B 及び 5 C は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖で修飾された R I P 1 を認識する。

【図 5 C】図 5 A ~ C は、ヒト結腸癌 H T 2 9 細胞、D 6 4 5 細胞、及び T H P 1 細胞を含む様々な細胞株における、R I P 1 ユビキチン鎖、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。図 5 A、5 B 及び 5 C は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖で修飾された R I P 1 を認識する。

20

【図 6 A - 6 B】[0 0 1 5] 図 6 A ~ D は、マウス組織試料における R I P 1 ユビキチン鎖、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。図 6 A 及び 6 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型及び直鎖状ユビキチン鎖で i n v i v o でユビキチン化された R I P 1 を認識する。図 6 C 及び 6 D は、示された抗体及び T C L を用いて得られた免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、野生型 (W T) 又は変異型 R I P 1 (R I P 1 K 3 7 6 R ノックイン) マウス骨髄由来マクロファージにおいてユビキチン化された R I P 1 を認識する。

30

【図 6 C - 6 D】図 6 A ~ D は、マウス組織試料における R I P 1 ユビキチン鎖、K 6 3 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。図 6 A 及び 6 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型及び直鎖状ユビキチン鎖で i n v i v o でユビキチン化された R I P 1 を認識する。図 6 C 及び 6 D は、示された抗体及び T C L を用いて得られた免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、野生型 (W T) 又は変異型 R I P 1 (R I P 1 K 3 7 6 R ノックイン) マウス骨髄由来マクロファージにおいてユビキチン化された R I P 1 を認識する。

40

【図 7 A】[0 0 1 6] 図 7 A ~ E は、T H P 1 細胞における R I P 2 - ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 7 A ~ D は、R I P 2 - ユビキチン鎖二重特異性抗体は K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識するが、シングルアーム (R I P 2 - g D、K 6 3 - g D、L i n - g D) 抗体はユビキチン化 R I P 2 を認識せず、R I P 2 - K 6 3、R I P 2 - L i n 及び K 6 3 - L i n 二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激 (M D P) による処理後にのみ K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識することを示している。図 7 A 及び 7 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。図 7 C は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使

50

用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖によってユビキチン化された R I P 2 を認識する。示された抗体は、K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識する。図 7 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 2 を認識する。これらの結果は、図 7 E に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 7 B】図 7 A ~ E は、T H P 1 細胞における R I P 2 - ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 7 A ~ D は、R I P 2 - ユビキチン鎖二重特異性抗体は K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識するが、シングルアーム (R I P 2 - g D、K 6 3 - g D、L i n - g D) 抗体はユビキチン化 R I P 2 を認識せず、R I P 2 - K 6 3、R I P 2 - L i n 及び K 6 3 - L i n 二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激 (M D P) による処理後にのみ K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識することを示している。図 7 A 及び 7 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。図 7 C は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖によってユビキチン化された R I P 2 を認識する。示された抗体は、K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識する。図 7 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 2 を認識する。これらの結果は、図 7 E に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 7 C】図 7 A ~ E は、T H P 1 細胞における R I P 2 - ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 7 A ~ D は、R I P 2 - ユビキチン鎖二重特異性抗体は K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識するが、シングルアーム (R I P 2 - g D、K 6 3 - g D、L i n - g D) 抗体はユビキチン化 R I P 2 を認識せず、R I P 2 - K 6 3、R I P 2 - L i n 及び K 6 3 - L i n 二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激 (M D P) による処理後にのみ K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識することを示している。図 7 A 及び 7 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。図 7 C は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖によってユビキチン化された R I P 2 を認識する。示された抗体は、K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識する。図 7 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 2 を認識する。これらの結果は、図 7 E に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 7 D】図 7 A ~ E は、T H P 1 細胞における R I P 2 - ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 7 A ~ D は、R I P 2 - ユビキチン鎖二重特異性抗体は K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識するが、シングルアーム (R I P 2 - g D、K 6 3 - g D、L i n - g D) 抗体はユビキチン化 R I P 2 を認識せず、R I P 2 - K 6 3、R I P 2 - L i n 及び K 6 3 - L i n 二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激 (M D P) による処理後にのみ K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識することを示している。図 7 A 及び 7 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を提供する。図 7 C は、W T (野生型、W)

10

20

30

40

50

細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖によってユビキチン化された R I P 2 を認識する。示された抗体は、K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識する。図 7 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 2 を認識する。これらの結果は、図 7 E に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 7 E】図 7 A ~ E は、T H P 1 細胞における R I P 2 - ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体の相互作用を示す。具体的には、図 7 A ~ D は、R I P 2 - ユビキチン鎖二重特異性抗体は K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識するが、シングルアーム (R I P 2 - g D、K 6 3 - g D、L i n - g D) 抗体はユビキチン化 R I P 2 を認識せず、R I P 2 - K 6 3、R I P 2 - L i n 及び K 6 3 - L i n 二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激 (M D P) による処理後にのみ K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識することを示している。図 7 A 及び 7 B は、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。図 7 C は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、直鎖状鎖及び K 6 3 - L i n ユビキチン結合型鎖によってユビキチン化された R I P 2 を認識する。示された抗体は、K 6 3 及び直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 2 を認識する。図 7 D は、W T (野生型、W) 細胞及び R I P 2 K O (ノックアウト、R 2 K O) T H P 1 細胞を使用して、示された抗体を用いて得られた T C L 及び免疫沈降タンパク質のウェスタンブロット分析を提供する。示された抗体は、K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 2 を認識する。これらの結果は、図 7 E に示すように、共焦点顕微鏡によって確認された。

【図 8 A】[0017] 図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 8 B】図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 8 C】図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6

10

20

30

40

50

3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 8 D】図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 8 E - 8 F】図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 8 G】図 8 A ~ G は、患者からの腸組織試料において試験された R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を示す。具体的には、図 8 A ~ F は、R I P 2 - K 6 3 及び R I P 2 - L i n 二重特異性抗体を使用して、I B D 試料中の R I P 2 のユビキチン化状態を調べることができることを示している。図 8 A 及び図 8 B は、腸がん、異形成、憩室炎 (D I V)、クローン病 (C D) 又は潰瘍性大腸炎 (U C) の患者から採取した試料からの免疫沈降タンパク質を検出する、示された抗体の能力を決定するためのウェスタンブロット分析を提供する。図 8 C 及び 8 D は、それぞれ、図 8 A の患者からの試料 1 ~ 5 2 及び試料 5 3 ~ 9 2 を示す。図 8 E は、患者試料における R I P 2 の発現を示している。図 8 F は、図 8 C 及び 8 D に示される抗体を用いた免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによる R I P 2 のユビキチン化の定量化を提供する。図 8 G は、図 8 F のデータを棒グラフ形式で示したものである。

【図 9 A - 9 B】[0018] 図 9 A ~ E は、K 6 3 - L i n 二重特異性抗体を使用して、異なるシグナル伝達経路において K 6 3 結合型及び直鎖状鎖でユビキチン化されたタンパク質を検出及び同定することができる機構を示している。図 9 A は、実験計画スキームの概略図を提供し、ここで、T H P 1 細胞は、示された期間、ビヒクル (リン酸緩衝生理食塩水、P B S)、腫瘍壊死因子 (T N F)、ムラミルジペプチド (M D P)、又はリポ多糖 (L P S) で処理され、その後、溶菌し、示された二重特異性抗体で免疫沈降され、質量分析 (M S) により解析した結果、図 9 B のタンパク質が同定され、これは図 9 C のウェスタンブロット分析でも決定された。ユビキチン化 R I P 2 は、タンデム質量分析

10

20

30

40

50

($m s / m s$ 、図 9 D) 及び抽出イオンクロマトグラフィー (X I C) によって M D P 処理条件から同定され、一致するピークが矢印で強調表示されている (図 9 E)。

【図 9 C】図 9 A ~ E は、K 6 3 - L i n 二重特異性抗体を使用して、異なるシグナル伝達経路において K 6 3 結合型及び直鎖状鎖でユビキチン化されたタンパク質を検出及び同定することができる機構を示している。図 9 A は、実験計画スキームの概略図を提供し、ここで、T H P 1 細胞は、示された期間、ビヒクル (リン酸緩衝生理食塩水、P B S)、腫瘍壊死因子 (T N F)、ムラミルジペプチド (M D P)、又はリポ多糖 (L P S) で処理され、その後、溶菌し、示された二重特異性抗体で免疫沈降され、質量分析 (M S) により解析した結果、図 9 B のタンパク質が同定され、これは図 9 C のウェスタンブロット分析でも決定された。ユビキチン化 R I P 2 は、タンデム質量分析 ($m s / m s$ 、図 9 D) 及び抽出イオンクロマトグラフィー (X I C) によって M D P 処理条件から同定され、一致するピークが矢印で強調表示されている (図 9 E)。

10

【図 9 D】図 9 A ~ E は、K 6 3 - L i n 二重特異性抗体を使用して、異なるシグナル伝達経路において K 6 3 結合型及び直鎖状鎖でユビキチン化されたタンパク質を検出及び同定することができる機構を示している。図 9 A は、実験計画スキームの概略図を提供し、ここで、T H P 1 細胞は、示された期間、ビヒクル (リン酸緩衝生理食塩水、P B S)、腫瘍壊死因子 (T N F)、ムラミルジペプチド (M D P)、又はリポ多糖 (L P S) で処理され、その後、溶菌し、示された二重特異性抗体で免疫沈降され、質量分析 (M S) により解析した結果、図 9 B のタンパク質が同定され、これは図 9 C のウェスタンブロット分析でも決定された。ユビキチン化 R I P 2 は、タンデム質量分析 ($m s / m s$ 、図 9 D) 及び抽出イオンクロマトグラフィー (X I C) によって M D P 処理条件から同定され、一致するピークが矢印で強調表示されている (図 9 E)。

20

【図 9 E】図 9 A ~ E は、K 6 3 - L i n 二重特異性抗体を使用して、異なるシグナル伝達経路において K 6 3 結合型及び直鎖状鎖でユビキチン化されたタンパク質を検出及び同定することができる機構を示している。図 9 A は、実験計画スキームの概略図を提供し、ここで、T H P 1 細胞は、示された期間、ビヒクル (リン酸緩衝生理食塩水、P B S)、腫瘍壊死因子 (T N F)、ムラミルジペプチド (M D P)、又はリポ多糖 (L P S) で処理され、その後、溶菌し、示された二重特異性抗体で免疫沈降され、質量分析 (M S) により解析した結果、図 9 B のタンパク質が同定され、これは図 9 C のウェスタンブロット分析でも決定された。ユビキチン化 R I P 2 は、タンデム質量分析 ($m s / m s$ 、図 9 D) 及び抽出イオンクロマトグラフィー (X I C) によって M D P 処理条件から同定され、一致するピークが矢印で強調表示されている (図 9 E)。

30

【図 10 A - 10 B】 [0019] 図 10 A ~ E は、図 9 A 及び 9 B に示される条件からの、T R A D D (図 10 A) (配列番号 104)、T N F R 1 (図 10 B) (配列番号 105)、R I P 1 (図 10 C) (配列番号 106)、N O D 2 (図 10 D) (配列番号 107) 及び I R A K 1 (図 10 E) (配列番号 108) の同定を示す。各タンパク質の代表的な $m s / m s$ スペクトルに注釈が付けられている。

【図 10 C - 10 D】図 10 A ~ E は、図 9 A 及び 9 B に示される条件からの、T R A D D (図 10 A) (配列番号 104)、T N F R 1 (図 10 B) (配列番号 105)、R I P 1 (図 10 C) (配列番号 106)、N O D 2 (図 10 D) (配列番号 107) 及び I R A K 1 (図 10 E) (配列番号 108) の同定を示す。各タンパク質の代表的な $m s / m s$ スペクトルに注釈が付けられている。

40

【図 10 E】図 10 A ~ E は、図 9 A 及び 9 B に示される条件からの、T R A D D (図 10 A) (配列番号 104)、T N F R 1 (図 10 B) (配列番号 105)、R I P 1 (図 10 C) (配列番号 106)、N O D 2 (図 10 D) (配列番号 107) 及び I R A K 1 (図 10 E) (配列番号 108) の同定を示す。各タンパク質の代表的な $m s / m s$ スペクトルに注釈が付けられている。

【発明を実施するための形態】

【0143】

特定の実施態様の詳細な説明

50

I. 定義

【0020】 本明細書で使用される場合、VHは重鎖可変ドメインを指し、VLは軽鎖可変ドメインを指す。

【0144】

【0021】 本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義するように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来するVLフレームワーク又はVHフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、又はアミノ酸配列の変更を含んでもよい。いくつかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。いくつかの実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して、配列が同一である。

10

【0145】

【0022】 本明細書で使用される場合、「約」は、記載された値より10%多いか若しくは少ない値、記載された値と機能的に同等の結果を与える値、又は記載された値に丸められる値を指す。

【0146】

【0023】 「親和性」とは、分子（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との単一の結合部位の間の非共有結合性相互作用の合計の強度のことを指す。別段示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原との）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性のことを指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は一般に、解離定数（Kd）によって表すことができる。親和性は、本明細書中に記載のものも含め、当技術分野で既知の一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための特定の具体的且つ例示的な実施態様を以下に記載する。

20

【0147】

【0024】 「アビディティ」とは、分子（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、1つ以上の抗原を含む標的分子）との間の非共有結合的相互作用の総和の強度を指す。分子XのそのパートナーYに対するアビディティは一般に、解離定数（Kd）によって表すことができる。二重特異性抗体は一般に、二重特異性抗体の抗原結合部位の両方によって認識されるエピトープを含む結合パートナーに対して、どちらか一方のエピトープを個別に含む結合パートナーよりも高いアビディティを有する。アビディティは、本明細書中に記載のものも含め、当技術分野で既知の一般的な方法により測定することができる。結合アビディティを測定するための特定の具体的且つ例示的な実施態様を以下に記載する。「機能的親和性（functional affinity）」という用語は、当技術分野ではアビディティ（avidity）を指すために使用されることがある。

30

【0148】

【0025】 「親和性成熟」抗体とは、改変等を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）に1つ以上の改変を有し、このような改変により抗体の抗原に対する親和性が改善される抗体を指す。

40

【0149】

【0026】 「抗体」という用語は、本明細書では最も広い意味で使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。本明細書で使用される「多重特異性抗体」という用語は、多重エピトープ特異性を有する（すなわち、1つの生物学的分子上の2つ若しくはそれ以上の異なるエピトープに結合することができるか、又は2つ若しくはそれ以上の異なる分子上の

50

エピトープに結合することができる) 抗原結合ドメインを含む抗体を網羅する。

【0150】

【0027】 本明細書で使用する「アゴニスト抗体」とは、目的のポリペプチドの機能活性の少なくとも1つを模倣する抗体である。

【0151】

【0028】 「アンタゴニスト抗体」又は「ブロック抗体」は、特異的に結合する抗原の生物学的活性を阻害又は低下させる抗体である。特定のブロック抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的に又は完全に阻害する。

【0152】

【0029】 本明細書で使用される用語「抗体薬物コンジュゲート」(ADC)は、「イムノコンジュゲート」という用語と同等である。

【0153】

【0030】 「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子(例えばscFv)；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

【0031】 参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその抗原に対する結合を50%以上遮断する抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて、抗体のその抗原に対する結合を50%以上遮断する。例示的競合アッセイが本明細書に提供される。

【0155】

【0032】 本明細書で使用される場合、「抗ポリユビキチン抗体」という用語は、ポリユビキチン分子に特異的に結合することができる抗体を指す。特定の実施態様では、ポリユビキチンに結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)の解離定数(Kd)を有する。

【0156】

【0033】 本明細書で使用される場合、用語「抗ユビキチン抗体」及び「抗モノユビキチン抗体」は互換的に使用され、ユビキチン分子に特異的に結合することができる抗体を指す。

【0157】

【0034】 本明細書で使用される場合、「抗RIP1抗体」という用語は、受容体相互作用プロテインキナーゼ1(「受容体相互作用プロテイン-1キナーゼ」、「RIP1」又は「RIPK1」)分子に特異的に結合することができる抗体を指す。特定の実施態様では、RIP1に結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $1 \sim 20 \text{ nM}$ 、例えば、 $1 \sim 15 \text{ nM}$ 、例えば、 $1 \sim 12 \text{ nM}$ 、例えば、 $1 \sim 10 \text{ nM}$)の解離定数(Kd)を有する。

【0158】

【0035】 本明細書で使用される場合、「抗RIP2抗体」という用語は、受容体相互作用プロテインキナーゼ2(「受容体相互作用セリン/スレオニンプロテインキナーゼ2」、「RIP2」又は「RIPK2」)分子に特異的に結合することができる抗体を指す。特定の実施態様では、RIP2に結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)の解離定数(Kd)を有する。

【0159】

10

20

30

40

50

【0036】 「がん (cancer)」及び「がん性 (cancerous)」という用語は、通常、制御されない細胞の増殖 (growth) / 増殖 (proliferation) を特徴とする、哺乳動物における生理学的症状のことを指すか又は説明する。がんの例としては、癌 (carcinoma)、リンパ腫 (例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより特定の例としては、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺癌腫、肺扁平上皮癌腫、腹膜のがん、肝細胞がん、消化器がん、膵がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん、結腸がん、直腸結腸がん、子宮内膜又は子宮の癌、唾液腺癌、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝癌、白血病及び他のリンパ増殖性障害並びに様々なタイプの頭頸部がんが挙げられる。

10

【0160】

【0037】 「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の起源又は種に由来し、その重鎖及び／又は軽鎖の残りの部分が、異なる起源又は種に由来する抗体のことを指す。

【0161】

【0038】 抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのいくつかは、さらにサブクラス (アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂に分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる。

20

【0162】

【0039】 本明細書で使用される「細胞傷害性剤」という用語は、細胞機能を阻害若しくは妨害し、且つ／又は細胞死若しくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害性剤としては、放射性同位体 (例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、及びLuの放射性同位体) ; 化学療法剤又は薬物 (例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド (ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤) ; 成長阻害剤 ; 酵素及びその断片、例えば核分解酵素 ; 抗生物質 ; 細菌、真菌、植物又は動物由来の低分子毒素又は酵素的活性毒素等の毒素 (その断片及び／又はバリエーションを含む) ; 並びに下記に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗がん剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0163】

【0040】 「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域に起因し得る生物学的活性のことを指し、それは抗体のアイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例としては: C1q結合及び補体依存性細胞傷害 (CDC) ; Fc受容体結合 ; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) ; 食作用 ; 細胞表面受容体 (例えば、B細胞受容体) の下方制御 ; 及びB細胞活性化が挙げられる。

【0164】

40

【0041】 薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」は、所望の治療結果又は予防的結果を達成するために、必要な投薬量及び期間にわたって有効な量を指す。

【0165】

【0042】 「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

【0166】

【0043】 本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語には、天然配列Fc領域及びバリエーションFc領域が含まれる。いくつかの実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys₂₂₆又はPro₂₃₀から、重鎖のカルボキシル末端に及

50

ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys 447)は、存在してもしなくてもよい。本明細書に別途指定がない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているような、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けに従う。

【0167】

【0044】 本明細書で使用される場合、「第1」、「第2」などは、複合体構造、例えば、抗体のような三次／四次構造を有するタンパク質の要素を参照して使用され、要素の順序又は位置決めに関するいかなる意味も伴わずに、それらの要素(例えば、単量体、鎖、ドメイン)を指す；したがって、「第1」の要素は、第2の要素に対してC末端又はN末端であってもよく、あるいは第2の要素よりも構造の一端又は別の末端から近くても遠くてもよい。したがって、例えば、二重特異性抗体の半分に関して、第1又は第2としての半分又は結合の指定は任意である。

10

【0168】

【0045】 「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH(又はVL)中で以下の配列：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で現れる。

20

【0169】

【0046】 「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、天然の抗体構造と実質的に類似した構造を有する抗体、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0170】

【0047】 「半抗体」という用語は、本明細書において、抗体の1つのアームを指すために使用され、少なくとも1つのVHドメイン及び1つのCHドメインを含む。

【0171】

【0048】 「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これには初代形質転換細胞及び継代数に関係なくそれに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸の含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する変異子孫が本明細書に含まれる。

30

【0172】

【0049】 「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生される抗体、又はヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。

40

【0173】

【0050】 「ウサギ抗体」は、ウサギ若しくはウサギ細胞によって産生される抗体、又はウサギ抗体レパートリー若しくは他のウサギ抗体をコードする配列を利用する非ウサギ供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

【0174】

【0051】 「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般的には、配列のサブグループは、Kabatら, S

50

quences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 1-3巻におけるようなサブグループである。いくつかの実施態様では、VLの場合、サブグループは、Kabataら(上記参照)におけるようなサブグループカッパIである。いくつかの実施態様では、VHの場合、サブグループは、Kabataら(上記参照)におけるようなサブグループIIIである。

【0175】

【0052】 「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つ、例えば1つ又は2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、HVR(例えばCDR)の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体に対応し、FRの全て又は実質的に全てが、ヒト抗体に対応する。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

10

【0176】

【0053】 本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変である、及び／又は構造的に定義されたループ(「超可変ループ」)を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然4鎖抗体は、VHに3つ(H1、H2、H3)、及びVLに3つ(L1、L2、L3)、計6つのHVRを含む。HVRは、一般的に、超可変ループ由来及び／又は「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最も高い配列可変性を有し、且つ／又は抗原認識に関与している。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3)に生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3)は、L1のアミノ酸残基24-34、L2のアミノ酸残基50-56、L3のアミノ酸残基89-97、H1のアミノ酸残基31-35B、H2のアミノ酸残基50-65及びH3のアミノ酸残基95-102に生じる。(Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。VHにおけるCDR1を除き、CDRは、一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、「特異性決定領域」、又は「SDR」も含み、それは、抗原と接触する残基である。SDRは、短縮CDR又はa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含まれる。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及びa-CDR-H3)は、L1のアミノ酸残基31-34、L2のアミノ酸残基50-55、L3のアミノ酸残基89-96、H1のアミノ酸残基31-35B、H2のアミノ酸残基50-58及びH3のアミノ酸残基95-102に生じる。(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照)。別段示されない限り、HVR残基及び可変ドメイン内の他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書において、上記のKabataらに従って番号付けされる。

20

30

40

【0177】

【0054】 「イムノコンジュゲート」とは、細胞傷害性剤を含むがこれに限定されない、1つ以上の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。イムノコンジュゲートは、「抗体薬物コンジュゲート」(ADC)という用語に相当する。

【0178】

【0055】 「個体」又は「患者」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、限定されないが、家畜動物(例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ)、霊長類(例えばヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類)、ウサギ、及びげっ歯類(例えばマウス及びラッ

50

ト)が含まれる。特定の実施態様では、個体又は対象はヒトである。

【0179】

【0056】 「炎症性疾患」には、クローン病、憩室炎、移植片対宿主病（GVHD）、炎症性腸疾患、腎損傷及び臓器移植後臓器機能障害、多発性硬化症、関節リウマチ、皮膚炎症性疾患、脳卒中及び潰瘍性大腸炎が含まれる。

【0180】

【0057】 「単離された」抗体は、その天然環境の成分から分離された抗体である。いくつかの実施態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）によって決定される、95%超又は99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007)を参照。

10

【0181】

【0058】 「単離された核酸」とは、その天然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離された核酸には、通常は核酸分子を含む細胞に含まれる核酸分子が含まれるが、核酸分子は染色体外に、又は天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0182】

【0059】 本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち該集団を構成する個々の抗体が、可能性のあるバリエーション抗体（例えば天然に存在する変異を含むか又はモノクローナル抗体調製物の製造中に生じ、そのようなバリエーションは通常少量存在する）を除き、同一であり且つ／又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の製造を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法、例えば、本明細書に記載のモノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法を含むが、これらに限定されない様々な技術によって作製され得る。

20

30

【0183】

【0060】 「ネイキッド抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0184】

【0061】 「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に生じる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる、可変領域（VH）、それに続く3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる、可変領域（VL）、それに続く定常軽鎖（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

40

【0185】

【0062】 「又は」とは、文脈上そうでない場合を除き、包括的な意味で、すなわち、「及び／又は」と同等に使用される。

【0186】

50

【0063】 参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列同一性最大パーセントが得られるように配列を整列し、必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のための整列は、当技術分野における技術の範囲内にある種々の方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェア等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成され得る。当業者であれば、比較する配列の全長にわたって最大のアライメントを得るのに必要な任意のアルゴリズムを含めた、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書の目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって作成され、ソースコードは、米国著作権局、Washington D.C., 20559にユーザドキュメントと共に提出され、ここで米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (South San Francisco, California) から公的に入手可能であるか、又はそのソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用するためにコンパイルする必要がある。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変わらない。

10

20

【0187】

【0064】 ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性% (あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、特定のアミノ酸配列同一性%を有する又は含む、所与のアミノ酸配列Aと言い換えることができる) は、以下のように計算される：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

【0188】

【0065】 ここで、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一であるとして一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Yは、Bの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、AのBに対するアミノ酸配列同一性%は、BのAに対するアミノ酸配列同一性%と等しくないであろうことは理解されるであろう。特に別途指定のない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載されるようにして得られる。

30

【0189】

【0066】 「薬学的製剤」という用語は、調製物中に含有される有効成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、且つ製剤を投与する対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を含有しない調製物を指す。

【0190】

【0067】 「薬学的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、バッファー、添加物、安定剤、又は防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0191】

【0068】 本明細書で使用される場合、「選択的に認識する」とは、参照される抗体が、目的のポリユビキチン化タンパク質以外のタンパク質と結合しないか、又は実質的に弱い親和性 (例えば、50倍、100倍、200倍、500倍、又は1000倍弱い親和性) で他のタンパク質と結合することを意味する。

【0192】

【0069】 本明細書で使用される場合、「実質的に含まない (substanti

50

ally free of)」とは、参照される実体が存在しないか、又は存在する場合、(i) 場合により、組成物、方法、使用、又は工程の機能的特性又は結果を有意に変化させないように、十分に少ない量で存在する；(ii) 質量分析法（例えば、MALDI-TOF 若しくは実施例で使用される任意のMS手順）、プロッティング（例えば、ポリペプチドのウェスタン法）、若しくは電気泳動（例えば、クマシーブルー若しくは銀染色を伴うSDS-PAGE）のような少なくとも1つの適切な分析方法によって検出されない；又は、(iii) 組成物中の非溶媒物質の総量に対して、質量若しくはモル分率で、約20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、若しくは0.1%以下の量で存在することを意味する。

【0193】

10

【0070】 本明細書で使用される場合、「治療(treatment)」(及び「治療する」又は「治療すること」などのその文法的変形)は、治療される個体の本来の経過を変える試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の経過の間に行うことができる。治療の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移の予防、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体は、疾患の発症を遅延させるために、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0194】

【0071】 「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれVH及びVL)は、一般に、類似の構造を有しており、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と、3つの超可変領域(HVR)とを含む。(例えば、Kindt et al. *Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照)。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体からVH又はVLドメインを使用して単離し、それぞれ相補的なVL又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングしてもよい。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991)を参照。

20

30

【0195】

【0072】 本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を増殖させることのできる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター及び導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、作用可能に連結された核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書で「発現ベクター」と呼ばれる。

【0196】

II. 組成物及び方法

【0073】 いくつかの態様では、ポリユビキチン化タンパク質、例えばポリユビキチン化炎症性タンパク質に結合する抗体が提供される。このような抗体は、例えば、ポリユビキチン化タンパク質の検出、活性の調節、又は免疫沈降に有用である。

40

【0197】

A. 例示的な抗体

【0074】 いくつかの実施態様では、多重特異性抗体は、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び受容体相互作用プロテインキナーゼ1(RIP1)に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む。いくつかの実施態様では、抗体はポリユビキチン化RIP1を選択的に認識する。いくつかの実施態様では、抗体は、受容体相互作用プロテインキナーゼ2(RIP2)を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化RIP1を認識しない。

50

【0198】

【0075】 いくつかの実施態様では、多重特異性抗体は、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び受容体相互作用プロテインキナーゼ2（RIP2）に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む。いくつかの実施態様では、抗体はポリユビキチン化RIP2を選択的に認識する。いくつかの実施態様では、抗体は、受容体相互作用プロテインキナーゼ1（RIP1）を認識しない、且つ／又は非ユビキチン化RIP2を認識しない。

【0199】

【0076】 いくつかの実施態様では、ポリユビキチンは、K11、K48、K63、又はM1（C末端からN末端）結合を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンは、均一なトポロジーを有する。

【0200】

【0077】 米国特許第7,763,245号に開示されている抗体、抗体配列、及び配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第7,763,245号に開示された抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、米国特許第7,763,245号に開示されたHVRから選択されるHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3の組み合わせを含み、こ

10

20

【0201】

【0078】 米国特許第8,133,488号に開示されている抗体、抗体配列、及び配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第8,133,488号に開示された抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、米国特許第8,133,488号に開示されたHVRから選択されるHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3の組み合わせを含み、こ

30

【0202】

【0079】 米国特許第8,992,919号に開示されている抗体、抗体配列、及び配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第8,992,919号に開示された抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、米国特許第8,992,919号に開示されたHVRから選択されるHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3の組み合わせを含み、こ

40

【0203】

【0080】 米国特許第9,321,844号に開示されている抗体、抗体配列、及び配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第9,321,844号に開示された抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、米国特許第9,321,844号に開示されたHVRから選択されるHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3の組み合わせを含み、こ

50

で、半抗体はポリユビキチンに結合する。

【0204】

【0081】 いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、配列番号9、10、11、12、13、及び14のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、配列番号23、24、25、26、27、及び28のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、配列番号37、38、39、40、41、及び42のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。いくつかの実施態様では、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体は、配列番号51、52、53、54、55、及び56のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。

10

【0205】

【0082】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体はRIP1に結合する第2の抗原結合部位を含み、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号78、配列番号79、及び配列番号80のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。いくつかの実施態様では、第2の半抗体はRIP1に結合する第2の抗原結合部位を含み、配列番号74、配列番号77、配列番号76、配列番号78、配列番号79、及び配列番号80のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。

20

【0206】

【0083】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体はRIP2に結合する第2の抗原結合部位を含み、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、及び配列番号100のアミノ酸配列をそれぞれ含むHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。

【0207】

30

【0084】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、

- (i) 配列番号9のアミノ酸配列からなるHVR-L1、
- (ii) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、且つ

第2の半抗体は、

- (i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (ii) 配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
- (iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
- (iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
- (vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

40

を含む。

【0208】

【0085】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、

- (i) 配列番号9のアミノ酸配列からなるHVR-L1、
- (ii) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、

50

(i i i) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

(i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
(i i) 配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
(i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含む。

10

【 0 2 0 9 】

【 0 0 8 6 】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

(i) 配列番号 9 のアミノ酸配列からなる H V R - L 1 、
(i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
(i i i) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含み、且つ

20

第 2 の半抗体は、

(i) 配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
(i i) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
(i i i) 配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含む。

30

【 0 2 1 0 】

【 0 0 8 7 】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

(i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列からなる H V R - L 1 、
(i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
(i i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

40

(i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
(i i) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、
(i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、
(i v) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
(v) 配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び
(v i) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3
を含む。

【 0 2 1 1 】

【 0 0 8 8 】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

(i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列からなる H V R - L 1 、

50

(i i) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
(i i) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含む。

【0212】

【0089】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

(i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
(i i) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

(i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
(i i) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含む。

【0213】

【0090】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

(i) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる H V R - L 1、
(i i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

(i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
(i i) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、
(i i i) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、
(i v) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
(v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び
(v i) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

を含む。

【0214】

【0091】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

10

20

30

40

50

- (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む。

【0215】

【0092】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

- (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

- (i) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む。

【0216】

【0093】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、

- (i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含み、且つ

第 2 の半抗体は、

- (i) 配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、
- (ii) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、
- (iii) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、
- (iv) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、
- (v) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び
- (vi) 配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H3

を含む。

【0217】

10

20

30

40

50

【0094】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、
(i) 配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
(ii) 配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
(iii) 配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
(iv) 配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
(v) 配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
(vi) 配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、且つ

第2の半抗体は、

(i) 配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
(ii) 配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
(iii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
(iv) 配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
(v) 配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
(vi) 配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む。

【0218】

【0095】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、
(i) 配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
(ii) 配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
(iii) 配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
(iv) 配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
(v) 配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
(vi) 配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含み、且つ

第2の半抗体は、

(i) 配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
(ii) 配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-L2、
(iii) 配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-L3、
(iv) 配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
(v) 配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び
(vi) 配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む。

【0219】

【0096】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号7に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号21に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号22に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号35に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号36に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号49に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、

10

20

30

40

50

及び配列番号 50 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する V H 配列を含む。

【0220】

【0097】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 7, 763, 245 号に開示された抗体の V H 及び V L 配列に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 7, 763, 245 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

10

【0221】

【0098】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 8, 133, 488 号に開示された抗体の V H 及び V L 配列に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 8, 133, 488 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

【0222】

【0099】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 8, 992, 919 号に開示された抗体の V H 及び V L 配列に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 8, 992, 919 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

20

【0223】

【0100】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 9, 321, 844 号に開示された抗体の V H 及び V L 配列に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 9, 321, 844 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

30

【0224】

【0101】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 7, 763, 245 号に開示されている抗体の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 7, 763, 245 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

【0225】

【0102】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 8, 133, 488 号に開示されている抗体の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 8, 133, 488 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

40

【0226】

【0103】 いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第 8, 992, 919 号に開示されている抗体の V H 及び V L 配列を含む。いくつかの実施態様では、第 1 の半抗体は、米国特許第 8, 992, 919 号に開示されている V H 配列と V L 配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

【0227】

50

【0104】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、ポリユビキチンに結合する米国特許第9,321,844号に開示されている抗体のVH及びVL配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、米国特許第9,321,844号に開示されているVH配列とVL配列の組み合わせを含み、ここで、半抗体はポリユビキチンに結合する。

【0228】

【0105】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号71に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号72に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。

10

【0229】

【0106】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号93に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。

20

【0230】

【0107】 いくつかの実施態様では、a) 第1の半抗体は、配列番号7に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号7に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号7に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号8に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。

30

40

50

10

20

30

40

6 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含む。

【0233】

【0110】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号49に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号50に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号49に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号50に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号73に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、配列番号49に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号50に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVL配列、及び配列番号94に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有するVH配列を含む。

【0234】

【0111】 特定の実施態様では、少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は99 %の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗体はポリユビキチンに結合する能力を保持する。特定の実施態様では、VH配列において合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入及び／又は欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意選択で、抗体は上記で論じたVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。

【0235】

【0112】 特定の実施態様では、少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は99 %の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗体はポリユビキチンに結合する能力を保持する。特定の実施態様では、VL配列において合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入及び／又は欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意選択で、抗体は上記で論じたVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。

【0236】

【0113】 いくつかの実施態様では、抗体はヒト化されている。いくつかの実施態様では、抗体は、上記の実施態様のいずれかにおけるようなHVRを含み、さらに、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。いくつかの実施態様では、抗体は、上記の実施態様のいずれかにおけるようなHVR及びウサギフレームワーク領域を含む。

【0237】

【0114】 いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体と同じエпитオプに結合する抗体が提供される。例えば、特定の実施態様では、第1の半抗体及び第2の半抗体を含む抗体と同じエпитオプに結合する抗体が提供され、ここで、

- a) 第1の半抗体は、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- b) 第1の半抗体は、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- c) 第1の半抗体は、配列番号7のVL配列及び配列番号8のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列を含む；
- d) 第1の半抗体は、配列番号21のVL配列及び配列番号22のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- e) 第1の半抗体は、配列番号21のVL配列及び配列番号22のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- f) 第1の半抗体は、配列番号21のVL配列及び配列番号22のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列を含む；
- g) 第1の半抗体は、配列番号35のVL配列及び配列番号36のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- h) 第1の半抗体は、配列番号35のVL配列及び配列番号36のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- i) 第1の半抗体は、配列番号35のVL配列及び配列番号36のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列を含む；
- j) 第1の半抗体は、配列番号49のVL配列及び配列番号50のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号71のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；
- 1) 第1の半抗体は、配列番号49のVL配列及び配列番号50のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号72のVL配列及び配列番号73のVH配列を含む；又は
- 1) 第1の半抗体は、配列番号49のVL配列及び配列番号50のVH配列を含み、第2の半抗体は、配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列を含む。

【0238】

【0115】 いくつかの実施態様では、前段落のa)からl)のうちの1つにあるようなVH配列及びVL配列を含む二重特異性抗体が提供される。

【0239】

【0116】 いくつかの実施態様では、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、抗体は、抗体断片、例えば、二量体scFv、ダイアボディ、又はF(ab')₂断片である。別の実施態様では、抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、若しくはIgG4抗体、あるいは本明細書に定義される他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

【0240】

【0117】 いくつかの実施態様では、抗体は、C末端リジンを有する少なくとも1つの重鎖を含む。いくつかの実施態様では、抗体は、C末端リジンを欠く少なくとも1つの重鎖を含む。いくつかの実施態様では、抗体は、C末端リジンを含まない重鎖のみを含む。C末端リジンは、例えば、カルボキシペプチダーゼ処理などの酵素的に、又は重鎖コード配列の3'末端のリジンコドンの欠失若しくは置換などの遺伝学的に除去することが

できる。重鎖のC末端リジンは抗原結合部位から離れた位置にあり、結合活性には不要であるため、これを除去することにより、より均一な抗体調製物を得ることができる。

【0241】

【0118】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、

a) 配列番号2に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b) 配列番号16に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号18に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c) 配列番号30に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d) 配列番号44に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号46に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列

を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0242】

【0119】 いくつかの実施態様では、第1の半抗体は、

a) 配列番号2に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

b) 配列番号16に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；

c) 配列番号30に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号34に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列；又は

d) 配列番号44に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号48に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列

を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の鎖から欠失している。

【0243】

【0120】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号60に対して少な

くとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0244】

【0121】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号60に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

10

【0245】

【0122】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0246】

20

【0123】 いくつかの実施態様では、第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み；任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0247】

【0124】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、ここで

a) 第1の半抗体は、配列番号2に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

30

第2の半抗体は、配列番号60に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号70に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

b) 第1の半抗体は、配列番号2に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

第2の半抗体は、配列番号60に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

c) 第1の半抗体は、配列番号16に対して少なくとも約90%、91%、92%、9

50

第 2 の半抗体は、配列番号 60 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 70 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

10

e) 第1の半抗体は、配列番号30に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号32に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

20

f) 第1の半抗体は、配列番号30に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号34に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

30

g) 第1の半抗体は、配列番号44に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号46に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

40

h) 第1の半抗体は、配列番号44に対して少なくとも約90%、91%、92%、9

50

3 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号48に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体は、配列番号60に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号68に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

任意選択で、上記において、C末端リジンが1つ以上の鎖から欠失している。

10

〔0248〕

〔0125〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、ここで

a) 第1の半抗体は、配列番号2に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号4に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

20

b) 第1の半抗体は、配列番号2に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号6に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号90に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

30

c) 第1の半抗体は、配列番号16に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号18に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号92に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

40

d) 第1の半抗体は、配列番号16に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号20に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第2の半抗体は、配列番号84に対して少なくとも約90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有す

50

る軽鎖配列、及び配列番号 90 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

e) 第 1 の半抗体は、配列番号 30 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 32 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体は、配列番号 84 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 92 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

10

f) 第 1 の半抗体は、配列番号 30 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 34 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体は、配列番号 84 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 90 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

20

g) 第 1 の半抗体は、配列番号 44 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 46 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体は、配列番号 84 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 92 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

30

h) 第 1 の半抗体は、配列番号 44 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 48 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含み、

第 2 の半抗体は、配列番号 84 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する軽鎖配列、及び配列番号 90 に対して少なくとも約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %の配列同一性を有する重鎖配列を含む；

40

任意選択で、上記において、C 末端リジンが 1 つ以上の鎖から欠失している。

【0249】

【0126】 いくつかの実施態様では、抗体は、第 1 の半抗体及び第 2 の半抗体を含み、第 1 の半抗体は、配列番号 2 の軽鎖配列及び配列番号 4 の重鎖配列を含み、第 2 の半抗体は、配列番号 60 の軽鎖配列及び配列番号 70 の重鎖配列を含み、任意選択で、C 末端リジンが 1 つ以上の重鎖から欠失している。

【0250】

50

〔0127〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0251〕

〔0128〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0252〕

〔0129〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0253〕

〔0130〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0254〕

〔0131〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0255〕

〔0132〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号70の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0256〕

〔0133〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号60の軽鎖配列及び配列番号68の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0257〕

〔0134〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号4の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0258〕

〔0135〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号2の軽鎖配列及び配列番号6の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0259〕

〔0136〕 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号18の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

〔0260〕

10

20

30

40

50

【0137】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号16の軽鎖配列及び配列番号20の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0261】

【0138】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号32の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0262】

【0139】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号30の軽鎖配列及び配列番号34の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0263】

【0140】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号46の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号92の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0264】

【0141】 いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、第1の半抗体は、配列番号44の軽鎖配列及び配列番号48の重鎖配列を含み、第2の半抗体は、配列番号84の軽鎖配列及び配列番号90の重鎖配列を含み、任意選択で、C末端リジンが1つ以上の重鎖から欠失している。

【0265】

【0142】 さらに態様では、上記の実施態様のいずれかによる抗体は、以下のセクション1～7に記載されるように、任意の特徴を単独で又は組み合わせて組み込んでもよい。

【0266】

1. 抗体親和性

【0143】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ の解離定数 (K_d) を有し、任意選択で、 $\geq 10^{-13} \text{ M}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$) である。

【0267】

【0144】 いくつかの実施態様では、 K_d は、以下のアッセイによって説明されるように、目的とする抗体の Fab バージョン及びその抗原を用いて行われる放射性標識抗原結合アッセイ (RIA) によって測定される。抗原に対する Fab の溶液結合親和性は、Fab を、非標識抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の (^{125}I) 標識抗原で平衡化し、その後、結合した抗原を抗 Fab 抗体コーティングプレートで捕捉することによって測定される (例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照)。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、50 mM の炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中の $5 \mu\text{g/mL}$ の捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) で一晚コーティングし、その後、PBS 中の 2% (w/v) ウシ血清アルブミンで 2 から 5 時間にわたって室温 (およそ 23°C) でブロックする。非吸着性のプレート (Nunc 番号 # 269620) 中で、 100 pM 又は 26 pM [^{125}I] - 抗原を、目的とする Fab の段階希釈液と混合する (例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997) における抗 VEGF 抗体、Fab-12 の評価と一致する)。次いで、目的の Fab を一晚インキュベートす

10

20

30

40

50

る。但し、インキュベーションは、平衡状態に達したことを確認するためにさらに長時間（例えば約65時間）にわたって継続してもよい。その後、この混合物を捕捉プレートに移し、室温でインキュベートする（例えば1時間）。次に、溶液を除去し、プレートを、PBS中0.1%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μ l/ウェルのシンチラント（scintillant）（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を添加し、プレートをTOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）上で10分間カウントする。最大結合の20%以下をもたらす各Fabの濃度を、競合結合アッセイでの使用のために選択する。

【0268】

【0145】 いくつかの実施態様では、Kdは、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、25℃で、約10の応答ユニット（RU）で固定化抗原CM5チップを用いて測定される。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（CM5、BIACORE, Inc.）を、供給業者の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を10mM酢酸ナトリウム、pH4.8で、5 μ g/ml（約0.2 μ M）に希釈した後、5 μ l/分の流量で注入し、結合タンパク質のおよそ10反応単位（RU）を達成する。抗原の注入後、未反応群をブロックするために、1Mのエタノールアミンを注入する。動力学測定のために、Fabの2倍段階希釈物（0.78nM~500nM）を、0.05%のポリソルベート20（Tween-20（商標））界面活性剤（PBST）と共に、25℃、約25 μ l/分の流量でPBS中に注入する。会合速度（kon）及び解離速度（koff）を、単純な1対1Langmuir結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Software第3.2版）を使用して、会合センサグラム及び解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数（Kd）は、koff/kon比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881（1999）を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が106M⁻¹s⁻¹を超える場合、会合速度は、流動停止を備えた分光光度計（Aviv Instruments）又は攪拌型キュベットを伴う8000シリーズのSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic）などの分光計により測定される、漸増濃度の抗原の存在下における、PBS（pH7.2）中20nMの抗抗原抗体（Fab形態）の25℃での蛍光放出強度（励起=295nm；放出=340nm、帯域通過を16nmとする）の増加又は減少を測定する蛍光消光技術を使用することによって決定することができる。

【0269】

2. 抗体断片

【0146】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、F(ab')₂断片、二量体単鎖Fv、及び以下に記載する他の断片が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の概説については、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134（2003）を参照。scFv断片の総説については、例えばPluckthunのThe Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315（1994）を参照。また、国際公開第93/16185号、並びに米国特許第5571894号及び第5587458号も参照のこと。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivo半減期が長くなったFab及びF(ab')₂断片の説明については、米国特許第5,869,046号を参照のこと。

【0270】

【0147】 いくつかの実施態様では、抗体はダイアボディである。ダイアボディは

、二価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404097号、国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照。

【0271】

【0148】 単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部又は軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む抗体断片である。特定の実施態様では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516号を参照)。

10

【0272】

【0149】 抗体断片は、本明細書に記載されているように、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、及び組換え宿主細胞 (例えば、大腸菌 (E. coli) 又はファージ) による生産を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製することができる。

【0273】

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

【0150】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorris et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。いくつかの実施態様では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ又は非ヒト霊長類 (サルなど) 由来の可変領域) とヒト定常領域とを含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のそれらから変更されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

20

【0274】

【0151】 特定の実施態様では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。通常、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR (又はその一部) が非ヒト抗体由来であり、且つFR (又はその一部) がヒト抗体配列由来である1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意選択で、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体のいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復するか、又は改善するために、非ヒト抗体 (例えば、HVR残基が由来する抗体) 由来の対応する残基で置換されている。

30

【0275】

【0152】 ヒト化抗体及びそれらの作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に概説されており、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、及び第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 移植について説明)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を説明)、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を説明)、並びにOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRシャッフリングに対する「誘導選択」アプローチを説明) にさらに記載されている。

40

【0276】

【0153】 ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、以下のものが含ま

50

れるが、これらに限定されるものではない：「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993) を参照）；軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；及び Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)）；ヒト成熟（体細胞変異した）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞株フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci., 13:1619-1633 (2008) を参照）；及び FR ライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem., 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok et al., J. Biol. Chem., 271:22611-22618 (1996) を参照）。

10

【0277】

4. ヒト抗体

【0154】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体を、当技術分野で公知の様々な技術を使用して製造することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol., 20:450-459 (2008) に記載されている。

【0278】

20

【0155】 ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製してもよい。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座に取って代わるか、又は染色体外に存在するか、又は動物の染色体にランダムに組み込まれるヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有する。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech., 23:1117-1125 (2005) を参照。また、例えば XENOMOUSETM 技術を記載している米国特許第 6075181 号及び第 6150584 号、HuMab（登録商標）技術を記載している米国特許第 5770429 号、K-M MOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第 7041870 号、及び VelociMouse（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第 2007/0061900 号も参照されたい。このような動物によって生成されたインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

30

【0279】

【0156】 ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によっても作製することができる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髄腫細胞株及びマウス-ヒト異種骨髄腫細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及び Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991) を参照）。ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術を用いて作製されるヒト抗体については、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) にも記載されている。さらなる方法には、例えば米国特許第 7189826 号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト IgM 抗体の作製について記載）及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマについて記載）に記載されているものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）は、Vollmer

40

50

s and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3) : 927-937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3) : 185-91 (2005) にも記載されている。

【0280】

【0157】 ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択される Fv クローン可変ドメイン配列を単離することによっても作製され得る。その後、そのような可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を以下に記載する。

【0281】

5. ライブラリー由来の抗体

【0158】 抗体は、所望される活性（複数可）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作成し、所望の結合特性を有する抗体についてこのようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が当技術分野で知られている。このような方法は、例えば、Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) にレビューされており、さらに例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); 及び Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004) に記載されている。

【0282】

【0159】 ある特定のファージディスプレイ法において、VH 遺伝子と VL 遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって別個にクローニングされ、ファージライブラリー中で無作為に組換えられ、これをその後、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) に記載されているように抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、一般的には、単鎖 Fv (scFv) 断片として、又は Fab 断片として、抗体断片を提示する。免疫源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725-734 (1993) に記載されているように、ナイーブレパートリーをクローニング（例えばヒトから）して、免疫化を行わずに広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する単一の供給源の抗体を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリーも、Hoogenboom and Winter, *Journal of Molecular Biology* 227:381-388 (1992) に記載されるように、幹細胞から再整列していない V 遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含む PCR プライマーを用い、高度に可変性の CDR3 領域をコードし、*in vitro* で再整列を達成することによって、合成的に作成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーについて記載する特許公報としては、例えば：米国特許第 5,750,373 号、並びに米国特許出願公開第 2005/0079574 号、同第 2005/0119455 号、同第 2005/0266000 号、同第 2007/0117126 号、同第 200

7 / 0 1 6 0 5 9 8 号、同第 2 0 0 7 / 0 2 3 7 7 6 4 号、同第 2 0 0 7 / 0 2 9 2 9 3 6 号、及び同第 2 0 0 9 / 0 0 0 2 3 6 0 号が挙げられる。

【0283】

【0160】 ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書においてヒト抗体又はヒト抗体の断片とみなされる。

【0284】

6. 多重特異性抗体

【0161】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製され得る。

【0285】

【0162】 多重特異性抗体を作製するための技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え同時発現 (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983))、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)を参照)、及び「ノブ・イン・ホール」操作 (例えば、米国特許第5,731,168号を参照) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、抗体は、第1の半抗体及び第2の半抗体を含み、ここで、第1の半抗体は、ノブ変異を含む第1の重鎖定常領域を含み、第2の重鎖は、ホール変異を含む第2の重鎖定常領域を含む；又は、第1の半抗体は、ホール変異を含む第1の重鎖定常領域を含み、第2の重鎖は、ノブ変異を含む第2の重鎖定常領域を含む。いくつかの実施態様では、抗体はIgG1抗体であり、ノブ変異はT366W変異を含む。いくつかの実施態様では、抗体はIgG1抗体であり、ホール変異は、T366S、L368A及びY407Vから選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つの変異を含む。いくつかの実施態様では、抗体はIgG4抗体であり、ノブ変異はT366W変異を含む。いくつかの実施態様では、抗体はIgG4抗体であり、ホール変異は、T366S、L368A及びY407Vの変異から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つの変異を含む。前述の変異の位置の番号付けはEU番号付けである。重鎖配列中の変異の実際の位置は、例えば、先行する可変領域の長さによって、例えば最大10の位置まで異なることがある。

【0286】

【0163】 多重特異性抗体は、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果を操作すること (国際公開第2009/089004A1号)；2つ以上の抗体又は断片を架橋すること (例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照)；ロインジッパーを使用して二重特異性抗体を生成すること (例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照)；二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術を使用すること (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)；及び単鎖Fv(sFv)二量体を使用すること (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照)；及び、例えば、Tuttt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)に記載されているように三重特異性抗体を調製することによって作製することもできる。いくつかの実施態様では、抗体はダイアボディである。ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404097号、国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照。

【0287】

【0164】 トリアボディ及びテトラボディは、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。いくつかの実施態様では、抗体はトリアボディである。いくつかの実施態様では、トリアボディは、第1の抗原認識部位、第2の抗原認識部位、及び第3の抗原認識部位を含み、抗原認識部位の少なくとも1つは他の抗原認識部位とは異なる。いくつかの実施態様では、トリアボディは、3つの異なるポリユビキチンに結合する第1、第2、及び第3の抗原認識部位を含む。各抗原認識部位は、HVRの組み合わせ、又は上記で論じたVLとVHの組み合わせを含むことができる。

【0288】

【0165】 いくつかの実施態様では、抗体はテトラボディである。いくつかの実施態様では、テトラボディは、第1の抗原認識部位、第2の抗原認識部位、第3の抗原認識部位、及び第4の抗原認識部位を含み、ここで、抗原認識部位の少なくとも1つ又は少なくとも2つは他の抗原認識部位とは異なる。いくつかの実施態様では、テトラボディは、3つの異なるポリユビキチンに結合する第1、第2、及び第3の抗原認識部位を含む。いくつかの実施態様では、テトラボディは、上記で論じたHVRの組み合わせ、又はVLとVHの組み合わせを含むことができる各抗原認識部位を含む。

10

【0289】

【0166】 「オクトパス抗体」を含む3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体も本明細書に含まれる（例えば米国特許出願公開第2006/0025576号を参照されたい）。オクトパス抗体という用語は、米国特許出願公開第2006/0025576A1号で論じられている意味で使用され、タコによって産生される、又はタコから得られる抗体を指すことを意味するものではない。

20

【0290】

【0167】 本明細書の抗体又は断片には、2つの異なる抗原に結合する2つの抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」又は「DAF」も含まれる（例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号を参照）。

【0291】

7. 抗体バリエーション

【0168】 特定の実施態様では、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することにより、又はペプチド合成により調製することができる。そのような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失及び／又は抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入及び／又は抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせは、最終構築物が、所望の特徴（例えば、抗原結合）を有する限り、最終構築物に到達するように行うことができる。

30

【0292】

a) 置換、挿入及び欠失バリエーション

【0169】 特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体バリエーションが提供される。置換による変異導入のための目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換は、表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1において、「例示的な置換」の見出しの下に提供されており、また、アミノ酸側鎖クラスに関しては以下でさらに説明するのとおりである。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、その産物を所望の活性、例えば抗原結合の保持／改善、免疫原性の低下又はADC若しくはCDCの改善についてスクリーニングすることができる。

40

表1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp, Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;ノルロイシン	Leu
Leu(L)	ノルロイシン;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0293】

【0170】 アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類され得る。

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0294】

【0171】 非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0295】

【0172】 一種の置換バリエントは、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般的には、結果として得られ、さらなる研究のために選択された1つ以上のバリエントは、親抗体と比較して、特定の生物学的特性に修飾（例えば改善）（例えば親和性の向上、免疫原性の低下）を有し、且つ／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換型バリエントは、親

和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載されるようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して、簡便に生成され得る。簡単に言えば、1つ以上のHVR残基が変異され、そしてファージ上に表示されたバリエーション抗体が、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0296】

【0173】 改変（例えば、置換）は、抗体親和性を改善するために、例えば、HVRにおいて行われてもよい。かかる改変は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程で高頻度で変異を経るコドンによってコードされた残基（例えば、Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)）を参照のこと）、及び／又はSDR（a-CDR）に行われてもよく、結果として生じるバリエーションVH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリーの構築及びそこからの再選択による親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施態様では、多様性が、様々な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異）のうちのいずれかによって、成熟させるために選択された可変遺伝子に導入される。次いで、二次ライブラリーが作製される。その後、このライブラリーがスクリーニングされて、所望の親和性を有する任意の抗体バリエーションを同定する。多様性を導入する別の方法は、複数のHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）がランダム化されるHVR特異的手法（HVR-directed approach）を伴う。抗原結合に關与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に同定され得る。特にCDR-H3及びCDR-L3が標的とされることが多い。

【0297】

【0174】 特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVR中で行われてよい。そのような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDR外であり得る。上に提供されるバリエーションVH及びVL配列の特定の実施態様では、各HVRは、変化していないか、又は1つ、2つ若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

【0298】

【0175】 突然変異誘発の標的となり得る抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085に記載されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基又は標的残基のグループ（例えばarg、asp、his、lys及びglu等の荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判定するために、中性又は負荷電アミノ酸（例えばアラニン又はポリアラニン）により置き換えられる。最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置にさらなる置換を導入することもできる。あるいは、又はさらに、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点が同定される。このような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的にしても排除してもよい。バリエーションは、所望の特性を有するか否かを決定するためにスクリーニングされてもよい。

【0299】

【0176】 アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合、並びに1個又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入バリエーションは、抗体の血清半減期を延長させる酵素（例えばADEPTのための）又はポリペプチドに対する抗体のN末端又はC末端への融合物を含む。

【0300】

b) グリコシル化バリエーション

【0177】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化されている程度を増加又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作成又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することにより、簡便に達成され得る。

【0301】

【0178】 抗体がFc領域を含む場合、それに結合する炭水化物は改変され得る。哺乳動物細胞によって産生された天然型抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に付着される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al., *TI B TECH* 15:26-32 (1997) を参照。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに付着したフコースが含まれ得る。いくつかの実施態様では、特定の改善された特性を有する抗体バリエーションを作製するために、抗体中のオリゴ糖の修飾が行われてもよい。

【0302】

【0179】 いくつかの実施態様では、Fc領域に（直接又は間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体バリエーションが提供される。例えば、このような抗体内のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%又は20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されたように、Asn297（例えば、複合体構造、ハイブリッド構造、及び高マンノース構造）に付着した全ての糖鎖構造の合計に対するAsn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297とは、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のEu番号付け）に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297は、抗体内のわずかな配列変異のため、297位から約±3アミノ酸上流又は下流に、すなわち、294位と300位との間に位置し得る。このようなフコシル化バリエーションは、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）；同第2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体バリエーションに関する刊行物の例としては：米国特許出願公開第2003/0157108号；国際公開第2000/61739号；国際公開第2001/29246号；米国特許出願公開第2003/0115614号；米国特許出願公開第2002/0164328号；米国特許出願公開第2004/0093621号；米国特許出願公開第2004/0132140号；米国特許出願公開第2004/0110704号；米国特許出願公開第2004/0110282号；米国特許出願公開第2004/0109865号；国際公開第2003/085119号；国際公開第2003/084570号；国際公開第2005/035586号；国際公開第2005/035778号；国際公開第2005/053742号；国際公開第2002/031140号；Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞（Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)）；米国特許出願番号US2003/0157108A1、Presta, L.；及び国際公開第2004/056312A1号、Adamsら、特に実施例11）、並びにアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)、Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 9

10

20

30

40

50

4 (4) : 680-688 (2006)、及び国際公開第2003/085107号を参照のこと)が挙げられる。

【0303】

【0180】 さらに、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分された二分岐オリゴ糖を有する抗体バリエーションが提供される。このような抗体バリエーションは、低減されたフコシル化及び／又は改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体バリエーションの例は、例えば、国際公開第2003/011878号 (Jean-Mairetら) ; 米国特許第6602684号 (Umanaら) ; 及び米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umanaら) に記載されている。Fc領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体バリエーションも提供される。このような抗体バリエーションは、改善されたCDC機能を有し得る。このような抗体バリエーションは、例えば、国際公開第1997/30087号 (Patelら) ; 同第1998/58964号 (Raju, S.) ; 及び同第1999/22764号 (Raju, S.) に記載されている。

10

【0304】

c) Fc領域バリエーション

【0181】 特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸修飾が本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それにより、Fc領域バリエーションが作製され得る。Fc領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸改変 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 Fc領域) を含む。

20

【0305】

【0182】 特定の実施態様では、抗体バリエーションは、全てではないが、いくつかのエフェクター機能を有することにより、in vivoでの抗体の半減期が重要ではあるが、特定のエフェクター機能 (補体及びADCC等) が不要又は有害である用途に望ましい候補となる。CDC及び／又はADCC活性の低下／枯渇を確認するために、in vitro及び／又はin vivoの細胞傷害性アッセイを実行することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを実施して、抗体がFcγR結合を欠いている (したがってADCC活性を欠いている可能性がある) が、FcRn結合能力を保持していることを確認することができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞はFc (RIIIのみを発現する一方、単球は、Fc (RI、Fc (RII、及びFc (RIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) を参照。目的とされる分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) を参照) 、及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985) 、米国特許第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) を参照) に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい (例えばフローサイトメトリー用のACTITM 非放射性細胞傷害性アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA) ; 及びCytotox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照) 。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。あるいは、又はさらに、目的とする分子のADCC活性は、in vivoで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) に開示される動物モデルにおいて評価され得る。また、抗体がC1qに結合することができないがゆえにCDC活性を欠いていることを確認するために、C1q結合アッセイを行ってもよい。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第200

30

40

50

5 / 100402号における、C1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが行われ得る（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照）。FcRn結合及びin vivoクリアランス／半減期の決定も、当技術分野で既知の方法を用いて行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006)を参照）。

【0306】

10

【0183】 エフェクター機能が低下した抗体としては、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327及び329の1つ以上の置換を有する抗体が挙げられる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体としては、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体（残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む）が挙げられる。

【0307】

【0184】 FcRに対する結合が改善又は減少した特定の抗体バリエーションが記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001)を参照）。

20

【0185】 特定の実施態様では、抗体バリエーションは、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えばFc領域の298、333及び／又は334位（残基のEU番号付け）における置換を有するFc領域を含む。

【0308】

【0186】 いくつかの実施態様では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記載されるように、変化した（すなわち、改善されたか又は減少したかのいずれか）C1q結合及び／又は補体依存性細胞傷害性（CDC）をもたらす改変が、Fc領域において行われる。

30

【0309】

【0187】 母体IgGの胎児への移送に関与する半減期の延長及び新生児Fc受容体（FcRn）への結合の改善を有する抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）については、米国特許出願公開第2005/0014934 A1号（Hinton et al.）に記載されている。それらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つ以上の置換をFc領域内に有するFc領域を含む。このようなFcバリエーションには、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434のうちの1つ以上における置換、例えば、Fc領域残基434の置換が含まれる（米国特許第7,371,826号）。

40

【0310】

【0188】 Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

【0311】

d) システイン操作抗体バリエーション

【0189】 特定の実施態様では、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換され

50

ているシステイン改変抗体、例えば、「チオマブ (t h i o M A b)」を作成することが望ましい場合がある。特定の実施態様では、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位に存在する。これらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書にさらに記載されるように、抗体を薬物部位又はリンカー薬物部位等のような他の部位にコンジュゲートさせてイムノコンジュゲートを作製するために使用され得る。特定の実施態様では、以下の残基のいずれか1つ以上がシステインで置換されていてもよい：軽鎖のV205 (K a b a t 番号付け)；軽鎖のK149 (K a b a t 番号付け)；重鎖のA118 (E U 番号付け)；及び重鎖Fc領域のS400 (E U 番号付け)。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように生成され得る。

10

【0312】

e) 抗体誘導体

【0190】 特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手可能な追加の非タンパク質部分を含むようにさらに改変され得る。抗体の誘導体化に適した部位としては、水溶性ポリマーが挙げられるが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水の中でのその安定性に起因して、製造時に有利であり得る。そのポリマーは、任意の分子量であってもよく、分枝状であっても、分枝状でなくてもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、複数のポリマーが結合している場合、それらは同じ分子でも異なる分子でもよい。一般に、誘導体化のために使用されるポリマーの数及び／又は種類は、限定されないが、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が定義された条件下で治療に使用されるかどうか等の考慮事項に基づいて決定され得る。

20

30

【0313】

【0191】 別の実施態様では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。いくつかの実施態様では、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである (K a m e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 102:11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長のものであってよく、通常の細胞には害を与えないが、抗体-非タンパク質部分に近位の細胞が死滅する温度まで非タンパク質部分を加熱する波長を含むが、これに限定されない。

【0314】

B. 組換え法及び組成物

【0192】 抗体は、例えば米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え法及び組成物を使用して産生され得る。いくつかの実施態様では、本明細書に記載される抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び／又は抗体のVHを含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖) をコードすることができる。さらなる実施態様では、そのような核酸を含む1つ以上のベクター (例えば、発現ベクター) が提供される。さらなる実施態様では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。いくつかのそのような実施態様では、宿主細胞は以下を含む (例えば、以下を用いて形質転換されている)：(1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列と、抗体のVHを含むアミノ酸配列とをコードする核酸を含むベクター、又は(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、及び抗

40

50

体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクター。いくつかの実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体の作製方法が提供され、この方法は、上述される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養することと、任意選択的に、抗体を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収することを含む。

【0315】

【0193】 いくつかの実施態様では、多重特異性抗体の成分（例えば、第1の半抗体及び第2の半抗体）は、別個の細胞又は細胞培養物中で発現され、その後、*in vitro*で組み合わせられる。他の実施態様では、多重特異性抗体の全ての成分は同じ細胞又は細胞培養物中で発現される。

10

【0316】

【0194】 抗体の組換え産生に関しては、例えば、上述の抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び／又は発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。このような核酸は、従来の手順を用いて（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離及び配列決定され得る。

【0317】

【0195】 抗体をコードするベクターのクローニング又は発現のための適切な宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされていない場合には、細菌中で産生されてもよい。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号、第5789199号及び第5840523号を参照。（また、*Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. C. Lo ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245~254*も参照のこと（*E. coli*における抗体断片の発現を記載している）。発現後、本発明の抗体は、細菌細胞ペーストから可溶性画分として単離され、さらに精製することができる。

20

【0318】

【0196】 原核生物に加え、真核生物の微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、抗体をコードするベクターに適切なクローニング又は発現の宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株及び酵母株を含み、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体を産生する。*Gerngross, Nat. 22:1409-1414 (2004)*、及び*Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)*を参照。

30

【0319】

【0197】 グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と組み合わせ、特にヨトウガ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションに使用できるバキュロウイルス株が数多く同定されている。

40

【0320】

【0198】 植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照。

【0321】

【0199】 脊椎動物細胞も、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例は、SV40（COS-7）で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株（例

50

例えば、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977) に記載されるような293又は293細胞) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK) ; マウスセルトリ細胞 (例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸部癌細胞 (HELA)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2)、マウス乳房腫瘍 (MMT 060562)、例えば、Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載されるようなTRI細胞 ; MRC5細胞 ; 及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) ; 及び骨髓腫細胞株、例えば、Y0、NS0、及びSp2/0が含まれる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照。

10

【0322】

C. アッセイ

【0200】 本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られている様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的特性及び／又は生物学的活性について同定、スクリーニング、又は特性決定することができる。

20

【0323】

【0201】 いくつかの態様では、抗体は、その抗原結合活性について、例えばELISA、FACS又はウェスタンブロットなどの既知の方法によって試験される。

【0324】

【0202】 別の態様では、競合アッセイを使用して、本明細書に記載の抗体のいずれかと競合する抗体を同定することができる。特定の実施態様では、このような競合抗体は、本明細書に記載される抗体が結合する同じエピトープ (例えば、直線状又は立体配座エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法が、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。

30

【0325】

【0203】 例示的な競合アッセイでは、固定化されたポリユビキチンを、それに結合する第1の標識抗体 (例えば、本明細書に記載の抗体のいずれか) と、ポリユビキチンへの結合について第1の抗体と競合する能力について試験される第2の非標識抗体とを含む溶液とインキュベートする。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、ポリユビキチンを、第1の標識抗体を含むが第2の非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。第1の抗体のポリユビキチンへの結合を許容する条件下でのインキュベーション後、過剰な未結合抗体が除去され、固定化されたポリユビキチンに結合した標識の量が測定される。固定化されたポリユビキチンに結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、ポリユビキチンへの結合に関して、第2の抗体が第1の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照。

40

【0326】

【0204】 いくつかの実施態様では、RIP1-又はRIP2-K63結合型及び／又は直鎖状ユビキチン鎖二重特異性抗体は、試料、例えば細胞又は組織試料において、K63結合型及び／又は直鎖状ユビキチンでポリユビキチン化されたRIP1又はRIP

50

2のそれぞれの選択的ユビキチン化を検出するための方法であって、該試料を該抗体と接触させることを含む方法において使用される。いくつかの実施態様では、R I P 1ー又はR I P 2ー直鎖状結合型ユビキチン鎖二重特異性抗体は、それぞれ、直鎖状結合型ユビキチンでポリユビキチン化されたR I P 1又はR I P 2の選択的なユビキチン化を、例えば、細胞試料又は組織試料などの試料中で検出することを可能にする。

【0327】

【0205】 いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体を使用して、K 6 3結合型及び／又は直鎖状ポリユビキチンなどのR I P 1又はR I P 2のユビキチン化を、例えば細胞試料又は組織試料において免疫蛍光法により検出するための方法が提供される。以下の例で示されるように、検出は時間及び／又はシグナルに依存した方法で行うことができる。単一の二重特異性抗体を使用すると、複数の抗体の重複パターンを退屈なほど検索する必要性を有利に排除することができ、且つ／又は細胞局在決定の特異性と精度を向上させることができる。

10

【0328】

【0206】 本明細書に記載の抗体はまた、腸切除手術を受けている対象からの組織試料をアッセイして、R I P 2のユビキチン化レベルを決定する方法にも使用することができる。実施例で実証されているように、クローン病及び潰瘍性大腸炎を有する対象からの試料では、非I B D対照試料及び憩室炎試料ではユビキチン化レベルが低いのは対照的に、R I P 2がK 6 3結合型及び／又は直鎖状ユビキチン鎖で高度にユビキチン化されている可能性がある。

20

【0329】

【0207】 また、本明細書では、R I P 2標的化療法の候補として対象を同定する方法であって、対象からの試料を本明細書に記載の抗体と接触させ、K 6 3結合型及び／又は直鎖状ポリユビキチン化R I P 2などのポリユビキチン化R I P 2のレベルを決定することを含む方法が提供される。いくつかの実施態様では、対象は、クローン病若しくは潰瘍性大腸炎を有するか、又は有する疑いがある。いくつかの実施態様では、試料は、細胞試料又は組織試料である。

【0330】

【0208】 いくつかの実施態様では、分岐ポリユビキチン鎖、ハイブリッドポリユビキチン鎖、又は混合ポリユビキチン鎖を含むR I P 1又はR I P 2のユビキチン化を検出するための方法が提供され、例えば、分岐ポリユビキチン鎖、ハイブリッドポリユビキチン鎖、又は混合ポリユビキチン鎖は、1つ以上のK 6 3結合型及び／又は直鎖状ユビキチン鎖を含む。

30

【0331】

D. イムノコンジュゲート

【0209】 化学療法剤若しくは薬物、増殖阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素、又はそれらの断片）又は放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）などの1つ以上の細胞傷害性剤にコンジュゲートされた、本明細書に開示される抗体を含むイムノコンジュゲートが提供される。

【0332】

【0210】 イムノコンジュゲートは、腫瘍又は他の疾患細胞若しくは組織への薬物部分の標的送達を可能にし、いくつかの実施態様では、非コンジュゲート薬物の全身投与が正常細胞への許容できないレベルの毒性をもたらす可能性がある場合に、その細胞内蓄積を可能にする（Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387）。

40

【0333】

【0211】 抗体薬物コンジュゲート（ADC）は、強力な細胞傷害性薬物を抗原発現腫瘍細胞に標的化することにより、抗体と細胞傷害性薬物の両方の特性を組み合わせた標的化化学療法分子であり（Teicher, B. A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004）、それにより有効性を

50

最大化し、オフターゲット毒性を最小化することで治療指数を高めている (Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer Jour. 14 (3) : 154-169 ; Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41 : 98-107.

【0334】

【0212】 ADC化合物には、抗がん活性及び／又は抗炎症活性を有するものが含まれる。いくつかの実施態様では、ADC化合物には、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち、共有結合された抗体が含まれる。いくつかの実施態様では、該抗体は、リンカーによって薬物部分に共有結合される。抗体-薬物コンジュゲート (ADC) は、有効量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達することができ、それによって、治療指数 (「治療濃度域」) を増加させながら、より高い選択性、すなわちより低い効果的用量が達成され得る。

10

【0335】

【0213】 抗体薬物コンジュゲート (ADC) の薬物部分 (D) は、細胞傷害性効果又は細胞増殖抑制効果を有する任意の化合物、部分又は基を含み得る。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合又はインターカレーション、並びにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成、及び／又はトポイソメラーゼの阻害を含むが、これらに限定されない機序によって、それらの細胞傷害性効果及び細胞増殖抑制効果を付与し得る。例示的な薬物部分には、マイタンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD)、ネモルピシン及びその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、並びに細胞傷害活性を有するそれらの立体異性体、イソスター (isosteres)、類似体、及び誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0336】

【0214】 ADCの薬物部分 (D) は、抗炎症作用を有する任意の化合物、部分又は基を含み得る。例示的な薬物部分としては、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)、例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、インドメタシン、ケトロラク、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、オキサプロジン、ピロキシカム、スリンダク、及びトルメチンなど；cox-2阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、及びバルデコキシブなど；並びに抗炎症活性を有するそれらの立体異性体、イソスター (isosteres)、類似体、及び誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0337】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

【0215】 いくつかの実施態様では、本明細書に記載の方法は、試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定するのに有用である。いくつかの実施態様では、試料はポリユビキチン化タンパク質を含む疑いがある。いくつかの実施態様では、ポリユビキチン化タンパク質は炎症促進性タンパク質である。

【0338】

40

【0216】 本明細書に記載される方法は、試料を、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び炎症促進性タンパク質に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む少なくとも1つの多重特異性抗体に曝露することを含む。いくつかの実施態様では、方法は、試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する少なくとも1つの抗体の結合を測定することを含む。

【0339】

【0217】 いくつかの実施態様では、ポリユビキチン化タンパク質は、M1結合型ポリユビキチン及び／又はK63結合型ポリユビキチンを含む。

【0340】

【0218】 いくつかの実施態様では、本明細書に記載される方法は、ポリユビキチ

50

ン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、ポリユビキチンを含み、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び炎症促進性タンパク質に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む少なくとも1つの多特異性抗体に該試料を曝露することと、該試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する少なくとも1つの抗体の結合を決定することを含む、方法のために有用である。

【0341】

【0219】 いくつかの実施態様では、本明細書に記載される方法は、ポリユビキチン化タンパク質を含む疑いのある試料中のポリユビキチン化タンパク質の存在を決定する方法であって、該ポリユビキチン化タンパク質が炎症促進性タンパク質であり、M1結合型ポリユビキチン及び／又はK63結合型ポリユビキチンを含み、ポリユビキチンに結合する第1の抗原結合部位を含む第1の半抗体；及び炎症促進性タンパク質に結合する第2の抗原結合部位を含む第2の半抗体を含む少なくとも1つの多特異性抗体に該試料を曝露することと、該試料中のポリユビキチン化タンパク質に対する少なくとも1つの抗体の結合を決定することを含む、方法のために有用である。

10

【0342】

【0220】 炎症促進性タンパク質は、炎症性細胞死及び／又は炎症促進性サイトカイン、ケモカイン及び損傷関連分子パターン（DAMP）の放出を媒介することによって炎症を促進する、1つ以上のシグナル伝達複合体の構成要素である。いくつかの実施態様では、炎症促進性タンパク質は、受容体相互作用プロテインキナーゼ1（RIP1）、受容体相互作用プロテインキナーゼ2（RIP2）、アポトーシスの細胞阻害剤1及び2（c-IAP1／2）、腫瘍壊死因子受容体1（TNFR1）、直鎖状ユビキチン鎖集合複合体（LUBAC）、及び／又は核因子カッパB（NF-κB）必須モジュレーター（NEMO）である。

20

【0343】

【0221】 いくつかの実施態様では、炎症促進性タンパク質はRIP1又はRIP2である。

【0344】

【0222】 いくつかの実施態様では、炎症促進性タンパク質は、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において上昇したユビキチン化レベルを有する。

30

【0345】

【0223】 いくつかの実施態様では、炎症促進性タンパク質は、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態において、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、1倍～12倍、2倍～12倍、3倍～12倍、4倍～12倍、5倍～12倍、6倍～12倍、7倍～12倍、8倍～12倍、9倍～12倍、10倍～12倍、又は11倍～12倍のユビキチン化レベルを有する。

【0346】

【0224】 いくつかの実施態様では、ユビキチン化のレベルの上昇は、炎症性疾患状態の重症度の増加と相関する。

40

【0347】

【0225】 いくつかの実施態様では、炎症状態にないときのユビキチン化レベルと比較して、炎症状態におけるユビキチン化レベルの上昇。

【0348】

【0226】 いくつかの実施態様では、炎症促進性タンパク質は、炎症性腸疾患、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に関連している。

【0349】

【0227】 いくつかの実施態様では、本明細書で提供される抗体は、生物学的試料

50

中の R I P 1 の存在を検出するために有用である。特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、生物学的試料中の R I P 2 の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される場合、「検出する」という用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。「生物学的試料」は、例えば、細胞又は組織（例えば、がん性又は潜在的にがん性の結腸、結腸直腸、小腸、子宮内膜、膵臓、乳房、肺、前立腺、又は卵巢組織を含む生検材料）を含む。

【0350】

【0228】 いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体は、診断又は検出の方法における使用のためのものである。さらなる態様では、生物学的試料中の R I P 1 の存在を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、本方法は、R I P 1 への抗体の結合が許容される条件下で、生物学的試料を本明細書に記載の抗体と接触させることと、生物学的試料中で抗体と R I P 1 との間に複合体が形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、*in vitro* 又は *in vivo* の方法であり得る。一実施態様では、抗体は、例えば、R I P 1 が患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗 R I P 1 抗体による治療に適格な対象を選択するために使用される。いくつかの実施態様では、生物学的試料は細胞又は組織（例えば、がん性組織又は潜在的にがん性組織を含む生検材料）である。

10

【0351】

【0229】 いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体は、診断又は検出の方法における使用のためのものである。さらなる態様では、生物学的試料中の R I P 2 の存在を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、本方法は、R I P 2 への抗体の結合が許容される条件下で、生物学的試料を本明細書に記載の抗体と接触させることと、生物学的試料中で抗体と R I P 2 との間に複合体が形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、*in vitro* 又は *in vivo* の方法であり得る。一実施態様では、抗体は、例えば、R I P 2 が患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗 R I P 2 抗体による治療に適格な対象を選択するために使用される。いくつかの実施態様では、生物学的試料は細胞又は組織（例えば、がん性組織又は潜在的にがん性組織を含む生検材料）である。

20

【0352】

【0230】 いくつかの実施態様では、生物学的試料中のポリユビキチン化 R I P 1 タンパク質又はポリユビキチン化 R I P 2 タンパク質を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、本方法は、ポリユビキチン化 R I P 1 タンパク質又はポリユビキチン化 R I P 2 タンパク質への抗体の結合が許容される条件下で、生物学的試料を本明細書に記載の抗体と接触させることと、生物学的試料中で抗体と R I P 1 タンパク質又は R I P 2 タンパク質との間に複合体が形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、*in vitro* 又は *in vivo* の方法であり得る。一実施態様では、抗体は、例えば、ポリユビキチン化 R I P 1 タンパク質又はポリユビキチン化 R I P 2 タンパク質が患者を選択するためのバイオマーカーである場合、本明細書に開示される抗体による治療に適格な対象を選択するために使用される。いくつかの実施態様では、生物学的試料は細胞又は組織（例えば、がん性組織又は潜在的にがん性組織を含む生検材料）である。

30

40

【0353】

【0231】 さらなる実施態様では、本明細書に開示される抗体は、例えば、疾患の診断、予後診断、又は病期分類、適切な治療コースの決定、又は治療に対する反応をモニタリングする目的で、ポリユビキチン化 R I P 1 タンパク質又はポリユビキチン化 R I P 2 タンパク質を検出するために、例えば、*in vivo* イメージングによって *in vivo* で使用される。*in vivo* 検出のための当技術分野で公知の1つの方法は、例えば、*van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007)* 及び *Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003)* に記載されている免疫陽電子放出断層撮影法（免

50

疫PET)である。このような実施態様では、対象においてポリユビキチン化RIP1タンパク質又はポリユビキチン化RIP2タンパク質を検出するための方法が提供され、この方法は、標識化抗体を対象に投与すること、及び対象において標識抗RIP1抗体又は標識抗RIP2抗体を検出することを含む。特定のそのような実施態様では、標識化抗体は、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、及び ^{124}I などの陽電子放出体を含む(例えば、陽電子放出体にコンジュゲートしている)。特定の実施態様では、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。 ^{89}Zr 標識化抗体を作製し、使用する非限定的な例示的方法は、例えばPCT公開番号国際公開第2011/056983号に記載されている。いくつかの実施態様では、標識化抗体は、1つ以上のジルコニウム錯体にコンジュゲートしたシステイン操作抗体である。例えば、国際公開第2011/056983号を参照されたい。

10

【0354】

【0232】さらなる実施態様では、診断又は検出の方法は、基質に固定化された本明細書に開示される第1の抗体を、ポリユビキチン化RIP1タンパク質又はポリユビキチン化RIP2タンパク質の存在について試験される生物学的試料と接触させることと、ポリユビキチン化RIP1タンパク質又はポリユビキチン化RIP2タンパク質に結合する第2の抗体に基質を曝露することと、第2の抗体が第1の抗体と生物学的試料中のポリユビキチン化RIP1タンパク質又はポリユビキチン化RIP2タンパク質との複合体に結合しているかどうかを検出することと(サンドイッチアッセイと呼ばれることもある)を含む。基質は、任意の支持培地、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、及び他の基質であってもよい。特定の実施態様では、「生物学的試料」は、例えば、細胞又は組織(例えば、がん性又は潜在的にがん性の結腸、結腸直腸、小腸、子宮内膜、膵臓又は卵巣組織を含む生検材料)を含む。特定の実施態様では、第1の抗体又は第2の抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかである。

20

【0355】

【0233】特定の実施態様では、本明細書に開示される抗体は標識される。標識には、直接検出される標識又は部分(例えば、蛍光標識、発色団標識、電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識)、並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、放射性同位体 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、及び ^{131}I 、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4737456号)などのルシフェラーゼ類、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン類、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの糖オキシダーゼ、過酸化水素を使用して、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を利用する酵素と結合した、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカルなどが含まれるが、これらに限定されない。別の実施態様では、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体としては、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、及び ^{124}I が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施態様では、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

30

40

【0356】

【0234】試料中のポリユビキチン化RIP1タンパク質又はポリユビキチン化RIP2タンパク質の存在は、本明細書に開示される抗体を使用する多くの方法論によって分析することができ、その多くは当技術分野で知られており、当業者には理解されており、限定されないが、免疫組織化学(「IHC」)、ウェスタンブロット分析、免疫沈降法、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光活性化セルソーティング(「FAC

50

S」)、定量的血液ベースアッセイ(例えば血清ELISA)が挙げられる。タンパク質の状態を評価するための典型的なプロトコルは、例えば、Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unit 15 (Immunoblotting)にある。Rules Based Medicine又はMeso Scale Discovery(「MSD」)から入手可能なアッセイ等の多重化免疫アッセイも使用され得る。

【0357】

【0235】 いくつかの実施態様では、単一特異性抗体、組み立てられていない半抗体、又は単一特異性抗体と組み立てられていない半抗体の両方を実質的に含まない組成物が提供される。単一特異性抗体は、複数のタイプの抗原認識部位を含まない抗体、例えば、6つのCDRのセットを1つだけ有する抗体、又は6つのCDRの各セットが同一である抗体である。CDRの第1のセットが、例えば少数のアミノ酸残基に関して他のCDRのセットとほんのわずかしが異なっておらず、その差異が異なる抗原への優先的な結合をもたらさない抗体も、単一特異性であるとみなされる。組み立てられていない半抗体は、別の半抗体と(共有結合的又は非共有結合的に)安定して会合しておらず、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析法、又は電気泳動などの適切な技術によって分析すると、単一の重鎖/軽鎖ユニットとして現れる。

【0358】

F. 薬学的製剤

【0236】 本明細書に記載の抗体又はイムノコンジュゲートの薬学的製剤は、所望の純度を有するそのような抗体又はイムノコンジュゲートを、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と混合することによって、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は一般的に、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等のバッファー、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化物質、防腐剤(塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール等)、低分子量(約10残基未満)のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン、金属複合体(例えば、Zn-タンパク質複合体)、並びに/又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含むが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体としては、介在性薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)がさらに挙げられる。特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、rHuPH20を含め、米国特許公開第2005/0260186号及び第2006/0104968号に記載される。いくつかの態様では、sHASEGPを、1つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーゼ(例えば、コンドロイチナーゼ)と組み合わせる。

【0359】

【0237】 例示的な凍結乾燥抗体又はイムノコンジュゲート製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤又はイムノコンジュゲート製剤は、米国特許第6,171,586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものを含み、後者の製剤はヒスチジン-アセテートバッファーを含む。

【0360】

【0238】 本明細書の製剤はまた、治療される特定の適応症に必要な1つより多い活性成分を含んでもよく、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含んでもよい。

【0361】

【0239】 有効成分は、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入され得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., (1980)に開示されている。

【0362】

【0240】 徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性調製物の適切な例は、抗体又はイムノコンジュゲートを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは、成形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。

【0363】

【0241】 *in vivo*投与に使用される製剤は、一般に無菌である。滅菌は、例えば滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成され得る。

【0364】

G. 治療方法及び組成物

【0242】 本明細書に提供される抗体又はイムノコンジュゲートのいずれも、方法、例えば、治療方法において使用され得る。

【0365】

【0243】 いくつかの態様では、医薬としての使用のための本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。さらなる態様では、治療方法における使用のための本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。特定の実施態様では、細胞周期関連疾患又は障害の治療における使用のための本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。

【0366】

【0244】 いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートは、細胞周期進行の異常な増加に関連する疾患又は障害の治療における使用のためのものであり、細胞周期進行の異常な減少に関連する疾患又は障害が提供される。いくつかの実施態様では、細胞周期進行の異常な増加に関連する疾患又は障害は、結腸直腸がんなどのがんである。

【0367】

【0245】 いくつかの実施態様では、本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートは、炎症性腸疾患などの炎症性疾患の治療における使用のためのものである。いくつかの実施態様では、炎症性疾患は、クローン病、憩室炎、及び潰瘍性大腸炎から選択される。

【0368】

【0246】 いくつかの態様では、医薬の製造又は調製における、本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートの使用が提供される。

【0369】

【0247】 上記の実施態様のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0370】

【0248】 いくつかの態様では、例えば上記の治療方法のいずれかにおける使用のための、本明細書に提供される抗体又はイムノコンジュゲートのいずれかを含む薬学的製剤が提供される。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗体又はイムノコンジュゲートのいずれか、及び薬学的に許容される担体を含む。

【0371】

【0249】 本明細書で提供される抗体又はイムノコンジュゲートは、治療において、単独で又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本明細書で提供される抗体又はイムノコンジュゲートは、少なくとも1つの追加の治療剤と共投与され得る。

【0372】

【0250】 上述のかかる併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が同じ又は別個の製剤中に含まれる）、及び個別投与を包含するが、この場合、本明細書で提供される抗体又はイムノコンジュゲートの投与は、追加の治療剤及び／又はアジュバントの投与の前に、それと同時に、且つ／又はその後に行われ得る。

【0373】

【0251】 抗体又はイムノコンジュゲート（及び任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内、及び鼻腔内投与、並びに局所治療に所望される場合、病巣内投与を含む、任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期か又は長期かに部分的に依存して、任意の適切な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射により行うことができる。本明細書では、単回投与又は様々な時点にわたる複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投薬スケジュールが企図される。

【0374】

【0252】 抗体又はイムノコンジュゲートは、良好な医療行為と一貫する様式で、製剤化され、投薬され、且つ投与されるだろう。これに関連して考慮すべき要因としては、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に既知である他の要因が挙げられる。抗体又はイムノコンジュゲートは、必然的にではなく任意選択で、問題の障害を予防又は治療するために現在使用される1つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体又はイムノコンジュゲートの量、障害又は治療の種類、及び上記で論じた他の要因によって決定される。これらは、一般に、ここに記載されている投与量と同じ投与量で、又はここに記載されている投与量の約1～99%、又は経験的／臨床的に適切であると判断される任意の投与量で、及び任意の投与経路で使用される。

【0375】

【0253】 疾患の予防又は治療について、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートの適切な投薬量は（単独で、又は1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）、治療される疾患の種類、抗体又はイムノコンジュゲートの種類、疾患の重症度及び経過、抗体又はイムノコンジュゲートが予防目的又は治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴及び抗体又はイムノコンジュゲートへの応答、並びに主治医の裁量に依存するだろう。抗体又はイムノコンジュゲートは、患者に、1回で、又は一連の治療にわたって、好適に投与される。

【0376】

【0254】 上記製剤又は治療方法のうちのいずれも、イムノコンジュゲート及び抗体の両方を使用して行われ得ることが理解される。

【0377】

H. 製造品

【0255】 別の態様では、上述した障害の治療、予防及び／又は診断に有用な物質を含有する製造品が提供される。製造品は、容器と、容器に貼られているか又は付随しているラベル又は添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、静注溶液袋などが挙げられる。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、障害を治療、予防、及び／又は診断するのに有効な別の組成物と単独で又は組み合わせて使用される組成物を保持し、無菌アクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを

10

20

30

40

50

有するバイアルであってもよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書に開示される抗体又はイムノコンジュゲートである。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択される症状を治療するために使用されることを示す。さらに、製造品は、(a)抗体又はイムノコンジュゲートを含む組成物が入った第1の容器；及び(b)細胞障害性剤又は他の治療剤をさらに含む組成物が入った第2の容器を含み得る。この実施態様における製造品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを示す添付文書をさらに含み得る。あるいは、又はさらに、製造品は、注入用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、又はデキストロース溶液などの薬学的に許容されるバッファーを含む第2の(又は第3の)容器をさらに含んでもよい。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含むことができる。

10

【実施例】

【0378】

III. 実施例

【0256】 以下は、本明細書で提供される方法及び組成物の実施例である。上に提供された一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

【0379】

A. 分析方法

【0257】 サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱。例として、50 µgの抗体を、Agilent 1260 Infinity HPLCを使用し、移動相として20 mMヒスチジンアセテート、300 mM NaCl、pH 5.5を用い、3.5 µm、7.8 mm x 300 mm XBridge Protein BEH analytical SEC 200 Åカラム(Waters)に1 mL/minで注入する。分析用SECカラムから溶出したタンパク質をWyatt DAWN HELEOS II/Optilab T-rEX多角度光散乱検出器に直接注入して、モル質量及び多分散性を測定する。

20

【0380】

【0258】 質量分析。質量分析による分析の前に、30 µgの抗体を2単位のPN GaseF (NEB)を用いて37 °Cで一晩脱グリコシル化する。次いで、Agilent 1290 Infinity UHPLCを使用して、2 µgの抗体を3 µm、4.6 x 50 mm逆相クロマトグラフィー PLRP-Sカラム(Agilent)に1 mL/分で注入する。0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液(バッファーA)及び0.05%TFAアセトニトリル溶液(バッファーB)を使用して、3分間にわたる0-100%のバッファーB勾配を行い、その後100%バッファーBで1分間洗浄する。逆相カラムから溶出したタンパク質を、インタクト質量測定のためにAgilent 6230 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計(ESI-TOF)に直接注入する。

30

【0381】

B. 抗体のクローニング、発現、及びアニーリング

【0259】 二重特異性抗体は、ノブ・イントゥー・ホールヘテロ二量体化アプローチを使用して生成された。このアプローチの一般的な説明については、Merchant, A. M. et al. An efficient route to human bispecific IgG. Nat Biotechnol 16, 677-681, doi:10.1038/nbt0798-677 (1998)を参照。

40

【0382】

【0260】 二重特異性抗体は、以下の抗体をビルディングブロックとして使用して設計された：抗M1又は直鎖状ポリユビキチン結合特異的合成ヒト抗体(クローン1F11/3F5/Y102L)(Matsumoto et al., J Mol Biol. 418 (3-4), 134-44. doi:10.1016/j.jmb.2011.12.053. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22227388 (20

50

12))), 抗K63ポリユビキチン結合特異的合成ヒト抗体 (クローンApu3, A8) (Newton et al., Cell. 134 (4), 668-78, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.039, PMID: 18724939 (2008)), マウス抗RIP1抗体 (BD Biosciences #610459), マウス抗RIP2抗体 (Abcam #ab75257)。対照として、無関係なタンパク質を認識する抗gD抗体を使用した。

【0383】

【0261】 T366W (ノブ) 又はT366S、L368A、及びY407V (ホール) 変異がCH3ドメインに導入された。ノブ変異及びホール変異は、抗体のそれぞれの重鎖の優先的なヘテロ二量体化を可能にするために選択された。

10

【0384】

【0262】 簡単に言うと、重鎖可変ドメインをコードする配列は、配列番号50 (抗M1ポリユビキチン結合特異性について)、配列番号36 (抗K63ポリユビキチン結合特異性について)、配列番号73 (抗RIP1について)、配列番号94 (抗RIP2について) 及び非特異的抗gD対照抗体の配列である。これらの可変ドメインを、CH3ドメインにノブ (T366W) 変異又はホール (T366S、L368A、Y407V) 変異を有するヒトIgG1重鎖定数ドメインを含む改変pRKベクター (Genentech) にサブクロニングした。

【0385】

【0263】 可変領域の長さによって、ノブ変異とホール変異の実際の位置は、わずかに、例えば1~10の位置だけ変化することがある。例えば、配列番号4及び6では、それぞれ、TからWへの置換及びTからSへの置換が、366番目のアミノ酸残基ではなく369番目のアミノ酸残基に反映されている。重鎖の366、368、及び407などの位置におけるノブ及びホール変異への言及は、可変領域の長さを考慮して、適切であれば調整して解釈されるべきであることが理解される。

20

【0386】

【0264】 軽鎖可変ドメインも同様に、ヒトκ軽鎖定常ドメインを含む改変pRKベクター (Genentech) にサブクロニングした。pRKベクターは、哺乳動物細胞における細胞外発現のための構造的な強いシグナルペプチドを保持している。抗M1抗体は、抗K63抗体 (それぞれ配列番号32及び34の重鎖をコードする) と同様に、ノブ変異体及びホール変異体 (それぞれ配列番号46及び48の重鎖をコードする) の両方としてクロニングされた。抗RIP1抗体及び抗RIP2抗体はホール変異体 (それぞれ配列番号70及び92をコードする) としてクロニングされ、抗gD抗体はノブ変異体としてクロニングされた。

30

【0387】

【0265】 配列表はまた、抗K11重鎖のノブ変異体及びホール変異体 (それぞれ配列番号4及び6); 抗K48重鎖のノブ変異体及びホール変異体 (それぞれ、配列番号18及び20); 並びに抗RIP1重鎖のノブ変異体 (配列番号68) 及び抗RIP2重鎖のノブ変異体 (配列番号90) を提供する。

【0388】

【0266】 同族の軽鎖と重鎖のペアリングを維持するために、ノブ又はホール重鎖変異体のいずれかとそれぞれの軽鎖を別々にCHO細胞で発現させ、それらを個別にアフィニティー精製した (データは示さず)。所定のノブ半抗体又はホール半抗体の軽鎖プラスミド及び重鎖プラスミドを、以前に記載されたようにPEIを使用してCHO細胞に一過性に同時トランスフェクトした (Wong, A. W., Baginski, T. K. & Reilly, D. E. Enhancement of DNA uptake in FUT8-deleted CHO cells for transient production of afucosylated antibodies. Biotechnol Bioeng 106, 751-763, doi: 10.1002/bit.22749 (2010) を参照)。半抗体をMabSelect SuRe樹脂 (GE

40

50

Healthcare)で精製し、50mMクエン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH3.0で溶出した後、10% (v/v)の200mMアルギニン、137mMスクシネート、pH9.0でpHを5.0に調整した。

【0389】

【0267】 アフィニティー精製されたノブ及びホール半抗体は、以前に記載されたノブ抗体及びホール抗体と一致して特徴づけられた(図示せず)。例えば、Shatz, W. et al. MAbs 5, 872-881, doi:10.4161/mabs.26307 (2013)を参照。それらの同一性は質量分析によって確認された。

【0390】

【0268】 二重特異性抗体は、アニーリング、還元、及び酸化を使用して *in vitro*で半抗体から組み立てられた。抗RIP1/抗M1二重特異性抗体は、アフィニティー精製された抗M1ノブ抗体と抗RIP1ホール抗体から、以前に記載されたアニーリング、還元、及び酸化の方法の修正バージョンを使用して、*in vitro*で組み立てられた(Shatz, W. et al. MAbs 5, 872-881, doi:10.4161/mabs.26307 (2013))。同様に、抗RIP1/抗K63二重特異性抗体は抗K63ノブ抗体と抗RIP1ホール抗体から組み立てられ；抗RIP2/抗M1二重特異性抗体は抗M1ノブ抗体と抗RIP2ホール抗体から組み立てられ；抗RIP2/抗K63二重特異性抗体は抗K63ノブ抗体と抗RIP2ホール抗体から組み立てられた。簡単に説明すると、所望のノブ半抗体とホール半抗体を1:1の質量比で混合し、混合物のpHを15% (v/v)の800mMアルギニン、pH10.0で約8に調整した。800mMアルギニン、pH10.0中の200倍モル過剰の還元型グルタチオン(Sigma Aldrich)を加え、組み立て反応物を空気に曝露しながら室温で72時間インキュベートして、ノブ半抗体とホール半抗体をアニーリングしてヒンジのジスルフィドを形成させた。抗M1/抗K63抗体、抗RIP1/gD抗体、抗RIP2/gD抗体、抗M1/gD抗体、抗K63/gD対照二重特異性抗体も同様に組み立てた。

【0391】

C. 抗体の精製及び特徴づけ

【0269】 *In vitro*で組み立てられた二重特異性抗体は、以前に記載された方法の修正バージョンを使用する疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)によって精製された。Yau et al., Cell. 171(4):918-933. e20, doi:10.1016/j.cell.2017.09.040. Epub 2017 Oct 12. PMID:29033132; PMCID:PMC5669814 (2017)を参照。簡単に説明すると、3.8M硫酸アンモニウムを少なくとも1Mの最終濃度まで組み立て反応物に添加し、反応物を0.22µmのフィルターで濾過し、5µm、7.8×75mmのProPac HIC-10カラム(Dionex)にロードした。その後、カラムをバッファーA(20mM酢酸ナトリウム、pH5.0)で洗浄し、40カラム容積(CV)の0-100%バッファーB(25mMリン酸ナトリウム、pH6.5、25%イソプロパノール)直線勾配を行い、二重特異性抗体を未反応の半抗体又は凝集タンパク質から分離した。溶出ピークの同一性をSDS-PAGE及び質量分析によってモニターし(方法の詳細については下記を参照)、二重特異性ピークに対応する画分をプールした。

【0392】

【0270】 二重特異性抗体は、陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)によってさらに精製された。簡単に説明すると、HICプールされた物質を20mM酢酸ナトリウム(pH5.0)に透析するか、1/6容量の1M酢酸ナトリウム(pH5.0)を加えてpHを約5まで下げ、次いで水で希釈して最終濃度を13mM酢酸ナトリウムとした。その後、抗体を10µmのMono S 5/50 GLカラム(GE Healthcare)にロードし、バッファーA(20mM酢酸ナトリウム、pH5.0)で洗浄した。40CVにわたる0-100%バッファーB(20mM酢酸ナトリウム、pH5.0、1M NaCl)の直線勾配を行い、所望の画分をプールした。精製された二重特異性

抗体は、20 mMヒスチジンアセテート、240 mMスクロース、0.02% TWEEN（登録商標）-20、又は20 mMヒスチジンアセテート、150 mM NaCl、pH 5.5のいずれかで調製された。

【0393】

【0271】 LC-MSを使用して、精製されアニールされた種の同一性を確認した。不均一性を減らすため、抗体は分析前にPNGase Fで脱グリコシル化した。

【0394】

D. RIP1-K63ユビキチン鎖二重特異性抗体はタンパク質の修飾を認識する

【0272】 ヒト結腸癌HT29細胞を、Almagro et al., Cell Death and Differentiation, 24:26-37 (2017) にも一般的に記載されているように、TNF (20 ng/ml)、IAPアンタゴニスト BV6 (2 μM)、及びパンカスペーゼ阻害剤 zVAD (20 μM) (総称してTBZ) の組み合わせで2時間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図2Aに示すように、全細胞溶解物(TCL)及び免疫沈降タンパク質(IP)を、示された抗体でプローブした。

【0395】

【0273】 線維肉腫HT1080細胞を、PBS又はTNF (100 ng/ml) で7分間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図2Bに示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

【0396】

【0274】 A549細胞をPBS又はTNF (500 ng/ml) で7分間処理した。細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温(RT)で30分間固定し、Tritonを含まない6 M尿素バッファー中でインキュベートし(30分間、RT)、0.25% Tritonで透過処理し(10分間、RT)、次いで、示されたRIP1-ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して染色し、続いて抗ヒトIgG-Alexa 488二次抗体を使用して染色した。核染色にはHoechst 33258を使用した。マウントしたスライドをLeica SP8共焦点顕微鏡で分析した。全ての画像は同じ設定を使用して一様に収集された。これらの結果を図2Cに示す。

【0397】

【0275】 HT1080細胞をPBS又はTNF (500 ng/ml) で7分間処理した。細胞を固定し、6 M尿素バッファー中でインキュベートし(30分、RT)、透過処理し、次いで、示されたRIP1-ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して染色し、続いて抗ヒトIgG-Alexa 488二次抗体を使用して染色した。核染色にはHoechst 33258を使用した。全ての画像は同じ設定を使用して一様に収集された[スケールバー25 μm]。これらの結果を図2Dに示す。

【0398】

【0276】 EVSA T細胞を、PBS又はTNF (100 ng/ml) で7分間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。これらの結果を図3Aに示す。

【0399】

【0277】 Ku812F細胞をPBS又は抗Flag ABで架橋したFlag-TL1A (10 μg) で10分間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。これらの結果を図3Bに示す。

【0400】

【0278】 これは、RIP1-K63ユビキチン鎖二重特異性抗体が、K63鎖ユ

ビキチン化 R I P 1 (図 2 A - 2 D) 及び K 6 3 結合型ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 (図 3 A - 3 B) を認識することを示している。

【0401】

【0279】 これは図 1 A ~ D にも示されている。R I P 1 - K 6 3 二重特異性抗体の特異性は、K 6 3 - 又は K 4 8 - テトラユビキチン分子を使用して R I P 1 を修飾する、*in vitro* ユビキチン化 R I P 1 で検証された。ユビキチン化後、R I P 1 を 6 M 尿素存在下、示された二重特異性抗体とインキュベートして非共有結合を破壊し、沈殿させてウエスタンブロット法で調べた。R I P 1 - K 6 3 二重特異性抗体は、K 6 3 - ユビキチン鎖修飾 R I P 1 を免疫沈降させたが、K 4 8 - ユビキチン鎖修飾 R I P 1 は免疫沈降させなかった。

10

【0402】

E. R I P 1 - L i n ユビキチン鎖二重特異性抗体はタンパク質の修飾を認識する

【0280】 実施例 D に記載されているように、H T 2 9 細胞を P B S 又は T N F (2 0 n g / m l) 、 B V 6 (2 μ M) 及び z V A D (2 0 μ M) で 2 時間処理した。細胞を 6 M 尿素バッファー中で溶解し、示された R I P 1 - ユビキチン、K 6 3 - 直鎖状ユビキチン鎖、又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図 4 A に示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

【0403】

【0281】 K u 8 1 2 F 細胞を P B S 又は T N F (1 0 0 n g / m l) で 1 0 分間処理した。細胞を 6 M 尿素バッファー中で溶解し、示された R I P 1 - ユビキチン鎖、K 6 3 - 直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図 4 B に示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

20

【0404】

【0282】 H T 2 9 細胞を、P B S 又は T N F (1 0 0 n g / m l) 、 B V 6 (2 μ M) 及び z V A D (2 0 μ M) で 2 , 5 時間処理した。細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで室温 (R T) で 3 0 分間固定し、T r i t o n を含まない 6 M 尿素バッファー中でインキュベートし (3 0 分間、R T) 、0 . 2 5 % T r i t o n で透過処理し (1 0 分間、R T) 、次いで、示された R I P 1 - ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して染色し、続いて抗ヒト I g G - A l e x a 4 8 8 二次抗体を使用して染色した。核染色には H o e c h s t 3 3 2 5 8 を使用した。マウントしたスライドを L e i c a S P E 共焦点顕微鏡で分析した。全ての画像は同じ設定を使用して一様に収集された。これらの結果を図 4 C に示す。

30

【0405】

【0283】 マウス胎児線維芽細胞 (M E F) 細胞を P B S 又は T B Z (T N F (1 0 0 n g / m l) 、 B V 6 (1 μ M) 及び z V A D (2 0 μ M)) で 2 . 5 時間処理した。細胞を固定し、6 M 尿素バッファー中でインキュベートし (3 0 分、R T) 、透過処理し、次いで、示された R I P 1 - ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して染色し、続いて C y 3 に結合した抗ヒトヤギ F (a b ') 2 断片抗体を使用して染色した。核染色には H o e c h s t 3 3 2 5 8 を使用した。全ての画像は同じ設定を使用して一様に収集された [スケールバー 2 5 μ m] 。これらの結果を図 4 D に示す。

40

【0406】

【0284】 これらの結果は、R I P 1 - L i n ユビキチン鎖二重特異性抗体が直鎖状鎖ユビキチン化 R I P 1 を認識することを示している。一方、R I P 1 - g D 抗体及び g D - L i n 抗体、又は刺激なしの K 6 3 - L i n 抗体は、ユビキチン化 R I P 1 を免疫沈降させなかった。

【0407】

【0285】 これは図 1 B にも示されており、6 M 尿素バッファー中で、テトラ - K 4 8 又は直鎖状テトラユビキチン分子による R I P 1 の *in vitro* ユビキチン化、続いて免疫沈降により、K 4 8 結合型ユビキチン鎖ではなく、直鎖状ユビキチン鎖で修飾された R I P 1 を選択的に免疫沈降させる R I P 1 - L i n 二重特異性抗体の能力を実証

50

した。

【0408】

F. RIP1-Lin及びK63-Linユビキチン鎖二重特異性抗体は修飾RIP1を認識する

【0286】 HT29細胞をPBS又はTNF (50 ng/ml) で7分間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖、K63-直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図5 Aに示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

【0409】

【0287】 D645細胞をPBS又はTNF (100 ng/ml) で7分間処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖、K63-直鎖状ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図5 Bに示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

【0410】

【0288】 THP1細胞を、PBS、TNF (100 ng/ml、5分間) 又はMDP (1 µg/ml、30分間) で処理した。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖、K63-直鎖状ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して免疫沈降させた。図5 Cに示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。

【0411】

【0289】 したがって、RIP1-K63及びRIP1-Lin二重特異性抗体は、それぞれK63-結合型及びK63-Linユビキチン結合型鎖で修飾されたRIP1を選択的に認識するが、RIP2又はTRAF2は認識しない。

【0412】

【0290】 K63-Lin二重特異性抗体は、修飾RIP1及び修飾RIP2も認識するが、この抗体にはRIP1特異的成分及びRIP2特異的成分は存在しない。

【0413】

G. RIP1-ユビキチン鎖二重特異性抗体は、in vivoでRIP1ユビキチン化を認識する

【0291】 マウスを、PBS (マウスM1及びM2) 又はTNF (500 µg/ml) で、12分間 (マウスM3及びM4) 又は24分間 (マウスM5及びM6) 処理した。示されたマウスからの小腸を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。免疫沈降タンパク質 (図6 A) 及び全細胞溶解物タンパク質 (図6 B) を、示された抗体でプローブした。これは、RIP1-ユビキチン鎖二重特異性抗体が、K63結合型及び直鎖状ユビキチン鎖で in vivoでユビキチン化されたRIP1を認識することを示している。

【0414】

【0292】 骨髄由来マクロファージ (BMDM) を、野生型RIP1を有するマウス又はRIP1 K376Rノックインマウスから単離し、TNFで5分間処理し、6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP1-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。全細胞溶解物タンパク質 (図6 C) 及び免疫沈降タンパク質 (図6 D) の検出は、示された抗体を使用して行われた。このことは、RIP1 K376Rノックインマウス由来のBMDMにおけるRIP1のK63結合型及び直鎖状ユビキチン化が、RIP1-ユビキチン鎖二重特異性抗体を使用して検出できることを示している。

【0415】

H. RIP2-ユビキチン鎖二重特異性抗体は修飾されたRIP2を認識する

【0293】 THP1細胞を、PBS又はNOD2シグナル伝達活性化因子MDPで処理した (1 µg/ml、30分間)。細胞を6 M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP2-ユビキチン鎖又は対照二重特異性抗体を使用して免疫沈降させた。図7 Aに示す

ように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。この結果、RIP2とK63の両アームが二重特異性（RIP2-K63）に存在する場合にのみ、刺激依存的な様式でRIP2のK63結合ユビキチン化が検出されたが、関連するアームの一方のみを含む対照二重特異性（RIP2-gD又はK63-gD）では検出されなかった。

【0416】

【0294】 THP1細胞を、PBS又はMDPで処理した（1 µg/ml、30分間）。細胞を6M尿素バッファー中で溶解し、示されたRIP2-ユビキチン鎖、K63-直鎖状ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して免疫沈降させた。図7Bに示すように、全細胞溶解物及び免疫沈降タンパク質を、示された抗体でプローブした。RIP2-gD抗体又はgD-Lin抗体ではなく、RIP2-Lin抗体は、直鎖状ユビキチンによって修飾されたRIP2を首尾よく免疫沈降できるが、XIAP又はc-IAP1は免疫沈降できない。K63-Lin二重特異性抗体は、混合及び／又は分岐したK63結合型及び直鎖状ユビキチン鎖で修飾されたRIP2、及びある程度のXIAPを効率よく捕捉する。

【0417】

【0295】 THP1細胞を、PBS又はMDPで処理した（1 µg/ml、30分間）。細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温（RT）で30分間固定し、Tritonを含まない6M尿素バッファー中でインキュベートし（30分間、RT）、0.25% Tritonで透過処理し（10分間、RT）、次いで、示されたRIP2-ユビキチン鎖二重特異性抗体又は対照抗体を使用して染色し、続いて抗ヒトIgG-Alexa 488二次抗体を使用して染色した。核染色にはHoechst 33258を使用した。WT（野生型、W）細胞及びRIP2 KO（ノックアウト）THP1細胞を使用して、示された抗体を用いて得られたTCL及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を図7Cに示す。この結果は、RIP2-ユビキチン鎖二重特異性抗体が、直鎖状鎖及びK63-Linユビキチン結合型鎖によってユビキチン化されたRIP2を認識することを確認する。WT（野生型、W）細胞及びRIP2 KO（ノックアウト）THP1細胞を使用して、示された抗体を用いて得られたTCL及び免疫沈降タンパク質のウエスタンブロット分析を図7Dに示す。マウントしたスライドをLeica SPE共焦点顕微鏡で分析した。全ての画像は同じ設定を使用して一様に収集された。これらの結果を図7Eに示す。RIP2-K63、RIP2-Lin、及びK63-Lin二重特異性抗体は、免疫蛍光法によって、細胞におけるK63結合型及び直鎖状RIP2ユビキチン化の刺激依存的局在を明らかにしたが、RIP2-gD、gD-K63又はgD-Lin二重特異性抗体では明らかにしなかった。K63-Lin抗体で検出された免疫蛍光は、この抗体がMDP処理細胞内のXIAPを弱く免疫沈降させたため、主に、しかしそれだけではないが、RIP2のユビキチン化の結果である可能性が高い。

【0418】

【0296】 これは、RIP2-ユビキチン鎖二重特異性抗体がK63及び直鎖状鎖ユビキチン化RIP2を認識することを示している。対照的に、シングルアーム（RIP2-gD、K63-gD、Lin-gD）抗体はユビキチン化RIP2を認識せず、RIP2-K63、RIP2-Lin及びK63-Lin二重特異性抗体でさえも、経路関連刺激（MDP）による処理後にのみK63及び直鎖状鎖ユビキチン化RIP2を認識する。

【0419】

I. クローン病及び潰瘍性大腸炎患者試料におけるRIP2のユビキチン化

【0297】 RIP2-K63及びRIP2-Lin二重特異性抗体を、患者からの腸組織試料において試験した（図8A～G）。結腸がん、異形成、憩室炎（DVC）、クローン病（CD）又は潰瘍性大腸炎（UC）の治療のために腸切除手術を受けた患者が観察研究に登録された（表2）。

10

20

30

40

50

表2. IBD及び非IBDコホートの臨床的特徴

	非IBD対象(n=36)		UC患者 (n=19)	CD患者 (n=30)
	憩室炎(n=27)	がん／切除された腫瘍 (n=9)		
年齢(中央値、範囲)、 歳	59 37-75	68.5 50-89	56 17-72	44 18-83
性別(男／女／NR)	10／16／1	5／4／0	13／6／0	12／17／1
生物学的療法歴(はい ／いいえ／NR)	N／A	N／A	11／8／0	21／7／2

N／A、該当なし。

NR、記録なし。

【0420】

【0298】 手術後、腸がん、異形成、憩室炎(DIV)、クローン病(CD)又は潰瘍性大腸炎(UC)の患者からの腸組織試料を6M尿素溶解バッファー中で溶解し、示された二重特異性抗体で免疫沈降させることによって調べた。

【0421】

【0299】 図8Aは、示された二重特異性抗体による、腸がん、異形成、クローン病又は潰瘍性大腸炎試料からの免疫沈降の例を示している。RIP2-K63抗体及びRIP2-Lin二重特異性抗体は、ユビキチン化RIP2を免疫沈降させ、CD及びUC試料において最も強いシグナルが観察された。図8C及び8Dは、個々の患者からの試料1～52(図8C)及び試料53～92(図8D)を示す。各パネルの最後のレーンは、MDP処理(1µg/ml、30分)THP1細胞からの抗体のRIP2-K63及びRIP2-Linの組み合わせによる免疫沈降を含み、対照(Ct)として機能する。6M尿素溶解バッファー中で調製した上記患者からの組織溶解物を、RIP2抗体及びGAPDH抗体を用いたウェスタンブロット法によって調べた。赤いアスタリスクは、品質が悪くタンパク質レベルが低いため免疫沈降から除外された試料を示す。THP1細胞溶解物は対照として機能する。これを図8Eに示す。

【0422】

【0300】 腸がん、異形成、憩室炎(DIV)、クローン病(CD)又は潰瘍性大腸炎(UC)の患者からの試料を6M尿素溶解バッファー中で溶解し、RIP2-K63及びRIP2-Lin二重特異性抗体の組み合わせで溶解物を免疫沈降した。図8Bに示すように、抗RIP2抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。異なる試料間のRIP2ユビキチン化シグナルをよりよく比較するために、RIP2-K63二重特異性抗体及びRIP2-Lin二重特異性抗体によって免疫沈降させたタンパク質を隣り合ったゲル上で比較したところ、CD及びUCの試料における顕著なRIP2のユビキチン化が再び実証された(図8B)。

【0423】

【0301】 図8C及び8Dに示されるように、示された患者試料におけるRIP2のユビキチン化は、示された抗体による免疫沈降後のウェスタンブロットをスキャンすることによって定量化された。スキャンした画像をImageJソフトウェアで処理し、図8Fに示すように、RIP2のユビキチン化を、RIP2-K63/RIP2-Lin抗体を用いた免疫沈降からのゲル強度とgD抗体を用いた免疫沈降からのゲル強度の比として計算した。Nsは有意差がないことを示し、3つのアスタリスクはp<0.0001を示す。図8Fはまた、腸がん、異形成、及び憩室炎試料と比較して、CD及びUC試料ではRIP2のK63結合型及び直鎖状ユビキチン化が上昇している顕著なパターンを示し

た。IBDのリスク対立遺伝子は、疾患の発症に共通するリスク対立遺伝子を同定するためのゲノムワイド関連研究を使用して同定されている(Liu et al., 2015)。集団全体で同定されている2つのCDリスク対立遺伝子、ATG16L1及びNOD2がこのコホートでさらに評価され、NOD2はMDPの下流にあるため特に興味深いものであった。

【0424】

【0302】 これは図8Gに示されており、図8Fで定量化されたRIP2ユビキチン化が棒グラフ形式で示されている。グラフの下には、2つの共通するIBDリスク遺伝子座の遺伝子型情報が記載されている：AはATG16L1、NはNOD2を表す。クローン病及び潰瘍性大腸炎の患者試料では、RIP2ユビキチン化のレベルが上昇していることが判明した。図8FにおけるRIP2ユビキチン化レベルとATG16L1及びNOD2リスク対立遺伝子との比較では関連性は示されず、IBD試料におけるRIP2ユビキチン化がこれらのリスク遺伝子座と相関していないことを示唆している。まとめると、これらのデータは、RIP2-K63及びRIP2-Lin二重特異性抗体を使用して、IBD試料中のRIP2のユビキチン化状態を調べることができることを示している。

10

【0425】

J. K63結合型及び直鎖状ユビキチン鎖で修飾されたタンパク質

【0303】 図9Aは、実験計画スキームの概略図を提供する。THP1細胞をPBS、TNF(100ng/ml)、MDP(1μg/ml)又はLPS(1μg/ml)で指定時間処理し、6M尿素溶解バッファー中で溶解し、K63-Lin二重特異性抗体で免疫沈降させ、質量分析によって分析した。

20

【0426】

【0304】 免疫沈降タンパク質をSDS-PAGEで分離し、切り出し、質量分析で解析したところ、刺激に応じて異なるユビキチン化基質が明らかになった。図9Bは、質量分析によって同定されたタンパク質を提供する。数字は、各タンパク質について同定されたペプチドの総数と固有の(括弧内)数を示す。TNF刺激により、既知(RIP1、TNFR1)及び新規(TRADD)のユビキチン化基質が同定され、一方、MDP及びLPS処理により、それぞれRIP2、NOD2、IRAK1の顕著なK63結合型及び直鎖状ユビキチン化が同定された。これは図10A~10Eにも示されている。質量分析分析から得られた最も頑健な同定シグナルは、MDP処理後のRIP2のものであった。

30

【0427】

【0305】 THP1細胞を、図9Aと同様に示された刺激で処理し、6M尿素溶解バッファー中で溶解し、K63-Lin二重特異性抗体で免疫沈降させた。図9Cに示すように、免疫沈降タンパク質及び全細胞溶解物タンパク質を、示された抗体でプローブした。この免疫沈降とウエスタンブロットにより、質量分析でユビキチン化されていることが判明したタンパク質が、実際にK63結合型及び直鎖状ユビキチン化によって修飾されていることが確認された。

【0428】

【0306】 RIP2 C末端SPSLNLLQNKSM(配列番号102)に一致する選択されたms/msスペクトルを、一致するフラグメントイオンについて注釈し(図9D)、4つの処理条件からのそれらの抽出イオンクロマトグラフィー(XIC)を図示した。一致したXICピークが矢印で強調表示され(図9E)、MDP処理条件からユビキチン化RIP2が同定された。K^{ub}は、RIP2の位置K538でのユビキチン化を示す。M^{ox}は、RIP2ポリペプチドの位置M540の酸化を示す。このことは、K538が、K63結合型及び／又は直鎖状ユビキチン化による主なRIP2修飾部位であることを示した。まとめると、これらは、K63-Lin二重特異性抗体を使用して、一般的なタンパク質修飾に加えて、特異的なユビキチン化部位を同定できることを示している。

40

【0429】

50

【0307】 このことは、K63-Lin二重特異性抗体を使用して、異なるシグナル伝達経路においてK63結合型及び直鎖状鎖でユビキチン化されたタンパク質を検出及び同定できることを示している。

【0430】

【0308】 上述の発明を、理解を明確にする目的で、説明及び実施例によって、ある程度詳細に説明してきたが、説明及び実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

配列表

配列番号	説明	配列
1	抗K11 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPS</u> SLSASVGDRVITITCRASQIVGTFVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQSYT TPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGC
2	抗K11成熟LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQI VGTFVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFA TYYCQQSYTTPPTFGQGKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
3	抗K11ノブHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYISWV RQAPGKGLEWVAAINPAGGYTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCAREWYFGGYVMDYWGQGTSLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	抗K11成熟ノブHC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNSYISWVRQAPGKGLEWVAAINPAGG YTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAREWYFGGYVMDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFS CVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

10

20

30

40

50

5	抗K11ホールHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> <u>GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYISWV</u> <u>RQAPGKGLEWVAAINPAGGYTTYADSVK</u> <u>GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAREWYFGGYVMDYWGQGT</u><u>LVTVSSA</u> <u>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV</u> <u>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u> <u>QSSGLYSLS</u><u>SVVTV</u><u>PSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL</u> <u>DSDG</u><u>SFFLVSKLTVDKSRWQQGNV</u><u>FSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
6	抗K11成熟ホーLHC	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSNSYISWVRQAPGKGLEWVAAINPAGG</u> <u>YTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAREWYFGGYVMDYWGQ</u> <u>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u><u>SVVTV</u><u>PSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD</u> <u>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> <u>QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u><u>PEN</u> <u>NYKTTPPVLDSDG</u><u>SFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNV</u><u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>
7	抗K11 LCVR(HVRに下線)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQI</u> <u>VGTFVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS</u> <u>GVPSRFGSGSGTDFTLTIS</u><u>SLQPEDFA</u> <u>TYYCQQSYTTPPTFGQG</u><u>TKVEIK</u>
8	抗K11 HCVR(HVRに下線)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSNSYISWVRQAPGKGLEWVAAINPAGG</u> <u>YTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAREWYFGGYVMDYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>
9	抗K11 HVR-L1	RASQIVGTFVA
10	抗K11 HVR-L2	SASFLYS
11	抗K11 HVR-L3	QQSYTTPPT
12	抗K11 HVR-H1	GFTFSNSYIS
13	抗K11 HVR-H2	AINPAGGYTTYADSVKG
14	抗K11 HVR-H3	AREWYFGGYVMDY

10

20

30

40

50

15	抗K48 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPS</u> SLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGS RSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSY SSLITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
16	抗K48成熟LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS VSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSSYSSLITFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	抗K48ノブHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> GLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSSMHVW RQAPGKGLEWVASIYSYYSYTSYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARSYSYHLGMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	抗K48成熟ノブHC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN ISYSSMHVWRQAPGKGLEWVASIYSYYS YTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARSYSYHLGMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K

10

20

30

40

50

19	抗K48ホールHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> <u>GLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSSMHVVR</u> <u>RQAPGKGLEWVASIYSYYSYTSYADSVK</u> <u>GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCARSYSYHLGMDYWGQGTLVTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</u> <u>SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
20	抗K48成熟ホールHC	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN</u> <u>ISYSSMHVVRQAPGKGLEWVASIYSYYS</u> <u>YTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARSYSYHLGMDYWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG</u> <u>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT</u> <u>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
21	抗K48 LCVR(HVRに下線)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS</u> <u>VSSAFAVAYQQKPGKAPKLLIYSASSLYS</u> <u>GVPSRFSGSRSGTDFTLTITSSLPEDFA</u> <u>TYQCQQSSYSSLITFGQGTKVEIK</u>
22	抗K48 HCVR(HVRに下線)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN</u> <u>ISYSSMHVVRQAPGKGLEWVASIYSYYS</u> <u>YTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARSYSYHLGMDYWGQG</u> <u>TLVTVSS</u>
23	抗K48 HVR-L1	RASQSVSSAVA
24	抗K48 HVR-L2	SASSLYS
25	抗K48 HVR-L3	QQSSYSSLIT
26	抗K48 HVR-H1	GFNISYSSMH
27	抗K48 HVR-H2	SIYSYYSYTSYADSVKG
28	抗K48 HVR-H3	ARSYSYHLGMDY

10

20

30

40

50

29	抗K63 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPS</u> SLSASVGDRVITITCRASQSVSSAVAWYQ QKPGEAPKLLIYSARSLYSGVPSRFSGS RSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSS YSSLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
30	抗K63成熟LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQS VSSAVAWYQQKPGEAPKLLIYSARSLYS GVPSPRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQYSSYSSLFTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	抗K63ノブHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> GLVQPGGSLRLSCAASGFNVKTGLIHWV RQAPGKGLEWVAYITPYYGSTSYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCAREYYRWYTAIDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	抗K63成熟ノブHC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN VKTGLIHWVRQAPGKGLEWVAYITPYYG STSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAREYYRWYTAIDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SSVVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

33	抗K63ホールHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSC I I L F L V A T A T G A Y A E V Q L V E S G G</u> <u>GLVQPGGSLRLSCAASGFNVKTGLIHWV</u> <u>RQAPGKGLEWVAYITPYYGSTSYADSVK</u> <u>GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAREYYRWYTAIDYWGQGT LVTVSSA</u> <u>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV</u> <u>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u> <u>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL</u> <u>DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
34	抗K63成熟ホールHC	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN</u> <u>VKTGLIHWVRQAPGKGLEWVAYITPYYG</u> <u>STSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAREYYRWYTAIDYWGQ</u> <u>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD</u> <u>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> <u>QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>
35	抗K63 LCVR(HVRに下線)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS</u> <u>VSSA VAWYQQKPG EAPKLLIYSARSLYS</u> <u>GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA</u> <u>TY YCQQYSSYSSSLFTFGQGGTKVEIK</u>
36	抗K63 HCVR(HVRに下線)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN</u> <u>VKTGLIHWVRQAPGKGLEWVAYITPYYG</u> <u>STSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAREYYRWYTAIDYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>
37	抗K63 HVR-L1	RASQSVSSAVA
38	抗K63 HVR-L2	SARSLYS
39	抗K63 HVR-L3	QQYSSYSSSLFT
40	抗K63 HVR-H1	GFNVKTGLIH
41	抗K63 HVR-H2	YITPYYGSTSYADSVKG
42	抗K63 HVR-H3	AREYYRWYTAIDY

10

20

30

40

50

43	抗M1 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHSD</u> I QMTQSPS SLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSAKFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTIISSLPEDFATYYCQQSYT TPPTFGQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
44	抗M1成熟LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQD VSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAKFLYS GVPSSRFSGSGSGTDFTLTIISSLPEDFA TYYCQQSYTTPPTFGQGGTKVEIKRTVAA PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
45	抗M1ノブHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYA</u> EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNTYISWV RQAPGKGLEWVASITPSSGQTDYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARTWLLRWVMDLWGQGT LVT VSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	抗M1成熟ノブHC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNTYISWVRQAPGKGLEWVASITPSSG QTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARTWLLRWVMDLWGQG TLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K

10

20

30

40

50

47	抗M1ホールHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIILFLVATATGAYAEVQLVESGG</u> <u>GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNTYISWV</u> <u>RQAPGKGLEWVASITPSSGQTDYADSVK</u> <u>GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCARTWLLRWVMDLWGQGTLVTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</u> <u>SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
48	抗M1成熟ホールHC	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSNTYISWVRQAPGKGLEWVASITPSSG</u> <u>QTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARTWLLRWVMDLWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG</u> <u>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG</u> <u>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK</u> <u>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT</u> <u>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</u> <u>YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
49	抗M1 LCVR(HVRに下線)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD</u> <u>VSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS</u> <u>AKFLYS</u> <u>GVPSRFS</u> <u>SGSGTDFTLTISS</u> <u>LQPEDFA</u> <u>TYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIK</u>
50	抗M1 HCVR(HVRに下線)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSNTYISWVRQAPGKGLEWVASITPSSG</u> <u>QTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARTWLLRWVMDLWGQG</u> <u>TLVTVSS</u>
51	抗M1 HVR-L1	RASQDVSTAVA
52	抗M1 HVR-L2	SAKFLYS
53	抗M1 HVR-L3	QQSYTTPPT
54	抗M1 HVR-H1	GFTFSNTYIS
55	抗M1 HVR-H2	SITPSSGQTDYADSVKG
56	抗M1 HVR-H3	ARTWLLRWVMDL

10

20

30

40

57	抗RIP1 LC1(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHS</u> NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRVSGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
58	抗RIP1成熟LC1(de novoシーケンシングより)	NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRVSGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
59	1つのアミノ酸の相違L104Vを有する抗RIP1 LC1(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHS</u> NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRVSGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGK V EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
60	1つのアミノ酸の相違L104Vを有する抗RIP1成熟LC1	NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRVSGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGK V EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	抗RIP1 LC2(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGVHS</u> NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
62	抗RIP1成熟LC2	NIMMTQSPSSLAVSAGQKVTMNCKSSQNVITYTSNQRNYLAWYQQKPGQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVEVEDLAVYYCHQYLSSSWTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

10

20

30

40

63	抗RIP1 HC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIILFLVATATGAYADVQLVESGG</u> <u>GLVQPGGSRKLSCAASGFTFGSFGMHV</u> RQTPEKRLEWIAYISSGGSTIYYADTVK GRFTISRDTPKNTLFLQMTSLRSEDAM YFCARSIMISTEFDYWGGTTTLTVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAH PASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPA PNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIYVEWTDNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPG	10
64	抗RIP1成熟HC(de novoシーケンシングより)	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFT FGSFGMHVVRQTPEKRLEWIAYISSGGS TIYYADTVKGRFTISRDTPKNTLFLQMT SLRSEDAMYFCARSIMISTEFDYWGG TTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSI TCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIK PCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDV LMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLT CMVTD FMPEDIYVEWTDNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	20
65	定常領域に2つのアミノ酸の相違を有する抗RIP1 HC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIILFLVATATGAYADVQLVESGG</u> <u>GLVQPGGSRKLSCAASGFTFGSFGMHV</u> RQTPEKRLEWIAYISSGGSTIYYADTVK GRFTISRDTPKNTLFLQMTSLRSEDAM YFCARSIMISTEFDYWGGTTTLTVSSAK TTGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAH PASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPA PNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	30
			40

66	定常領域に2つのアミノ酸の相違を有する抗RIP1成熟HC	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFT FGSFGMHWRQTPEKRLEWIAIYISSGGS TIYYADTVKGRFTISRDTPKNTLFLQMT SLRSEDTAMYFCARSIMISTEFDYWGG TTLTVSSAKTTGPSVYPLAPVCGD TTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIK PCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDV LMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHGDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPG K
67	抗RIP1ノブHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAY</u> ADVQLVESGG GLVQPGGSRKLSCAASGFTFGSFGMHWR RQTPEKRLEWIAIYISSGGSTIYYADTVK GRFTISRDTPKNTLFLQMTSLRSEDTAM YFCARSIMISTEFDYWGGTTTLTVSSAK TTGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	抗RIP1成熟ノブHC	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFT FGSFGMHWRQTPEKRLEWIAIYISSGGS TIYYADTVKGRFTISRDTPKNTLFLQMT SLRSEDTAMYFCARSIMISTEFDYWGG TTLTVSSAKTTGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK THTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K

10

20

30

40

50

69	抗RIP1ホールHC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSC I I L F L V A T A T G A Y A D V Q L V E S G G</u> <u>GLVQPGGSRKLSCAASGFTFGSFGMHV</u> <u>RQTPEKRLEWIA Y I S S G G S T I Y Y A D T V K</u> <u>GRFT I S R D T P K N T L F L Q M T S L R S E D T A M</u> <u>Y F C A R S I M I S T E F D Y W G Q G T T L T V S S A K</u> <u>T T G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K</u> <u>D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q</u> <u>S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N</u> <u>H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A</u> <u>P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V</u> <u>T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A</u> <u>K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N</u> <u>G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P</u> <u>R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L S C A V K G</u> <u>F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D</u> <u>S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V</u> <u>M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K</u>
70	抗RIP1成熟ホールHC	<u>D V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S C A A S G F T</u> <u>F G S F G M H W V R Q T P E K R L E W I A Y I S S G G S</u> <u>T I Y Y A D T V K G R F T I S R D T P K N T L F L Q M T</u> <u>S L R S E D T A M Y F C A R S I M I S T E F D Y W G Q G</u> <u>T T L T V S S A K T T G P S V F P L A P S S K S T S G G</u> <u>T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G</u> <u>V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G</u> <u>T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K</u> <u>T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T</u> <u>L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y</u> <u>V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L</u> <u>T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K</u> <u>T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q</u> <u>V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N</u> <u>Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q</u> <u>Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G</u> <u>K</u>
71	1つのアミノ酸の相違L104Vを有する抗RIP1 LC1 LCVR(HVRに下線)	<u>N I M M T Q S P S S L A V S A G Q K V T M N C K S S Q N</u> <u>V I Y T S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W</u> <u>A S T R V S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V</u> <u>E V E D L A V Y Y C H Q Y L S S W T F G G G T K V E I K</u>
72	抗RIP1 LC2 LCVR(HVRに下線)	<u>N I M M T Q S P S S L A V S A G Q K V T M N C K S S Q N</u> <u>V I Y T S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y G</u> <u>A S N R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V</u> <u>E V E D L A V Y Y C H Q Y L S S W T F G G G T K L E I K</u>
73	抗RIP1 HCVR(HVRに下線)	<u>D V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S C A A S G F T</u> <u>F G S F G M H W V R Q T P E K R L E W I A Y I S S G G S</u> <u>T I Y Y A D T V K G R F T I S R D T P K N T L F L Q M T</u> <u>S L R S E D T A M Y F C A R S I M I S T E F D Y W G Q G</u> <u>T T L T V S S</u>
74	抗RIP1 LC1 HVR-L1	KSSQNV I Y T S N Q R N Y L A
75	抗RIP1 LC1 HVR-L2	W A S T R V S
76	抗RIP1 LC1 HVR-L3	H Q Y L S S W T
74	抗RIP1 LC2 HVR-L1	KSSQNV I Y T S N Q R N Y L A
77	抗RIP1 LC2 HVR-L2	G A S N R Y T
76	抗RIP1 LC2 HVR-L3	H Q Y L S S W T
78	抗RIP1 HVR-H1	G F T F G S F G M H

10

20

30

40

50

79	抗RIP1 HVR-H2	Y I S S G G S T I Y Y A D T V K G
80	抗RIP1 HVR-H3	A R S I M I S T E F D Y
81	抗RIP2 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>M G W S C I I L F L V A T A T G V H S N I M M T Q S P S</u> S L A V S A G E K V T M N C K S S Q S V L Y S S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S I R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C
82	抗RIP2成熟LC(de novo シークエンシングより)	N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M N C K S S Q S V L Y S S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S I R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C
83	1つのアミノ酸の相違L104 Vを有する抗RIP2 LC(シグナル配列に下線あり)	<u>M G W S C I I L F L V A T A T G V H S N I M M T Q S P S</u> S L A V S A G E K V T M N C K S S Q S V L Y S S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S I R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
84	1つのアミノ酸の相違L104 Vを有する抗RIP2成熟LC	N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M N C K S S Q S V L Y S S N Q R N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S I R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
85	抗RIP2 HC(シグナル配列に下線あり)	<u>M G W S C I I L F L V A T A T G A Y A E V Q L Q Q S G P</u> E L E K P G A S V K I S C K A S G Y S F T A Y N M N W V K Q S N G K S L E W I G N I D P F Y G D L N Y S Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M Q L M S L T S E D S A V Y Y C V R S N Y Y A S V Y G A W F A H W G Q G T L V T V S A A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D C G C K P C I C T V P E V S S V F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I S K T K G R P K A P Q V Y T I P P P K E Q M A K D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G L H N H H T E K S L S H S P G K

10

20

30

40

50

86	抗RIP2成熟HC(de novo シークエンシングより)	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTAYNMNWVKQSNKGKSLGWIGNIDPFY GDLNYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLM SLTSEDSAVYYCVRSNYYASVYGAWFAH WGQGTTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNMVTTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELP IMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT ISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKV LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAG NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	10
87	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2 HC(シグナル配列に下線あり)	<u>MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLQQSGP</u> <u>ELEKPGASVKISCKASGYSFTAYNMNWV</u> <u>KQSNKGKSLGWIGNIDPFYGD</u> <u>LNYSQKFK</u> <u>GKATLTVDKSSSTAYMQLMSLTSEDSAV</u> <u>YYCVRSNYYASVYGAWFAHWGQGT</u> <u>TLTV</u> <u>SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVT</u> <u>TLG</u> <u>CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF</u> <u>P</u> <u>AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTC</u> <u>NVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICT</u> <u>VPEVSSVFI FPPKPKDVL</u> <u>TITLTPKVTC</u> <u>VVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT</u> <u>QPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK</u> <u>EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKA</u> <u>PQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF</u> <u>PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTD</u> <u>GSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLH</u> <u>EGLHNHHTEKSLSHSPGK</u>	20
88	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2成熟HC	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTAYNMNWVKQSNKGKSLGWIGNIDPFY GDLNYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLM SLTSEDSAVYYCVRSNYYASVYGAWFAH WGQGTTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNMVTTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELP IMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT ISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKV LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAG NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	30
			40

89	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2ノブHC (シグナル配列に下線あり)	<u>MGW</u>SCIIILFLVATATGAYAEVQLQQSGP ELEKPGASVKISCKASGYSFTAYNMNVV KQSNKGKSLWIGNIDPFYGDNLNYSQKFK GKATLTVDKSSSTAYMQLMSLTSEDSAV YYCVRSNYYASVYGAWFAHWGQGTTLVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2成熟ノブHC	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTAYNMNVVKQSNKGKSLWIGNIDPFYGD NLNYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLM SLTSEDSAVYYCVRSNYYASVYGAWFAH WGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
91	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2ホールHC (シグナル配列に下線あり)	<u>MGW</u>SCIIILFLVATATGAYAEVQLQQSGP ELEKPGASVKISCKASGYSFTAYNMNVV KQSNKGKSLWIGNIDPFYGDNLNYSQKFK GKATLTVDKSSSTAYMQLMSLTSEDSAV YYCVRSNYYASVYGAWFAHWGQGTTLVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

92	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2成熟ホー ルHC	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTAYNMNWVKQSNKGKSLWIGNIDPFY DLNYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLM SLTSEDSAVYYCVRSNYYASVYGAWFAH WGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLTGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
93	1つのアミノ酸の相違L104 Vを有する抗RIP2 LCVR (HVRに下線)	NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMNC <u>KSSQS</u> VLYSSNQARNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW <u>ASIRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS</u> <u>QAEDLAVYYCHQYLSSSYTFGGGTKVEIK</u>
94	1つのアミノ酸の相違A113 Sを有する抗RIP2 HCVR (HVRに下線)	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTAYNMNWVKQSNKGKSLWIGNIDPFY <u>DLNYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLM</u> <u>SLTSEDSAVYYCVRSNYYASVYGAWFAH</u> WGQGTTLVTVSS
95	抗RIP2 HVR-L1	KSSQSVLYSSNQARNYLA
96	抗RIP2 HVR-L2	WASIRES
97	抗RIP2 HVR-L3	HQYLSSYT
98	抗RIP2 HVR-H1	GYSFTAYNMN
99	抗RIP2 HVR-H2	NIDPFYGDLYNSQKFKG
100	抗RIP2 HVR-H3	VRSNYYASVYGAWFAH
101	RIP2ポリペプチド配列 (Uni Prot O43353)	MNGEAICSA LPTIPYHKLADLRYLSRGA SGTVSSARHADWRVQVAVKHLHIHTPLL DSERKDVLR AEILHKARFSYILPILGI CNEPEFLGIVTEYMPNGSLNELLHRKTE YPDVAWPLRFRILHEIALGVNYLHNMT PLLHHD LKTQNI LL DNEFHVKIADFGLS KWRMMSLSQSRS SSKSAPEGGTIIYMPPE NYEPGQKSRASIKHDIYSYAVITWEVLS RKQPFEDVTNPLQIMYSV SQGHRPVINE ESLPYDIPHRARMISLIESGWAQNPDER PSFLKCLIELEPVLRTFEEITFLEAVIQ LKKT KLQSVSSA IHLCDK KKMELSLNIP VNHGPQEE SCGSSQLHENS GSPETS RSL PAPQDNDFLSRKAQDCYFMKLHHC PGNH SWDSTISGSQRAAFCDHKTTPCSSAIIN PLSTAGNSERLQPGIAQQW IQSKREDIV NQMTEACLNQSLDALLSRDLIMKEDYEL VSTKPTRTSKVRQLLDTTDIQGE EFAKV IVQKLKDNKQMG LQPYPEILVVSRS PSL NLLQNKSM
102	RIP2ポリペプチドのC末端 残基529-540	SPSLNLLQNKSM

10

20

30

40

50

103	RIP1ポリペプチド(UniProt Q13546)	MQPDMSLNVIKMKSSDFLESAELDSGGF GKVS LCFHRTQG L MIMKT VYKGPNC I E H NEAL LEEAKMMNRLRHSRVVKLLGV I I E EGKYS L VMEYMEKGNLMHVLKAEMSTPL SVKGR I I L E I I E G M C Y L H G K G V I H K D L K PEN I L V D N D F H I K I A D L G L A S F K M W S K L N N E E H N E L R E V D G T A K K N G G T L Y Y M A P E H L N D V N A K P T E K S D V Y S F A V V L W A I F A N K E P Y E N A I C E Q Q L I M C I K S G N R P D V D D I T E Y C P R E I I S L M K L C W E A N P E A R P T F P G I E E K F R P F Y L S Q L E E S V E E D V K S L K K E Y S N E N A V V K R M Q S L Q L D C V A V P S S R S N S A T E Q P G S L H S S Q G L G M G P V E E S W F A P S L E H P Q E E N E P S L Q S K L Q D E A N Y H L Y G S R M D R Q T K Q Q P R Q N V A Y N R E E E R R R R V S H D P F A Q Q R P Y E N F Q N T E G K G T A Y S S A A S H G N A V H Q P S G L T S Q P Q V L Y Q N N G L Y S S H G F G T R P L D P G T A G P R V W Y R P I P S H M P S L H N I P V P E T N Y L G N T P T M P F S S L P P T D E S I K Y T I Y N S T G I Q I G A Y N Y M E I G G T S S S L L D S T N T N F K E E P A A K Y Q A I F D N T T S L T D K H L D P I R E N L G K H W K N C A R K L G F T Q S Q I D E I D H D Y E R D G L K E K V Y Q M L Q K W V M R E G I K G A T V G K L A Q A L H Q C S R I D L L S S L I Y V S Q N	10 20
104	TRADD:125-134	LDALLADEER	
105	TNFR1:415-423	EATLELLGR	
106	RIP1:154-163	IADLGLASF	
107	NOD2:107-118	LIAAAQEAQADSQSPK	
108	IRAK1:343-351	SSNVLLDER	

H C = 重鎖 ; L C = 軽鎖 ; H C V R = 重鎖可変領域 ; L C V R = 軽鎖可変領域 ; H V R = 超可変領域。

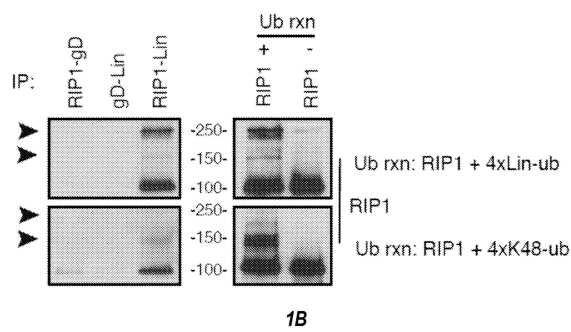
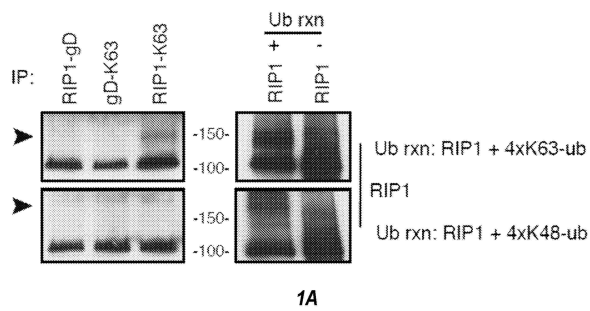
30

40

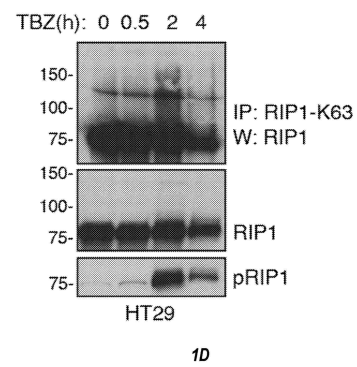
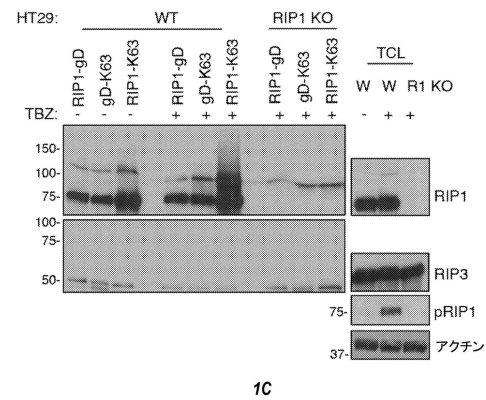
50

【図面】

【図 1 A - 1 B】



【図 1 C - 1 D】



10

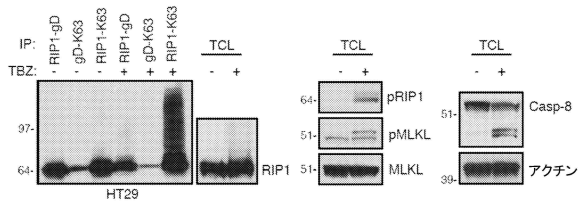
20

30

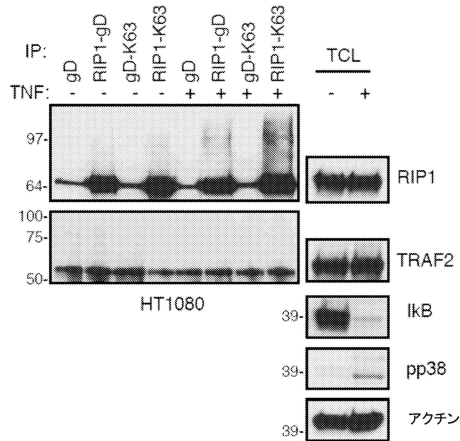
40

50

【図 2 A - 2 B】

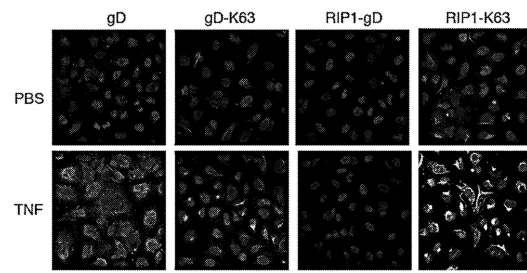


2A



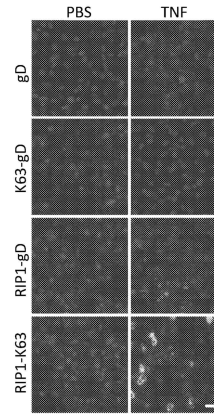
2B

【図 2 C - 2 D】



2C

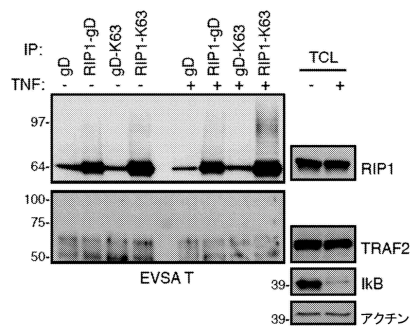
10



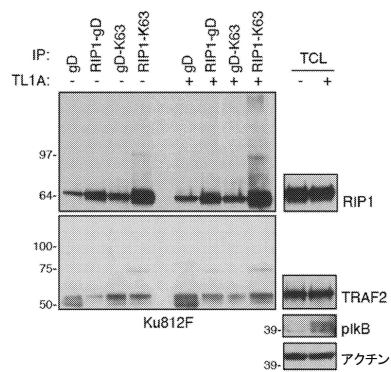
2D

20

【図 3 A - 3 B】

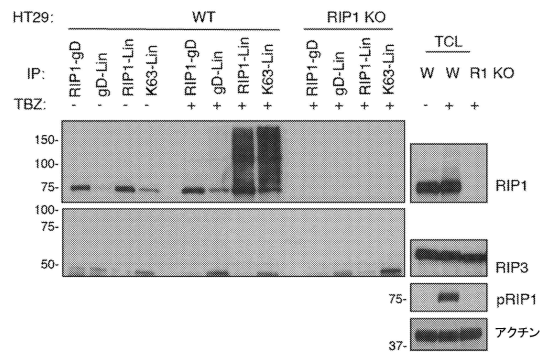


3A



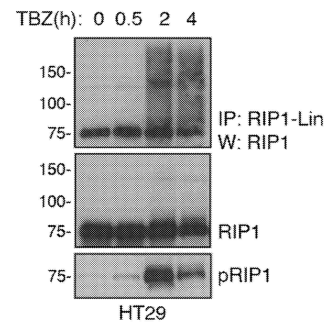
3B

【図 3 C - 3 D】



3C

30

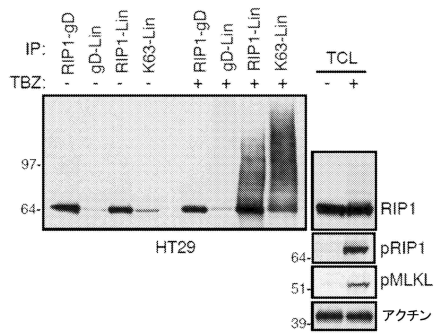


3D

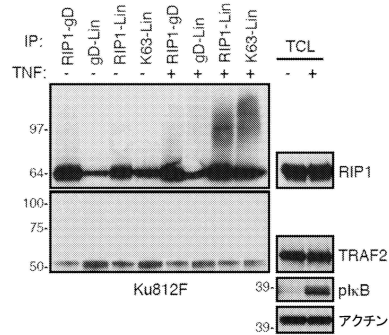
40

50

【図 4 A - 4 B】

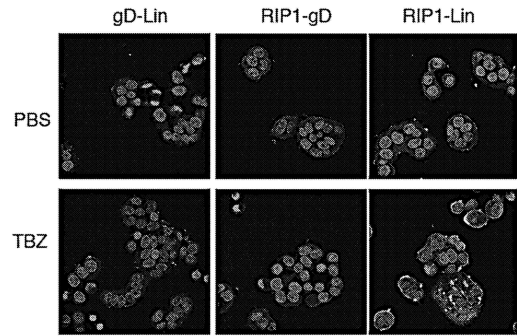


4A

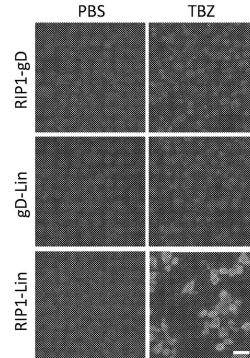


4B

【図 4 C - 4 D】

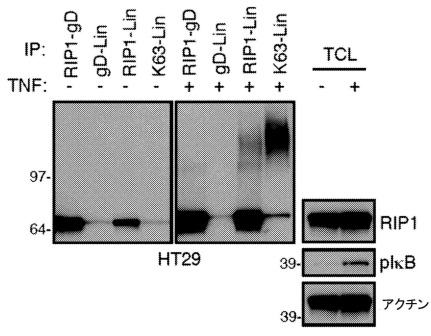


4C

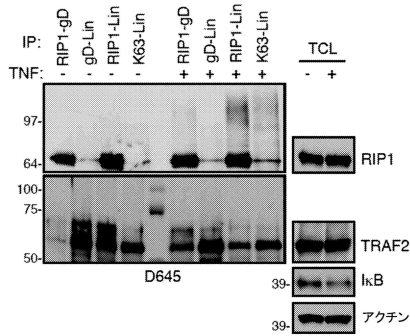


4D

【図 5 A - 5 B】

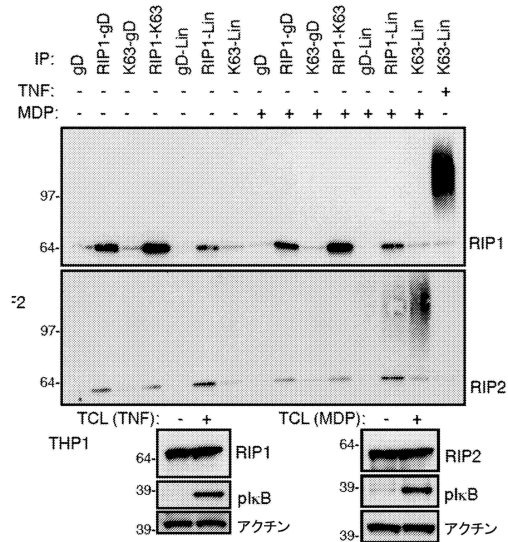


5A



5B

【図 5 C】



10

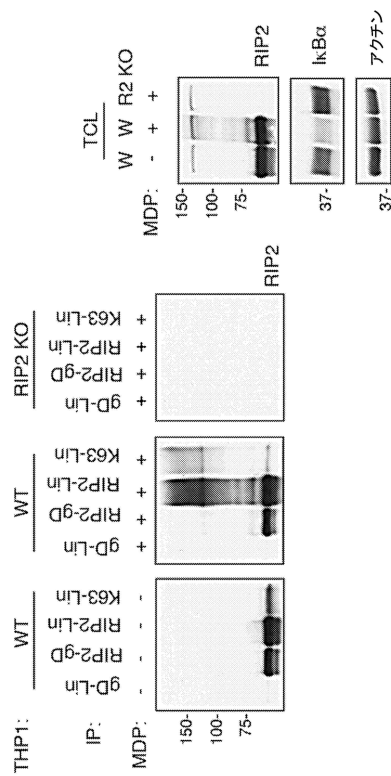
20

30

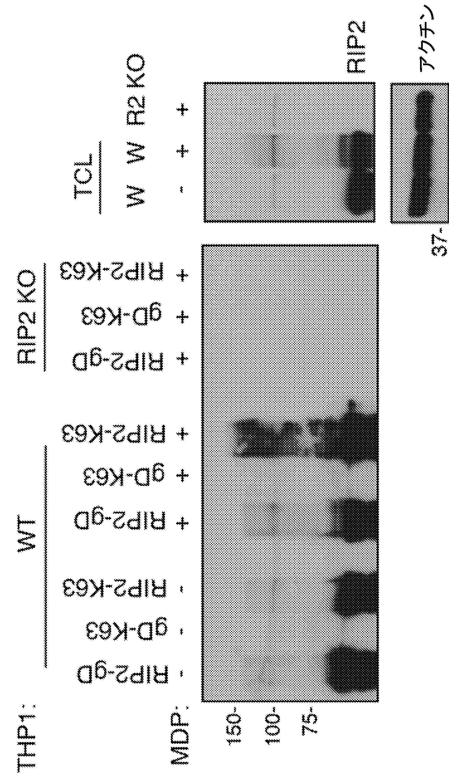
40

50

【図 7 C】



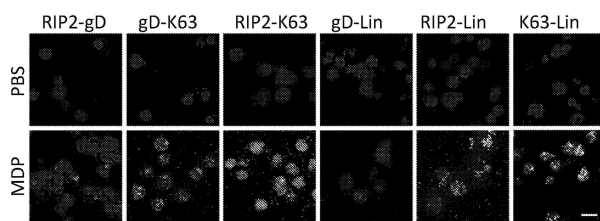
【図 7 D】



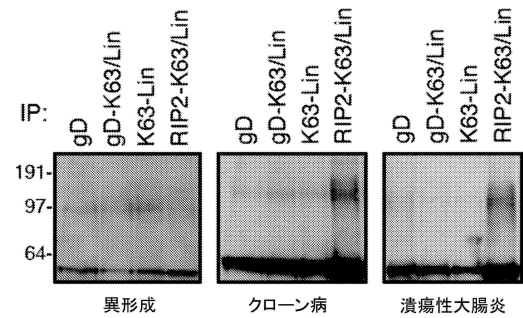
10

20

【図 7 E】



【図 8 A】

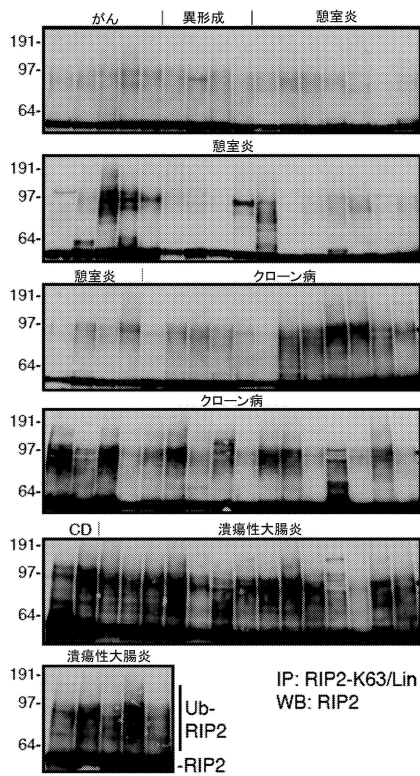


30

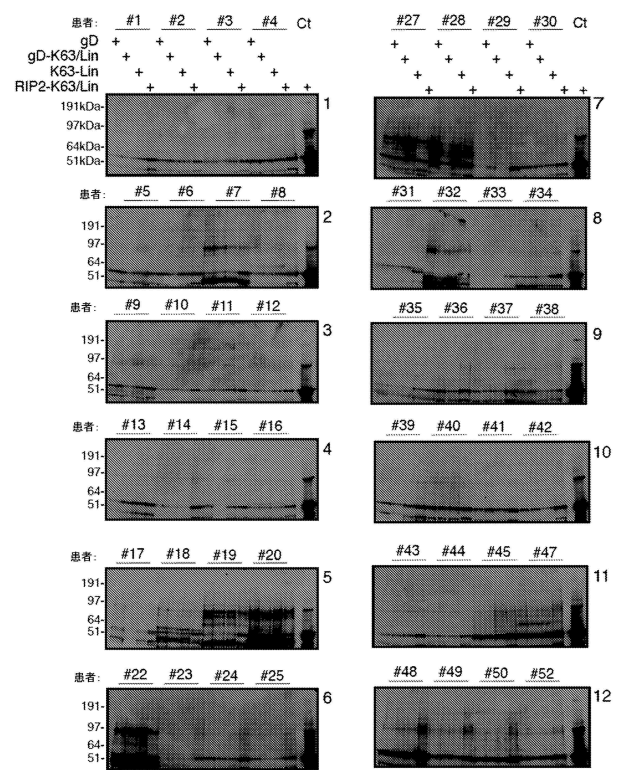
40

50

【図 8 B】



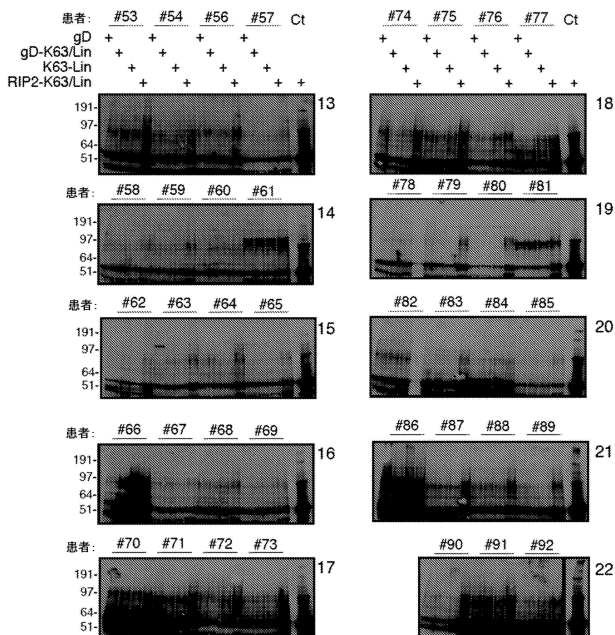
【図 8 C】



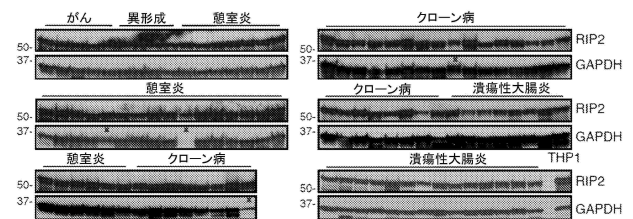
10

20

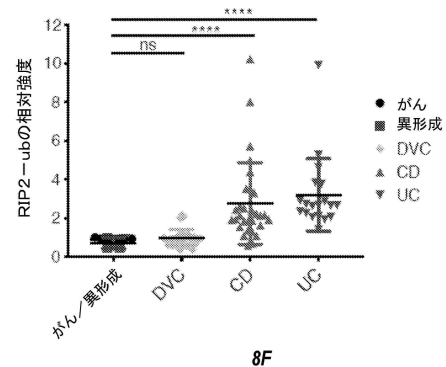
【図 8 D】



【図 8 E - 8 F】



8E



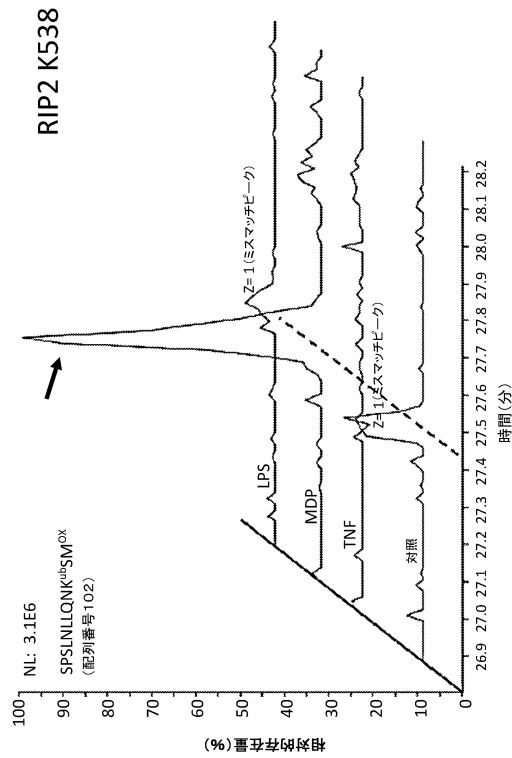
8F

30

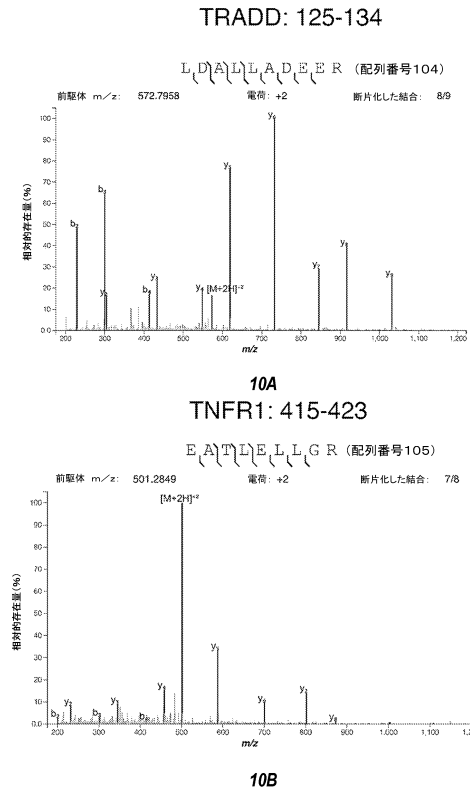
40

50

【図 9 E】



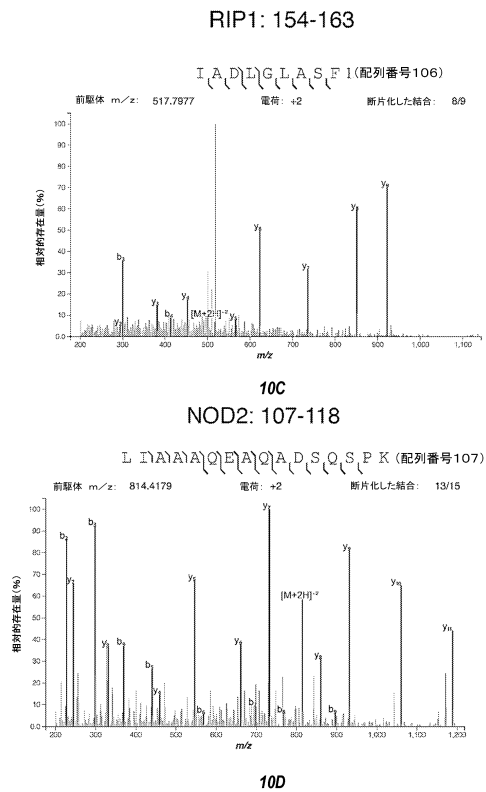
【図 10 A - 10 B】



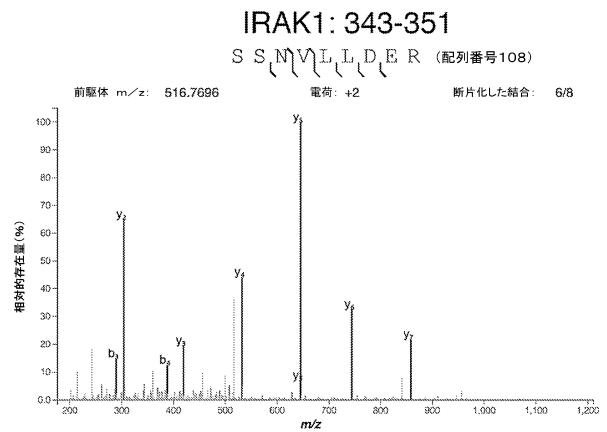
10

20

【図 10 C - 10 D】



【図 10 E】



30

40

50

【配列表】
2024534853000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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, BIOSIS, EMBASE, 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	DONDELINGER YVES ET AL: "Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 73, no. 11, 11 April 2016 (2016-04-11), pages 2165-2176, XP035858593, ISSN: 1420-682X, DOI: 10.1007/s00018-016-2191-4 [retrieved on 2016-04-11] abstract figure 1 ----- -/--	1-5, 7-15, 19-132

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

17 November 2022

Date of mailing of the international search report

25/11/2022

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

Authorized officer

Sitch, David

1

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HASEGAWA MIZUHO ET AL: "A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation", THE EMBO JOURNAL, vol. 27, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 373-383, XP55981577, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2234345/pdf/7601962a.pdf> abstract figure 9 -----	1-4, 6-12, 16-132
A	WO 2017/223405 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 28 December 2017 (2017-12-28) Paragraph 11, figures 1a-d -----	1
A	MARISSA L MATSUMOTO ET AL: "Engineering and structural characterization of a linear polyubiquitin-specific antibody", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 418, no. 3-4, 29 December 2011 (2011-12-29), pages 134-144, XP55141931, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/j.jmb.2011.12.053 Abstract; paragraph immediately before 'Discussion' -----	1
A	KIM NEWTON ET AL: "Ubiquitin Chain Editing Revealed by Polyubiquitin Linkage-Specific Antibodies", CELL, vol. 134, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 668-678, XP55160654, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.039 abstract -----	1
A	ZELIC MATIJA ET AL: "RIPK1 activation mediates neuroinflammation and disease progression in multiple sclerosis", CELL REPORTS, vol. 35, no. 6, 1 May 2021 (2021-05-01), page 109112, XP55982281, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109112 Retrieved from the Internet: URL:https://www.cell.com/cell-reports/pdfExtended/S2211-1247(21)00446-0> Table on page 37 ----- -/--	1

1

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI ET AL: "RIPK2 is an unfavorable prognosis marker and a potential therapeutic target in human kidney renal clear cell carcinoma", AGING, 31 March 2021 (2021-03-31), pages 10450-10467, XP55982293, Retrieved from the Internet: URL:https://www.aging-us.com/article/202808/pdf> 'Plasmids and reagents' on page 10459 -----	1
A	WATANABE T ET AL: "NOD2 downregulates colonic inflammation by IRF4-mediated inhibition of K63-linked polyubiquitination of RICK and TRAF6", MUCOSAL IMMUNOLOGY, vol. 7, no. 6, 1 November 2014 (2014-11-01), pages 1312-1325, XP55981920, New York ISSN: 1933-0219, DOI: 10.1038/mi.2014.19 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4177019/pdf/nihms569678.pdf> -----	1
A	TAO M ET AL: "ITCH K63-Ubiquitinates the NOD2 Binding Protein, RIP2, to Influence Inflammatory Signaling Pathways", CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE, GB, vol. 19, no. 15, 11 August 2009 (2009-08-11), pages 1255-1263, XP026684441, ISSN: 0960-9822, DOI: 10.1016/J.CUB.2009.06.038 [retrieved on 2009-07-09] -----	1

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/075595
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. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/075595

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017223405	A1	28-12-2017	CN 109563160 A	02-04-2019
			EP 3475298 A1	01-05-2019
			JP 7133477 B2	08-09-2022
			JP 2019528040 A	10-10-2019
			JP 2022130392 A	06-09-2022
			US 2019169278 A1	06-06-2019
			US 2022242938 A1	04-08-2022
			WO 2017223405 A1	28-12-2017

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB
,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,
LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,W
S,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

2. TRITON

イーエヌエー ウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ゴンチャロフ, タティアナ

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

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44 CA46
4C085 AA14 AA16 AA19 BB11 BB36 CC23
4H045 AA11 AA30 BA70 BA71 DA76 EA20 EA50 FA74