(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-530434
(P2019-530434A)
(43)公表日　令和1年10月24日(2019.10.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C084
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 279 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-506082 (P2019-506082)
(86)(22)出願日　平成29年8月4日 (2017.8.4)
(85)翻訳文提出日　平成31年4月3日 (2019.4.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/045642
(87)国際公開番号　WO2018/027204
(87)国際公開日　平成30年2月8日 (2018.2.8)
(31)優先権主張番号　62/371,671
(32)優先日　平成28年8月5日 (2016.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ハリス，　セス
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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アゴニスト活性を有する多価及び多重エピトープ抗体ならびに使用方法

(57)【要約】
細胞表面受容体に対するアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、複合体は、同じ細胞表面受容体の複数のエピトープに対して結合特異性を有する。核酸、ベクター、宿主細胞、薬学的組成物、及びそれに関連する産生方法が本明細書でさらに提供される。
【選択図】図３Ｂ

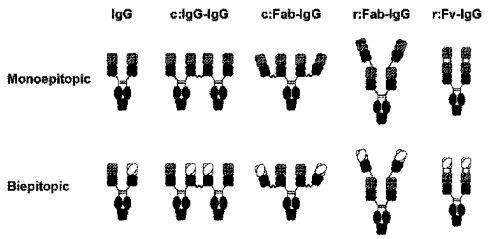


FIG. 3B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＯＸ４０に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体であって、前記複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、前記４つの抗原結合ドメインのそれぞれが、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと、を含み、前記複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、を含み、ＯＸ４０の前記第１及び第２のエピトープが異なる、前記抗原結合複合体。
【請求項２】
前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインが、ＯＸ４０への結合について、前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインと交差競合しない、請求項１に記載の複合体。
【請求項３】
ＯＸ４０に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体であって、前記複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、前記４つの抗原結合ドメインのそれぞれが、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと、を含み、前記複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、を含み、前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインは、ＯＸ４０への結合について、前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインと交差競合しない、前記抗原結合複合体。
【請求項４】
前記複合体が、前記第１のエピトープに結合する２つの抗原結合ドメインと、前記第２のエピトープに結合する２つの抗原結合ドメインと、を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項５】
前記第１のエピトープが、配列番号２８１の１１４～１１９、１２４、１２６、１２７、１２９、１３０、１３２、１４０、及び１４２からなる群から選択される、１つ以上のアミノ酸残基を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項６】
前記第２のエピトープが、配列番号２８１の６８～７１、８３～９０、９５、及び９８からなる群から選択される、１つ以上のアミノ酸残基を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７】
ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインが、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項８】
ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＨドメインが、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＬドメインが、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項７に記載の複合体。
【請求項９】
ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインが、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含む

ＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項１０】

ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＨドメインが、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＬドメインが、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の複合体。

【請求項１１】

ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインが、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインと、を含み、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインが、（ｃ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項１２】

ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＨドメインが、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＬドメインが、配列番号５７のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＨドメインが、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する前記抗原結合ドメインの前記ＶＬドメインが、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載の複合体。

【請求項１３】

前記複合体が、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、２つの抗体軽鎖ポリペプチドと、を含み、

前記抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれが、次式を含み、

$VH_1-L_1-VH_2-L_2-CH_1-ヒンジ-CH_2-CH_3$　　［Ｉ］

前記抗体軽鎖ポリペプチドのそれぞれが、次式を含み、

$VL_1-L_3-VL_2-L_4-CL$　　［ＩＩ］

VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、前記抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれが、１つの抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、

式中、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、及びL_4は、アミノ酸リンカーである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項１４】

VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項１３に記載の複合体。

【請求項１５】

VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを

形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項１３に記載の複合体。

【請求項１６】

L_2及びL_4が、０アミノ酸長である、請求項１３～１５のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項１７】

L_1が、０～２０のアミノ酸長である、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項１８】

L_1のアミノ酸の少なくとも９０％が、グリシン及び／またはセリンアミノ酸である、請求項１７に記載の複合体。

【請求項１９】

L_1が、ＧＧＧＧＳＧ（配列番号２７０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、及びＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号２７３）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の複合体。

【請求項２０】

L_3が、ＧＧＳＧＧ（配列番号２７１）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、及びＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１３～１９のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２１】

L_1が、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧ（配列番号２７０）を含み、L_3が、アミノ酸配列ＧＧＳＧＧ（配列番号２７１）を含む、請求項１３～２０のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２２】

L_1及びL_3の両方が、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）を含む、請求項１３～２０のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２３】

L_1が、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号２７３）を含み、L_3が、アミノ酸配列ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）を含む、請求項１３～２０のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２４】

L_1が、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２５】

L_1が、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２７５）またはＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２７７）を含む、請求項２４に記載の複合体。

【請求項２６】

L_3が、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰ（配列番号２７６）またはＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号２７８）を含む、請求項１３～１６及び２４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２７】

L_1が、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２７５）を含み、L_3が、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰ（配列番号２７６）を含む、請求項１３～１６、２４、及び２６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２８】

L_1が、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２７７）を含み、L_3が、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号２７８）を含む、請求項１３～１６、２４、及び２６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項２９】

VH_1が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸

配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項１３～２８のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項３０】

ＶＨ$_2$が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_1$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項１３～２８のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項３１】

ＶＨ$_1$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項１３～２８のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項３２】

ＶＨ$_2$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_1$が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項１３～２８のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項３３】

（ａ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４０のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４１のアミノ酸配列を含むか、

（ｂ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４２のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４３のアミノ酸配列を含むか、

（ｃ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５０のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５１のアミノ酸配列を含むか、

（ｄ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５２のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むか、

（ｅ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５４のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５５のアミノ酸配列を含むか、

（ｆ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５６のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５７のアミノ酸配列を含むか、

（ｇ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５８のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２５９のアミノ酸配列を含むか、

（ｈ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６０のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６１のアミノ酸配列を含むか、

（ｉ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６２のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６３のアミノ酸配列を含むか、

（ｊ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６４のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６５のアミノ酸配列を含むか、または

（ｋ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６６のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２６７のアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の複合体。

【請求項３４】
（ａ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４０のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４１のアミノ酸配列を含むか、または
（ｂ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４２のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４３のアミノ酸配列を含む、請求項３３に記載の複合体。
【請求項３５】
前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４２のアミノ酸配列を含み、前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４３のアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載の複合体。
【請求項３６】
前記複合体が、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、４つの抗体軽鎖ポリペプチドと、を含み、
前記抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれが、次式を含み、
$VH_1-L_1-(CH_1)_x-L_2-VH_2-L_3-(CH_1)_y-ヒンジ-CH_2-CH_3$　［ＩＩＩ］
前記４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つが、次式を含み、
$VL_1-(CL)_x$　［ＩＶ］
前記４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つが、次式を含み、
$VL_2-(CL)_y$　［Ｖ］
前記抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれが、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＶ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと、そしてVH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、式［Ｖ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと会合し、
式中、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、$(CL)_x$及び$(CL)_y$は、抗体軽鎖定常ドメインであり、$(CH_1)_x$及び$(CH_1)_y$は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、及びL_3は、アミノ酸リンカーである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項３７】
前記複合体が、VH_1、VL_1、$(CH_1)_x$、もしくは$(CL)_x$に、VH_1及びVL_1の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換、及び／またはVH_2、VL_2、$(CH_1)_y$、もしくは$(CL)_y$に、VH_2及びVL_2の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項３６に記載の複合体。
【請求項３８】
前記複合体が、次のセットのアミノ酸置換：
（ａ）VH_1にＱ３９Ｋ置換及びVL_1にＱ３８Ｅ置換、ならびにVH_2にＱ３９Ｅ置換及びVL_2にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、
（ｂ）VH_2にＱ３９Ｋ置換及びVL_2にＱ３８Ｅ置換、ならびにVH_1にＱ３９Ｅ置換及びVL_1にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、
（ｃ）$(CH_1)_x$にＳ１８３Ｅ置換及び$(CL)_x$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに$(CH_1)_y$にＳ１８３Ｋ置換及び$(CL)_y$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、または
（ｄ）$(CH_1)_y$にＳ１８３Ｅ置換及び$(CL)_y$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに$(CH_1)_x$にＳ１８３Ｋ置換及び$(CL)_x$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）のうちの１つ以上を含む、請求項３７に記載の複合体。
【請求項３９】
前記複合体が、
（ａ）VH_1にＱ３９Ｋ置換及びVL_1にＱ３８Ｅ置換、ならびにVH_2にＱ３９Ｅ置

換及びVL_2にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、ならびに（CH_1）$_x$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（CH_1）$_y$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、または

（ｂ）VH_2にＱ３９Ｋ置換及びVL_2にＱ３８Ｅ置換、ならびにVH_1にＱ３９Ｅ置換及びVL_1にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、ならびに（CH_1）$_y$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（CH_1）$_x$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）を含む、請求項３８に記載の複合体。

【請求項４０】

VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項３６～３９のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４１】

VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項３６～３９のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４２】

L_2が、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む、請求項３６～４１のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４３】

L_2が、アミノ酸配列ＤＫＴＨＴ（配列番号２６８）またはＤＫＴＨＴＧＧＧＧＳＧＧ（配列番号２６９）を含む、請求項４２に記載の複合体。

【請求項４４】

L_1及びL_3が、０アミノ酸長である、請求項３６～４３のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４５】

VH_1が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項３６～４４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４６】

VH_2が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項３６～４４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４７】

VH_1が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項３６～４４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４８】

VH_2が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項３６～４４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項４９】

（ａ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４４のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４５のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４６のアミノ酸配列を含むか、または

（ｂ）前記抗体重鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４７のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４８のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む前記抗体軽鎖ポリペプチドの両方が、配列番号２４９のアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の複合体。

【請求項５０】

前記複合体が、

次式を含む第１の抗体重鎖ポリペプチドと、

$VH_1-L_1-CH_1-L_2-VH_1-L_3-CH_1-ヒンジ-CH_2-(CH_3)_x$　［ＶＩ］

それぞれが、次式を含む２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと、

VL_1-CL　［ＶＩＩ］

次式を含む第２の抗体重鎖ポリペプチドと、

$VH_2-L_7-CH_1-L_8-VH_2-L_9-CH_1-ヒンジ-CH_2-(CH_3)_y$　［ＶＩＩＩ］

それぞれが、次式を含む２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドと、を含み、

VL_2-CL　［ＩＸ］

前記第１の抗体重鎖ポリペプチドは、それぞれのVH_1がVL_1と共に抗原結合ドメインを形成するように、式［ＶＩＩ］を含む、２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、前記第２の抗体重鎖ポリペプチドは、それぞれのVH_2がVL_2と共に抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む、２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、

式中、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$(CH_3)_x$及び$(CH_3)_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、L_7、L_8、及びL_9は、アミノ酸リンカーである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５１】

$(CH_3)_x$が、突起（ｐｒｏｔｕｂｅｒａｎｃｅ）または空隙（ｃａｖｉｔｙ）を含み、$(CH_3)_y$が、突起または空隙を含み、$(CH_3)_x$の前記突起または空隙が、$(CH_3)_y$の前記突起または空隙内に配置可能である、請求項５０に記載の複合体。

【請求項５２】

（ａ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｙ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｙ４０７Ｔ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、

（ｂ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｗ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｙ４０７Ａ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、

（ｃ）$(CH_3)_x$が、Ｆ４０５Ａ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｗ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、

（ｄ）$(CH_3)_x$が、Ｙ４０７Ｔ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３６６Ｙ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、

（ｅ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、

（ｆ）（ＣＨ$_3$）$_x$が、Ｔ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$が、Ｔ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｇ）（ＣＨ$_3$）$_x$が、Ｆ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$が、Ｔ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、または
（ｈ）（ＣＨ$_3$）$_x$が、Ｆ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$が、Ｔ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）、請求項５１に記載の複合体。

【請求項５３】

ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項５０～５２のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５４】

ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項５０～５２のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５５】

Ｌ$_2$及びＬ$_8$の両方が、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む、請求項５０～５４のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５６】

Ｌ$_2$及びＬ$_8$の両方が、ＤＫＴＨＴ（配列番号２６８）及びＤＫＴＨＴＧＧＧＧＳＧＧ（配列番号２６９）からなる群から選択される同じアミノ酸配列を含む、請求項５５に記載の複合体。

【請求項５７】

Ｌ$_1$、Ｌ$_3$、Ｌ$_7$、及びＬ$_9$が、０アミノ酸長である、請求項５０～５６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５８】

ＶＨ$_1$が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項５０～５７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項５９】

ＶＨ$_2$が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_1$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項５０～５７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項６０】

ＶＨ$_1$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項５０～５７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項６１】

ＶＨ$_2$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号１２９のアミノ

酸配列を含み、VH_1が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項５０～５７のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項６２】
前記複合体が、２つの抗体軽鎖と会合する２つの抗体重鎖と、２つの抗体Ｆａｂ断片と、を含み、
前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、次式を含み
VH_1-CH_1-ヒンジ$-CH_2-CH_3$　　［Ｘ］
前記抗体の前記抗体軽鎖のそれぞれが、次式を含み、
VL_1-CL　　［ＶＩＩ］
前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、
次式を含む重鎖断片と、
VH_2-CH_1　　［ＸＩ］
次式を含む軽鎖と、を含み、
VL_2-CL　　［ＩＸ］
前記抗体重鎖のそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、前記抗体軽鎖のうちの１つと会合し、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む１つの軽鎖断片と会合する式［ＸＩ］を含む１つの重鎖断片を含み、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、リンカーL_1を介して、前記抗体の前記抗体重鎖のうちの１つまたは前記抗体軽鎖のうちの１つと結合し、
VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項６３】
前記L_1リンカーのそれぞれが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、請求項６２に記載の複合体。
【請求項６４】
前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、請求項６３に記載の複合体。
【請求項６５】
前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、請求項６４に記載の複合体。
【請求項６６】
前記L_1リンカーのそれぞれが、前記抗体重鎖のうちの１つまたは前記抗体軽鎖のうちの１つの第１の操作された遊離システインと、前記抗体Ｆａｂ断片のうちの１つの第２の操作された遊離システインとを結合する、請求項６２～６５のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項６７】
前記第１の操作された遊離システインが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記抗体重鎖中のシステインアミノ酸である、請求項６６に記載の複合体。
【請求項６８】
前記第１の操作された遊離システインが、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記抗体軽鎖中のシステインアミノ酸である、請求項６６に記載の複合体。

【請求項６９】
前記第２の操作された遊離システインが、Ｃ末端システイン残基である、請求項６６～６８のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７０】
VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７１】
VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７２】
VH_1が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７３】
VH_2が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７４】
VH_1が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７５】
VH_2が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項６２～６９のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７６】
前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、配列番号２３２のアミノ酸配列を含み、前記抗体の前記抗体軽鎖のそれぞれが、配列番号２３７のアミノ酸配列を含み、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、配列番号２３９のアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、配列番号２３１のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む、請求項６２に記載の複合体。
【請求項７７】
前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、配列番号２３０のアミノ酸配列を含み、前記抗体の前記抗体軽鎖のそれぞれが、配列番号２３６のアミノ酸配列を含み、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、配列番号２３８のアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、前記抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、配列番号２３３のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む、請求項６２

に記載の複合体。
【請求項７８】
前記複合体が、２つの抗体を含み、前記抗体のそれぞれが、
次式を含む第１の抗体重鎖と、
VH_1-CH_1-ヒンジ$-CH_2-(CH_3)_x$ ［Ｘ］
次式を含む第１の抗体軽鎖と、
VL_1-CL ［ＶＩＩ］
次式を含む第２の抗体重鎖と、
VH_2-CH_1-ヒンジ$-CH_2-(CH_3)_y$ ［ＸＩＩ］
次式を含む第２の抗体軽鎖と、を含み、
VL_2-CL ［ＩＸ］
前記第１の抗体重鎖は、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、前記第１の抗体軽鎖と会合し、前記第２の抗体重鎖は、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、前記第２の抗体軽鎖と会合し、前記２つの抗体は、リンカーL_1を介して結合され、
VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$(CH_3)_x$及び$(CH_3)_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項７９】
$(CH_3)_x$が、突起または空隙を含み、$(CH_3)_y$が、突起または空隙を含み、$(CH_3)_x$の前記突起または空隙が、$(CH_3)_y$の前記突起または空隙内に配置可能である、請求項７８に記載の複合体。
【請求項８０】
（ａ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｙ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｙ４０７Ｔ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｂ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｗ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｙ４０７Ａ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｃ）$(CH_3)_x$が、Ｆ４０５Ａ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｗ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｄ）$(CH_3)_x$が、Ｙ４０７Ｔ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３６６Ｙ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｅ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｆ）$(CH_3)_x$が、Ｔ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、
（ｇ）$(CH_3)_x$が、Ｆ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、ｔ$(CH_3)_y$が、Ｔ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含むか（ＥＵインデックスに従う番号付け）、または
（ｈ）$(CH_3)_x$が、Ｆ４０５Ｗ置換を含み、$(CH_3)_y$が、Ｔ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）、請求項７９に記載の複合体。
【請求項８１】
前記複合体が、
２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む第１の抗体であって、前記第１の抗体の前記２つの抗体重鎖のそれぞれが、次式を含み、
VH_1-CH_1-ヒンジ$-CH_2-CH_3$ ［Ｘ］
前記第１の抗体の前記２つの抗体軽鎖のそれぞれが、次式を含む、前記第１の抗体と、
VL_1-CL ［ＶＩＩ］
２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む第２の抗体であって、前記第２の抗体の前記２

つの抗体重鎖のそれぞれが、次式を含み、
VH_2-CH_1-ヒンジ$-CH_2-CH_3$ ［ＸＩＩ］
前記第２の抗体の前記２つの抗体軽鎖のそれぞれが、次式を含む、前記第２の抗体と、を含み、
VL_2-CL ［ＩＸ］
前記第１の抗体の前記抗体重鎖のそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、前記第１の抗体の前記抗体軽鎖のうちの１つと会合し、前記第２の抗体の前記抗体重鎖のそれぞれは、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、前記第２の抗体の前記抗体軽鎖のうちの１つと会合し、前記第１及び前記第２の抗体は、リンカーL_1を介して結合され、
VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである、請求項１～６のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項８２】
前記L_1リンカーが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、請求項７８～８１のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項８３】
前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、請求項８２に記載の複合体。
【請求項８４】
前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、請求項８３に記載の複合体。
【請求項８５】
前記L_1リンカーが、前記２つの抗体のうちの第１の抗体の第１の操作された遊離システインと、前記２つの抗体のうちの第２の抗体の第２の操作された遊離システインとを結合する、請求項７８～８４のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項８６】
前記第１または前記第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記重鎖中のシステイン残基である、請求項８５に記載の複合体。
【請求項８７】
前記第１または前記第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つが、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記軽鎖中のシステイン残基である、請求項８５または請求項８６に記載の複合体。
【請求項８８】
VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項８９】
VH_1及びVL_1が、ＯＸ４０の前記第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が、ＯＸ４０の前記第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。
【請求項９０】
VH_1が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸

配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９１】

ＶＨ$_2$が、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_1$が、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９２】

ＶＨ$_1$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_2$が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９３】

ＶＨ$_2$が、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$が、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_1$が、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$が、配列番号５７のアミノ酸配列を含む、請求項７８～８７のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９４】

前記複合体が、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む、請求項１～９３のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９５】

前記複合体が、

（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、

（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、

（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、

（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、

（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、

（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、

（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、

（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、

（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、

（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、

（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに

（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸位置（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、抗体Ｆｃ領域を含む、請求項９４に記載の複合体。

【請求項９６】

前記複合体が、

（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、

（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、

（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、抗体Ｆｃ領域を含む、請求項９４または請求項９５に記載の複合体。

【請求項９７】
前記複合体が、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む、請求項９４～９６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９８】
前記複合体が、Ｆｃ領域のグリコシル化を排除しないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む、請求項９４～９６のいずれか１項に記載の複合体。

【請求項９９】
請求項１～９８のいずれか１項に記載の複合体の１つ以上のポリペプチドをコードする、１つ以上のポリヌクレオチド。

【請求項１００】
請求項９９に記載の１つ以上のポリヌクレオチドを含む、１つ以上のベクター。

【請求項１０１】
請求項９９に記載の１つ以上のポリヌクレオチドまたは請求項１００に記載の１つ以上のベクターを含む、１つ以上の宿主細胞。

【請求項１０２】
請求項１～９８のいずれか１項に記載の複合体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的製剤。

【請求項１０３】
がんを有する個体を治療する方法であって、前記個体に、有効量の、請求項１～９８のいずれか１項に記載の複合体を投与することを含む、前記方法。

【請求項１０４】
追加の治療薬を前記個体に投与することをさらに含む、請求項１０３に記載の方法。

【請求項１０５】
前記追加の治療薬が化学療法剤を含む、請求項１０４に記載の方法。

【請求項１０６】
前記追加の治療薬がＰＤ－１軸結合アンタゴニストを含む、請求項１０４に記載の方法。

【請求項１０７】

前記がんが、尿路上皮癌（ｕＢＣ）、黒色腫、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、腎癌、または膀胱癌である、請求項１０３～１０６のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年８月５日出願の米国仮出願第６２／３７１，６７１号の優先利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出物の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：１４６３９２０３７７４０ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔ、記録日：２０１７年８月４日、サイズ：３５３ＫＢ）。
【０００３】
本発明は、アゴニスト活性を有する多価及び多重エピトープ（ｍｕｌｔｉｅｐｉｔｏｐｉｃ）抗原結合複合体、ならびにその使用方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
機能性抗体及び抗原結合複合体は、多種多様な疾患の治療のための重要な治療選択肢である。当該技術分野において、機能性抗体及び抗原結合複合体、特にアゴニスト活性を有するものを候補分子のプールから特定するためのよりよい手段が必要とされている。当該技術分野において、より強力なアゴニスト活性を有する抗体及び抗原結合複合体がさらに必要とされている。本発明は、これら及び他の必要性を対象とする。
【０００５】
本明細書に引用される全特許の開示及び科学文献は、参照によりそれらの全体が明白に組み込まれる。
【発明の概要】
【０００６】
本発明は、アゴニスト活性を有する抗原結合複合体（例えば、多価及び多重エピトープ抗体／抗原結合複合体）、ならびにその使用方法を提供する。
【０００７】
一態様では、本明細書において、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が提供され、この複合体は、第１及び第２のサブユニットを含み、この第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、（ｉ）第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む、第１のハーフ抗体（ｈａｌｆ－ａｎｔｉｂｏｄｙ）であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合する、第１のハーフ抗体と、（ｉｉ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む、第２のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、第２のハーフ抗体とを含み、第１及び第２のサブユニットは結合され、複合体は、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体は、インビトロでアゴニスト活性を示す。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、（ｉ）第１のハーフ抗体であって、（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第１の抗体重鎖と、（ｂ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第１の抗体軽鎖とを含む、第１のハーフ抗体と、（ｉ）第２のハーフ抗体であって、（ａ）Ｎ末端

からＣ末端にかけて、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第２の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第２の抗体重鎖と、（ｂ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第２の抗体軽鎖とを含む、第２のハーフ抗体とを含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットは、化学的に結合される。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは同じである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、２つのＣＨ３ドメインを有する２つの抗体Ｆｃ領域を含み、２つのＣＨ３ドメインのそれぞれは、突起または空隙のいずれかを含み、２つのＣＨ３ドメインの第１における突起または空隙は、それぞれ、２つのＣＨ３ドメインの第２における空隙または突起内に配置可能である。いくつかの実施形態では、２つのサブユニットは、リンカーを介して化学的に結合される。いくつかの実施形態では、２つのサブユニットのそれぞれは、２つの重鎖と、２つの軽鎖とを含み、各サブユニットの重鎖のうちの１つは、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から選択される、重鎖中のシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、２つのサブユニットのそれぞれは、２つの重鎖と、２つの軽鎖とを含み、各サブユニットの軽鎖のうちの１つは、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から選択される、軽鎖中のシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、２つのサブユニットは、クリックケミストリーを介して化学的に結合される。いくつかの実施形態では、２つのサブユニットは、テトラジン－トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）クリック反応を介して結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、約１０Å～約１００Å長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのそれぞれは、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のアミノ酸２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ

、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのそれぞれは、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのそれぞれは、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２から選択される。いくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、VL_2は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０００８】

別の態様では、本明細書において、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が提供され、複合体は、（ａ）２つの抗体重鎖であって、各抗体重鎖が第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）を含む、２つの抗体重鎖と、２つの抗体軽鎖であって、各抗体軽鎖が第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む、２つの抗体軽鎖とを含む抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合する抗体と、（ｂ）抗体と結合される２つの抗体Ｆａｂ断片であって、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）と、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）とを含み、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、２つの抗体Ｆａｂ断片とを含み、複合体は、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体は、インビトロでアゴニスト活性を示す。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、各抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含み、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメインを含む重鎖Ｆａ断片を含み、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む軽鎖Ｆａｂ断片を含む。いくつかの実施形態では、２つの抗体Ｆａｂ断片の第１は、２つの抗体軽鎖の第１または２つの抗体重鎖の第１に化学的に結合され、２つの抗体Ｆａｂ断片の第２は、２つの抗体軽鎖の第２または２つの抗体重鎖の第２に化学的に結合される。いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片のそれぞれは、リンカーを介して抗体に化学的に結合される。いくつかの実施形態では、複合体は、（ｉ）抗体の第１の操作された遊離システイン及び２つのＦａｂ断片の第１の操作された遊離システインを接合する第１のリンカーと、（ｉｉ）抗体の第２の操作された遊離システイン及び２つのＦａｂ断片の第２の操作された遊離システインを接合する第２のリンカーとを含む。いくつかの実

施形態では、抗体の２つの抗体重鎖はそれぞれ、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から独立して選択されるシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、抗体の２つの抗体軽鎖はそれぞれ、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付け）から独立して選択されるシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、２つの抗体Ｆａｂ断片はそれぞれ、Ｃ末端システインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、クリックケミストリーを介して２つの抗体Ｆａｂ断片の両方に結合される。いくつかの実施形態では、抗体は、テトラジン－トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）クリック反応を介して２つの抗体Ｆａｂ断片の両方に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、約１０Å～約１００Å長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、２つの抗体Ｆａｂ断片は、抗体と遺伝的に結合され、各抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、複合体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む第１の抗体軽鎖と、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む第２の抗体軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、第１の抗体軽鎖は、抗体重鎖の第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び／または第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメインの修飾との垂直対合（ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ　ｐａｉｒｉｎｇ）のための修飾を含み、第２の抗体軽鎖は、抗体重鎖の第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）及び／または第２の重鎖ＣＨ１ドメインの修飾との垂直対合のための修飾を含む。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは同じである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のアミノ酸２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ

、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０００９】

別の態様では、本明細書において、上記の実施形態のいずれかに従う複合体をコードする核酸が提供される。いくつかの実施形態では、核酸は、第１の抗体重鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、第１の抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、第２の抗体重鎖をコードする第３のポリヌクレオチドと、第２の抗体軽鎖をコードする第４のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、抗体重鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、重鎖Ｆａｂ断片をコードする第３のポリヌクレオチドと、軽鎖Ｆａｂ断片をコードする第４のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む抗体重鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む抗体軽鎖をコードする第３のポリヌクレオチドとを含む。本明細書において、上記の実施形態のいずれかに従う核酸を含むベクターがさらに提供される。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。本明細書において、上記の実施形態のいずれ

かに従うベクター及び／または上記の実施形態のいずれかに従う核酸を含む宿主細胞がさらに提供される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核生物である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核生物である。本明細書において、複合体が産生されるように、上記の実施形態のいずれかに従う宿主細胞を培養することを含む、四価の抗原結合複合体の産生方法がさらに提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、宿主細胞から複合体を回収することをさらに含む。

【００１０】

別の態様では、本明細書において、上記の実施形態のいずれか１つに従う複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物が提供される。

【００１１】

別の態様では、本明細書において、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法が提供され、本方法は、（ａ）（ｉ）第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む第１のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、かつ第１の操作された遊離システインを含む、第１のハーフ抗体と、（ｉｉ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む第２のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する第２のハーフ抗体とを提供することであって、第１及び第２のハーフ抗体のそれぞれが、ＣＨ３ドメインを有する抗体Ｆｃ領域を含み、２つのＣＨ３ドメインのそれぞれが、突起または空隙のいずれかを含み、２つのＣＨ３ドメインの第１の突起または空隙が、それぞれ、２つのＣＨ３ドメインの第２の空隙または突起に配置可能である、提供することと、（ｂ）インビトロで第１及び第２のハーフ抗体を構築して第１のサブユニットを形成することと、（ｃ）（ｉｉｉ）第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む第３のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、かつ第２の操作された遊離システインを含む、第３のハーフ抗体と、（ｉｖ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む第４のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する第４のハーフ抗体と、を提供することであって、第３及び第４のハーフ抗体のそれぞれが、ＣＨ３ドメインを有する抗体Ｆｃ領域を含み、２つのＣＨ３ドメインのそれぞれが、突起または空隙のいずれかを含み、２つのＣＨ３ドメインの第１の突起または空隙が、それぞれ、２つのＣＨ３ドメインの第２の空隙または突起に配置可能である、提供することと、（ｄ）インビトロで第３及び第４のハーフ抗体を構築して第２のサブユニットを形成することと、（ｅ）第１及び第２の操作された遊離システインを使用するリンカーを介して第１及び第２のサブユニットを結合し、それにより、複合体を産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体は、インビトロでアゴニスト活性を示す。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは同じである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、第１及び第２の操作された遊離システインはそれぞれ、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から独立して選択される、重鎖中のシステインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第１及び第２の操作された遊離システインはそれぞれ、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から独立して選択される、軽鎖中のシステインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ステップ（ｅ）は、（１）２つのサブユニットをビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させることと、（２）複合体を精製することと、を含む。いくつかの実施形態では、複合体の精製には、複合体をサイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーにかけることを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサ

ブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のアミノ酸２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットのそれぞれは、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。

【００１２】

別の態様では、本明細書において、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法が提供され、本方法は、（ａ）２つのハーフ抗体を含む抗体を提供することであって、各ハーフ抗体が、第１の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）を含む抗体重鎖及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_1$）を含む抗体軽鎖を含み、抗体が細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、２つのハーフ抗体のそれぞれが、第１の操作された遊離システインを含む、提供することと、（ｂ）２つの抗体Ｆａｂ断片を提供することであって、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、第２の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）を含み、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合し、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、第２の操作された遊離システインを含む、提供することと、（ｃ）リンカーを介して抗体Ｆａｂ断片のうちの１つを２つのハーフ抗体のそれぞれに結合し、それにより、複合体を産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体は、インビトロでアゴニスト活性を示す。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは同じである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、第１の操作された遊離システインは、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ

１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から独立して選択される、重鎖中のシステインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第１の操作された遊離システインは、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から独立して選択される、軽鎖中のシステインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第２の操作された遊離システインは、Ｃ末端システインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）は、（ｉ）２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれをビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させて、２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片を形成することと、（ｉｉ）過剰なビス－マレイミドＰＥＧリンカーを除去することと、（ｉｉｉ）２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片のそれぞれを抗体と反応させて、複合体を形成することと、（ｉｖ）複合体を精製することと、を含む。いくつかの実施形態では、複合体の精製には、複合体をサイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーにかけることを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のアミノ酸２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。

【００１３】

別の態様では、本明細書において、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法が提供され、本方法は、（ａ）

宿主細胞において、２つの抗体重鎖を発現させることであって、各抗体重鎖が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン（$CH1_1$）、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン（$CH1_2$）、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、各VH_1及び／または各$CH1_1$が、垂直対合のための第１の修飾を含み、各VH_2及び／または各$CH1_2$が、垂直対合のための第２の修飾を含み、第１及び第２の修飾が異なる、発現させることと、（ｂ）宿主細胞において、２つの第１の抗体軽鎖を発現させることであって、２つの第１の抗体軽鎖のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（CL_1）を含み、VL_1及び／またはCL_1が、抗体重鎖の第１の修飾との垂直対合のための修飾を含む、発現させることと、（ｃ）宿主細胞において、２つの第２の抗体軽鎖を発現させることであって、２つの第２の抗体軽鎖のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（CL_2）を含み、VL_2及び／またはCL_2が、抗体重鎖の第２の修飾との垂直対合のための修飾を含む、発現させることと、を含み、VH_1及びVL_1は、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、VH_2及びVL_2は、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合し、宿主細胞における発現時に２つの抗体重鎖は会合し、２つの重鎖のそれぞれは、垂直対合を介して第１の抗体軽鎖と結合し、２つの重鎖のそれぞれは、垂直対合を介して第２の抗体軽鎖と結合し、それにより、複合体を産生する。いくつかの実施形態では、抗体重鎖の第１及び第２の修飾のそれぞれは、ＶＨ－Ｑ３９Ｋ、ＶＨ－Ｑ３９Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ、ＣＨ１－Ａ１４１Ｉ、ＣＨ１－Ｆ１７０Ｓ、ＣＨ１－Ｓ１８１Ｍ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ａ、及びＣＨ１－Ｖ１８５Ａ（ＥＵ番号付け）から独立して選択される。いくつかの実施形態では、第１及び第２の抗体軽鎖の修飾のそれぞれは、ＶＬ－Ｑ３８Ｅ、ＶＬ－Ｑ３８Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ、ＣＬ－Ｆ１１６Ａ、ＣＬ－Ｌ１３５Ｖ、ＣＬ－Ｓ１７４Ａ、ＣＬ－Ｓ１７６Ｆ、及びＣＬ－Ｔ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）から独立して選択される。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは同じである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のアミノ酸２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、（ｋ）ヒトＩｇ

Ｇ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む。

【００１４】

上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２からなる群から選択される。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_2は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、VL_2は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_2は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【００１５】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体は、インビトロでアゴニスト活性を示す。

【００１６】

本明細書において、ＯＸ４０に結合し、ＯＸ４０に対して本明細書に記載の１つ以上のアゴニスト活性を有する抗原結合複合体（例えば、四価及び二重エピトープ（ｂｉｅｐｉｔｏｐｉｃ）抗原結合複合体）も提供される。

【００１７】

一態様では、本明細書において、ＯＸ４０に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が提供され、本複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、４つの抗原結合ドメインのそれぞれは、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとを含み、本複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインとを含み、ＯＸ４０の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、ＯＸ４０の結合について、第２

のエピトープに結合する抗原結合ドメインと交差競合しない。

【００１８】

一態様では、本明細書において、ＯＸ４０に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が提供され、本複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、４つの抗原結合ドメインのそれぞれは、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとを含み、本複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインとを含み、第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、ＯＸ４０への結合について、第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインと交差競合しない。いくつかの実施形態では、複合体は、第１のエピトープに結合する２つの抗原結合ドメインと、第２のエピトープに結合する２つの抗原結合ドメインとを含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、第１のエピトープは、配列番号２８１の１１４～１１９、１２４、１２６、１２７、１２９、１３０、１３２、１４０、及び１４２からなる群から選択される、１つ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、第１のエピトープは、配列番号２８１のアミノ酸残基１１４～１１９、１２４、１２６、１２７、１２９、１３０、１３２、１４０、及び１４２を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＨドメインは、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＬドメインは、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第２のエピトープは、配列番号２８１の６８～７１、８３～９０、９５、及び９８からなる群から選択される、１つ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、第２のエピトープは、配列番号２８１のアミノ酸残基６８～７１、８３～９０、９５、及び９８を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＨドメインは、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＬドメインは、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含み、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、（ｃ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインと、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＨドメインは、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＬドメインは、配列番号５７のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメイ

ンのＶＨドメインは、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインのＶＬドメインは、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む。

【００２０】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、２つの抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1－L_1－VH_2－L_2－CH_1－ヒンジ－CH_2－CH_3［Ｉ］を含み、抗体軽鎖ポリペプチドのそれぞれは、VL_1－L_3－VL_2－L_4－ＣＬ［ＩＩ］を含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、１つの抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、及びL_4は、アミノ酸リンカーである。いくつかの実施形態では、VH_1及びVL_1は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、VH_1及びVL_1は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、L_2及びL_4は、０アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、L_1は、０～２０のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、L_1のアミノ酸の少なくとも９０％は、グリシン及び／またはセリンアミノ酸である。いくつかの実施形態では、L_1は、ＧＧＧＧＳＧ（配列番号２７０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、及びＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号２７３）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L_3は、ＧＧＳＧＧ（配列番号２７１）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、及びＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧ（配列番号２７０）を含み、L_3は、アミノ酸配列ＧＧＳＧＧ（配列番号２７１）を含む。いくつかの実施形態では、L_1及びL_3は両方とも、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号２７３）を含み、L_3は、アミノ酸配列ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２７５）またはＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２７７）を含む。いくつかの実施形態では、L_3は、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰ（配列番号２７６）またはＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号２７８）を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２７５）を含み、L_3は、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰ（配列番号２７６）を含む。いくつかの実施形態では、L_1は、アミノ酸配列ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２７７）を含み、L_3は、アミノ酸配列ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号２７８）を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶ

Ｒ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４０のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が列番号２４１のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４２のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４３のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５０のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５１のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５２のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５３のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５４のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５５のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５６のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５７のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５８のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２５９のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６０のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６１のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６２のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６３のアミノ酸配列を含むか、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６４のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６５のアミノ酸配列を含むか、または抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６６のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２６７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４０のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４１のアミノ酸配列を含むか、または抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４２のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４３のアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、重鎖ポリペプチドのＣ末端リジンは、不在であるか、または除去され得る。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４２または２９１のアミノ酸配列を含み、抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４３のアミノ酸配列を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、４つの抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1－L_1－（CH_1）$_x$－L_2－VH_2－L_3－（CH_1）$_y$－ヒンジ－CH_2－CH_3［ＩＩＩ］を含み、４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つは、VL_1－（ＣＬ）$_x$［ＩＶ］を含み、４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つは、VL_2－（ＣＬ）$_y$［Ｖ］を含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、式［Ｉ

Ｖ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと、そしてＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$が抗原結合ドメインを形成するように、式［Ｖ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと会合し、ＶＨ$_1$は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、ＶＨ$_2$は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、ＶＬ$_1$は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＶＬ$_2$は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、（ＣＬ）$_x$及び（ＣＬ）$_y$は、抗体軽鎖定常ドメインであり、（ＣＨ$_1$）$_x$及び（ＣＨ$_1$）$_y$は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、ＣＨ$_2$は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、ＣＨ$_3$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、及びＬ$_3$は、アミノ酸リンカーである。いくつかの実施形態では、複合体は、ＶＨ$_1$、ＶＬ$_1$、（ＣＨ$_1$）$_x$、もしくは（ＣＬ）$_x$に、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換、及び／またはＶＨ$_2$、ＶＬ$_2$、（ＣＨ$_1$）$_y$、もしくは（ＣＬ）$_y$に、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、次のアミノ酸置換対：ＶＨ$_1$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｅ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、ＶＨ$_2$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｅ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、ＶＨ$_1$にＱ３９Ｅ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、ＶＨ$_2$にＱ３９Ｅ及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）、（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｋ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｋ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、ならびに（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、次のセットのアミノ酸置換：ＶＨ$_1$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｅ置換、ならびにＶＨ$_2$にＱ３９Ｅ置換及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）；ＶＨ$_2$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｅ置換、ならびにＶＨ$_1$にＱ３９Ｅ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）；（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）；または（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）、のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、ＶＨ$_1$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｅ置換、ならびにＶＨ$_2$にＱ３９Ｅ置換及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）；ならびに（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）；またはＶＨ$_2$にＱ３９Ｋ置換及びＶＬ$_2$にＱ３８Ｅ置換、ならびにＶＨ$_1$にＱ３９Ｅ置換及びＶＬ$_1$にＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔに従う番号付け）；及び／または（ＣＨ$_1$）$_y$にＳ１８３Ｅ置換及び（ＣＬ）$_y$にＶ１３３Ｋ置換、ならびに（ＣＨ$_1$）$_x$にＳ１８３Ｋ置換及び（ＣＬ）$_x$にＶ１３３Ｅ置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、Ｌ$_2$は、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｌ$_2$は、アミノ酸配列ＤＫＴＨＴ（配列番号２６８）またはＤＫＴＨＴＧＧＧＧＳＧＧ（配列番号２６９）を含む。いくつかの実施形態では、Ｌ$_1$及びＬ$_3$は、０アミノ酸長である。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミ

ノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４４または２９２のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４５のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４６のアミノ酸配列を含むか、または抗体重鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４７または２９３のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチの両方が配列番号２４８のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方が配列番号２４９のアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、重鎖ポリペプチドのＣ末端リジンは、不在であるか、または除去され得る。

【００２２】

いくつかの実施形態では、複合体は、VH_1－L_1－CH_1－L_2－VH_1－L_3－CH_1－ヒンジ－CH_2－$(CH_3)_x$［ＶＩ］を含む第１の抗体重鎖ポリペプチドと、それぞれが、VL_1－ＣＬ［ＶＩＩ］を含む、２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと、VH_2－L_7－CH_1－L_8－VH_2－L_9－CH_1－ヒンジ－CH_2－$(CH_3)_y$［ＶＩＩ］を含む第２の抗体重鎖ポリペプチドと、それぞれが、VL_2－ＣＬ［ＩＸ］を含む、２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、第１の抗体重鎖ポリペプチドは、各VH_1がVL_1と抗原結合ドメインを形成するように、式［ＶＩＩ］を含む２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、第２の抗体重鎖ポリペプチドは、各VH_2がVL_2と抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$(CH_3)_x$及び$(CH_3)_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、L_7、L_8、及びL_9は、アミノ酸リンカーである。いくつかの実施形態では、$(CH_3)_x$は、突起または空隙を含み、$(CH_3)_y$は、突起または空隙を含み、$(CH_3)_x$の突起または空隙は、$(CH_3)_y$の突起または空隙内に配置可能である。いくつかの実施形態では、$(CH_3)_x$はＴ３６６Ｙ置換を含み、$(CH_3)_y$はＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、$(CH_3)_x$

はＴ３６６Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｗ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＹ４０７Ｔ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｙ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＦ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｙ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｗ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＹ４０７Ｔ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｙ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、または（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、Ｌ$_2$及びＬ$_8$は両方とも、ヒト抗体定常ドメイン配列内に見られるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｌ$_2$及びＬ$_8$は両方とも、ＤＫＴＨＴ（配列番号２６８）及びＤＫＴＨＴＧＧＧＧＳＧＧ（配列番号２６９）からなる群から選択される同じアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｌ$_1$、Ｌ$_3$、Ｌ$_7$、及びＬ$_9$は、０アミノ酸長である。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_2$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_1$は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号１２８のア

ミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体軽鎖と会合する２つの抗体重鎖と、２つの抗体Ｆａｂ断片とを含む抗体を含み、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、VH_1－CH_1－ヒンジ－CH_2－CH_3［Ｘ］を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、VL_1－ＣＬ［ＶＩＩ］を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、VH_2－CH_1［ＸＩ］を含む重鎖断片と、VL_2－ＣＬ［ＩＸ］を含む軽鎖とを含み、抗体重鎖のそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、抗体軽鎖のうちの１つと会合し、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む１つの軽鎖断片と会合する式［ＸＩ］を含む１つの重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、リンカーL_1を介して、抗体の抗体重鎖のうちの１つまたは抗体軽鎖のうちの１つと結合され、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。いくつかの実施形態では、L_1リンカーのそれぞれは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、L_1リンカーのそれぞれは、抗体重鎖のうちの１つまたは抗体軽鎖のうちの１つの第１の操作された遊離システインと、抗体Ｆａｂ断片のうちの１つの第２の操作された遊離システインとを結合する。いくつかの実施形態では、第１の操作された遊離システインは、抗体重鎖において、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第１の操作された遊離システインは、抗体軽鎖において、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システインアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第２の操作された遊離システインは、Ｃ末端システイン残基である。いくつかの実施形態では、VH_1及びVL_1は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、VH_1及びVL_1は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６また

は２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、配列番号２３２のアミノ酸配列を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、配列番号２３７のアミノ酸配列を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３９のアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３１のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、配列番号２３０または２９４のアミノ酸配列を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、配列番号２３６のアミノ酸配列を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３８のアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３３のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、重鎖ポリペプチドのＣ末端リジンは、不在であるか、または除去され得る。

【００２４】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体を含み、抗体のそれぞれは、VH_1－CH_1－ヒンジ－CH_2－（CH_3）$_x$［Ｘ］を含む第１の抗体重鎖と、VL_1－ＣＬ［ＶＩＩ］を含む第１の抗体軽鎖と、VH_2－CH_1－ヒンジ－CH_2－（CH_3）$_y$［ＸＩＩ］を含む第２の抗体重鎖と、VL_2－ＣＬ［ＩＸ］を含む第２の抗体軽鎖とを含み、第１の抗体重鎖は、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、第１の抗体軽鎖と会合し、第２の抗体重鎖は、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、第２の抗体軽鎖と会合し、２つの抗体は、リンカーL_1を介して結合され、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、（CH_3）$_x$及び（CH_3）$_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。いくつかの実施形態では、（CH_3）$_x$は、突起または空隙を含み、（CH_3）$_y$は、突起または空隙を含み、（CH_3）$_x$の突起または空隙は、（CH_3）$_y$の突起または空隙内に配置可能である。いくつかの実施形態では、（CH_3）$_x$はＴ３６６Ｙ置換を含み、（CH_3）$_y$はＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（CH_3）$_x$はＴ３６６Ｗ置換を含み、（CH_3）$_y$はＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（CH_3）$_x$はＦ４０５Ａ置換を含み、（CH_3）$_y$はＴ３９４Ｗ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（CH_3）$_x$はＹ４０７Ｔ置換を含み、（CH_3）$_y$はＴ３６６Ｙ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（CH_3）$_x$はＴ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、（CH_3）$_y$はＴ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ

置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＦ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_x$はＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｙ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｗ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＹ４０７Ｔ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｙ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｙ及びＦ４０５Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｗ及びＹ４０７Ｔ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＴ３６６Ｗ及びＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｓ及びＹ４０７Ａ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ｗ及びＹ４０７Ａ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３６６Ｗ及びＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）か、または（ＣＨ$_3$）$_y$はＦ４０５Ｗ置換を含み、（ＣＨ$_3$）$_x$はＴ３９４Ｓ置換を含む（ＥＵインデックスに従う番号付け）。いくつかの実施形態では、Ｌ$_1$は、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、Ｌ$_1$リンカーは、２つの抗体のうちの第１の第１の操作された遊離システインと、２つの抗体のうちの第２の第２の操作された遊離システインとを結合する。いくつかの実施形態では、第１または第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つは、重鎖において、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システイン残基である。いくつかの実施形態では、第１または第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つは、軽鎖において、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システイン残基である。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_2$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_1$は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含む

ＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_1$は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、$ＶＨ_2$は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_2$は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_2$は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_2$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、$ＶＨ_1$は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、$ＶＨ_1$、$ＶＨ_2$、$ＶＬ_1$、及び／または$ＶＬ_2$は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【００２５】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む、第１の抗体であって、第１の抗体の２つの抗体重鎖のそれぞれが、$ＶＨ_1$－$ＣＨ_1$－ヒンジ－$ＣＨ_2$－$ＣＨ_3$［Ｘ］を含み、第１の抗体の２つの抗体軽鎖のそれぞれが、$ＶＬ_1$－ＣＬ［ＶＩＩ］を含む、第１の抗体と、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む、第２の抗体であって、第２の抗体の２つの抗体重鎖のそれぞれが、$ＶＨ_2$－$ＣＨ_1$－ヒンジ－$ＣＨ_2$－$ＣＨ_3$［ＸＩＩ］を含み、第２の抗体の２つの抗体軽鎖のそれぞれが、$ＶＬ_2$－ＣＬ［ＩＸ］を含む、第２の抗体とを含み、第１の抗体の抗体重鎖のそれぞれは、$ＶＨ_1$及び$ＶＬ_1$が抗原結合ドメインを形成するように、第１の抗体の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、第２の抗体の抗体重鎖のそれぞれは、$ＶＨ_2$及び$ＶＬ_2$が抗原結合ドメインを形成するように、第２の抗体の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、第１及び第２の抗体は、リンカー$Ｌ_1$を介して結合され、$ＶＨ_1$は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、$ＶＨ_2$は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、$ＶＬ_1$は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、$ＶＬ_2$は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、$ＣＨ_1$は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、$ＣＨ_2$は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$ＣＨ_3$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。いくつかの実施形態では、$Ｌ_1$は、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、$Ｌ_1$リンカーは、２つの抗体のうちの第１の第１の操作された遊離システインと、２つの抗体のうちの第２の第２の操作された遊離システインとを結合する。いくつかの実施形態では、第１または第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つは、重鎖において、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システイン残基である。いくつかの実施形態では、第１または第２の操作された遊離システインのうちの少なくとも１つは、軽鎖において、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、システイン残基である。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_1$及び$ＶＬ_1$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、$ＶＨ_2$及び$ＶＬ_2$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_1$及び$ＶＬ_1$は、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成し、$ＶＨ_2$及び$ＶＬ_2$は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインを形成する。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、$ＶＨ_1$は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶ

Ｒ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９または２８８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０または２８９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２または２８２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４または２８３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６または２８６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８または２９０のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６、２８４、または２８５のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７または２８７のアミノ酸配列を含む。上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【００２６】

上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。

【００２７】

上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、複合体は、配列番号２７９及び２９５～２９７からなる群から選択される配列を含むＣＬドメインのうちの１つ以上を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、複合体は、配列

番号２９８～３０３からなる群から選択される配列を含むＣＨ$_1$－ヒンジ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$領域のうちの１つ以上を含む。上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、本明細書に記載の複合体のいずれかにおいて、ＣＬ、ＣＨ$_1$、ヒンジ、ＣＨ$_2$、またはＣＨ$_3$ドメインのうちの１つ以上は、１つ以上のアミノ酸置換を含み得る。

【００２８】

上記の実施形態のいずれかのうちのいくつかの実施形態では、複合体は、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、

（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２９７、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸位置（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、抗体Ｆｃ領域を含む。

【００２９】

いくつかの実施形態では、複合体は、

（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、抗体Ｆｃ領域を含む。

【００３０】

いくつかの実施形態では、複合体は、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、Ｆｃ領域のグリコシル化を排除しないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、抗体Ｆｃ領域を含む。

【００３１】

本明細書において、上記の実施形態のいずれかの複合体の１つ以上のポリペプチドをコ

ードする１つ以上のポリヌクレオチドがさらに提供される。本明細書において、上記の実施形態のいずれかの１つ以上のポリヌクレオチドを含む、１つ以上のベクターがさらに提供される。本明細書において、上記の実施形態のいずれかの１つ以上のポリヌクレオチドまたは上記の実施形態のいずれかの１つ以上のベクターを含む、１つ以上の宿主細胞がさらに提供される。本明細書において、上記の実施形態のいずれかの複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤がさらに提供される。

【００３２】

本明細書において、個体に、有効量の、上記の実施形態のいずれかの複合体を投与することを含む、がんを有する個体を治療する方法がさらに提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、追加の治療薬を個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、化学療法剤を含む。いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、ＰＤ－１軸結合アンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、がんは、上皮性卵巣癌、卵管癌、原発性腹膜癌、扁平上皮細胞癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（ｇａｓｔｒｉｃまたはｓｔｏｍａｃｈ）（胃腸癌を含む）、膵癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌（白金感受性及び白金抵抗性卵巣癌を含む）、肝癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、卵管、腹膜、子宮内膜または子宮の癌腫、唾液腺癌腫、腎臓（ｋｉｄｎｅｙまたはｒｅｎａｌ）癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、及び様々な型の頭頸部癌、ならびにＢ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）；小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ；中悪性度／濾胞性ＮＨＬ；中悪性度びまん性ＮＨＬ；高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ；高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ；高悪性度小非切れ込み型細胞ＮＨＬ；巨大病変ＮＨＬ；マントル細胞リンパ腫；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；及びワルデンストレームのマクログロブリン血症を含む）；慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）；急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）；有毛細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、または母斑症、浮腫（脳腫瘍と関連付けられるもの等）、及びメーグス症候群と関連付けられる異常血管増殖（それらのがんの転移形態を含む）である。いくつかの実施形態では、がんは、尿路上皮癌（ｕＢＣ）、黒色腫、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、腎癌、または膀胱癌である。

【００３３】

本明細書に記載の様々な実施形態の特性のうちの１つ、いくつか、または全てが組み合わされて、本発明の他の実施形態を形成することができることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者には明らかになるだろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の発明を実施するための形態によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【００３４】

【図１】二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８抗ＯＸ４０抗体が、標的抗原の存在下で、単一エピトープ抗体と比べて高次複合体を促進することができることを示す、分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ａＳＥＣ）のクロマトグラムを示す。

【図２】本明細書に記載の新規抗体形式を構築するために使用することができる抗体の要素を図示する。

【図３Ａ】本開示の例示的な抗体形式を示す。２つの完全長ＩｇＧが結合される（例えば、化学的に結合される）結合ＩｇＧ－ＩｇＧ（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）、２つのＦａｂが完全長ＩｇＧに結合される（例えば、化学的に結合される）結合Ｆａｂ－ＩｇＧ（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）、余分なＦａｂアームのセットが組換えによりＩｇＧに融合される組換えＦａｂ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）、及び余分なＦｖ領域のセットが組換えによりＩｇＧに融合される組換えＦｖ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ）の模式図が提供される。４つ全ての可変領域が標的抗原上の同じエピトープに結合する単一エピトープバージョン（上段）、及び２つの可変領域が一方のエピトープに結合し、他方の可変領域が標的抗原上の異なるエピトープに結合する二重エピトープバージョン（下段）が、各形式について図示される。抗体間または抗体とＦａｂ断片との間の線は、リンカーを表し、星は、リンカーが

化学的に結合される結合点（例えば、抗体またはＦａｂ断片の操作されたシステイン）を表す。
【図３Ｂ】本開示の例示的な抗体形式を示す。２つの完全長ＩｇＧが結合される（例えば、化学的に結合される）結合ＩｇＧ－ＩｇＧ（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）、２つのＦａｂが完全長ＩｇＧに結合される（例えば、化学的に結合される）結合Ｆａｂ－ＩｇＧ（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）、余分なＦａｂアームのセットが組換えによりＩｇＧに融合される組換えＦａｂ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）、及び余分なＦｖ領域のセットが組換えによりＩｇＧに融合される組換えＦｖ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ）の模式図が提供される。４つ全ての可変領域が標的抗原上の同じエピトープに結合する単一エピトープバージョン（上段）、及び２つの可変領域が一方のエピトープに結合し、他方の可変領域が標的抗原上の異なるエピトープに結合する二重エピトープバージョン（下段）が、各形式について図示される。抗体間または抗体とＦａｂ断片との間の線は、リンカーを表し、星は、リンカーが化学的に結合される結合点（例えば、抗体またはＦａｂ断片の操作されたシステイン）を表す。
【図４】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式の第１のバージョンを示す。
【図５】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式の第２のバージョンを示す。
【図６】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式を示す。
【図７】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式を示す。
【図８】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式の第１のバージョンを示す。
【図９】いくつかの実施形態に従う、二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式の第２のバージョンを示す。
【図１０】抗ＣＤ３抗体及びＣＤ８０＋ＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０または対照抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。全ての群は抗ＣＤ３を含んだ。結合ＩｇＧは、単一エピトープ１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）－ＢＭ（ＰＥＧ）２－１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）及び二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）－ＢＭ（ＰＥＧ）３－１Ａ７／３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）を含む。
【図１１】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０または対照抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。結合ＩｇＧは、単一エピトープ１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）－ＢＭ（ＰＥＧ）３－１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）、単一エピトープ３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）－ＢＭ（ＰＥＧ）３－３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）、及び二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）－ＢＭ（ＰＥＧ）３－１Ａ７／３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）を含む。このアッセイにおけるＬ細胞は、ＦｃγＲＩＩ$^{+}$であるが、ＣＤ８０を欠く。４つの対照は、Ｌ細胞、Ｌ細胞＋抗ＣＤ３、Ｌ細胞＋Ｔ細胞、及びＬ細胞＋Ｔ細胞＋抗ＣＤ３である。試験した全ての抗体は、記載（”－αＣＤ３）のない限り、抗ＣＤ３を含んだ。
【図１２】結合Ｆａｂ－ＩｇＧである１Ａ７／３Ｃ８及び１Ａ７（Ｎ２９７Ｇ）／３Ｃ８のＳＥＣ－ＭＡＬＳデータを示す。
【図１３】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０または対照抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。このアッセイにおけるＬ細胞は、ＦｃγＲＩＩ$^{+}$であるが、ＣＤ８０を欠く。４つの対照は、Ｌ細胞、Ｌ細胞＋抗ＣＤ３、Ｌ細胞＋Ｔ細胞、及びＬ細胞＋Ｔ細胞＋抗ＣＤ３である。試験した全ての抗体は、抗ＣＤ３を含んだ。結合Ｆａｂ－ＩｇＧ形式は、ＢＭ（ＰＥＧ）３リンカーを介して１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｋ１４９Ｃ）と結合された、２つの３Ｃ８　Ｆａｂである。

【図１４】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０または対照抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。このアッセイにおけるＬ細胞は、ＦｃγＲＩＩ$^{+}$であるが、ＣＤ８０を欠く。４つの対照は、Ｌ細胞、Ｌ細胞＋抗ＣＤ３、Ｌ細胞＋Ｔ細胞、及びＬ細胞＋Ｔ細胞＋抗ＣＤ３である。試験した全ての抗体は、抗ＣＤ３を含んだ。結合Ｆａｂ－ＩｇＧ形式は、ＢＭ（ＰＥＧ）３リンカーを介して１Ａ７＿ｈＩｇＧ１（Ｋ１４９Ｃ／Ｎ２９７Ｇ）と結合された、２つの３Ｃ８　Ｆａｂである。

【図１５】ルシフェラーゼレポーターを有するＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞を使用した、抗ＯＸ４０天然（１Ａ７）及び組換えＦｖ－ＩｇＧ単一エピトープ（１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８）、ならびに二重エピトープ（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）抗体のアゴニスト活性を示す。

【図１６】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０天然（１Ａ７）またはｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。このアッセイにおけるＬ細胞は、ＦｃγＲＩＩ$^{+}$であるが、ＣＤ８０を欠く。４つの対照は、Ｌ細胞、Ｌ細胞＋抗ＣＤ３、Ｌ細胞＋Ｔ細胞、及びＬ細胞＋Ｔ細胞＋抗ＣＤ３である。試験した全ての抗体は、抗ＣＤ３を含んだ。

【図１７】標識されるように、天然ＩｇＧ１抗体と比較したｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７抗ＯＸ４０抗体のＳＥＣ－ＭＡＬＳデータを示す。

【図１８】標識されるように、天然ＩｇＧ１抗体と比較したｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８抗ＯＸ４０抗体のＳＥＣ－ＭＡＬＳデータを示す。

【図１９】ルシフェラーゼレポーターを有するＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞を使用した、抗ＯＸ４０天然組換えＦａｂ－ＩｇＧ単一エピトープ（１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８）、及び二重エピトープ（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）抗体のアゴニスト活性を示す。

【図２０】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０天然（１Ａ７）またはｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。Ｔ細胞増殖は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって監視された。このアッセイにおけるＬ細胞は、ＦｃγＲＩＩ$^{+}$であるが、ＣＤ８０を欠く。４つの対照は、Ｌ細胞、Ｌ細胞＋抗ＣＤ３、Ｌ細胞＋Ｔ細胞、及びＬ細胞＋Ｔ細胞＋抗ＣＤ３である。試験した全ての抗体は、抗ＣＤ３を含んだ。

【図２１】抗ＣＤ３抗体及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞の存在下での、抗ＯＸ４０抗体によるＣＤ４＋メモリーＴ細胞増殖の共刺激を示す。左側のグラフは、ＩｇＧ１バージョンの結果を示すが、右側のグラフは、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧのＩｇＧ１　ＬＡＬＡＰＧバージョンの結果を示す。含まれるｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、３Ｃ８－１Ａ７、１Ａ７－３Ｃ８、３Ｃ８－３Ｃ８、及び１Ａ７－１Ａ７であった。ＩｇＧ１　１Ａ７は、図の左側及び右側両方のパネルの１Ａ７抗体のヒトＩｇＧ１バージョンを指す。

【図２２】ＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける、抗ＯＸ４０対照、ならびにｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体のアゴニスト活性を示す。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ（左側のパネル）及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ（右側のパネル）は、両方の二重エピトープ（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）形式ならびに単一エピトープ１Ａ７－１Ａ７形式を含む。二価のＩｇＧ１対照は、１Ａ７、３Ｃ８、及び二価の二重エピトープ抗体１Ａ７／３Ｃ８を含む。全ての重鎖定常領域は、これらのアッセイにおいて、ヒトＩｇＧ１であった。

【図２３】ＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける、抗ＯＸ４０対照、ならびにｃＩｇＧ－ＩｇＧ及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体のアゴニスト活性を示す。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ（左側のパネル）及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ（右側のパネル）は、両方の二重エピトープ形式（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ　１Ａ７／３Ｃ８－１Ａ７／３Ｃ８及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８）ならびに単一エピトープ１Ａ７－１Ａ７形

式を含む。二価のＩｇＧ１対照は、１Ａ７、３Ｃ８、及び二価の二重エピトープ抗体１Ａ７／３Ｃ８を含む。全ての重鎖定常領域は、これらのアッセイにおいて、ヒトＩｇＧ１であった。

【図２４】ＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける、対照及び四価の二重エピトープ抗ＯＸ４０抗体のアゴニスト活性を示す。全ての重鎖定常領域は、これらのアッセイにおいて、ヒトＩｇＧ１であった。

【図２５】単独（実線）及び標的ＯＸ４０との複合（破線）での、二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８（黒色）及び単一エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７（灰色）のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）のクロマトグラムを示す。より初期の溶出時間は、より大きいタンパク質サイズに比例する。

【図２６】ＳＥＣカラム溶出時の多角度光散乱（ＭＡＬＳ）データの結果を示す。Ｙ軸は、抗体／ＯＸ４０複合体のサイズ（ＫＤａ）を反映する。単一エピトープ形式は灰色の棒として示され、二重エピトープ形式は塗りつぶされていない白色棒として示される。

【図２７】Ｃ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウスにおける抗ＯＸ４０　ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体形式の薬物動態（ＰＫ）を示す。ＩｇＧ１　１Ａ７及びＩｇＧ１抗ｇＤは、対照として含めた。

【図２８】Ｃ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウスにおける抗ＯＸ４０ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体形式のＰＫを示す。ＩｇＧ１　１Ａ７及びＩｇＧ１抗ｇＤは、対照として含めた。

【図２９】Ｃ５７ＢＬ－６マウスにおける抗ＯＸ４０　ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、及びｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体形式のＰＫを示す。ＩｇＧ１　１Ａ７は、対照として含めた。

【図３０】ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８を１Ａ７及び３Ｃ８のＩｇＧ１バージョンと比較する、ヒトＯＸ４０ノックイン（ｈＯＸ４０ｋｉ）マウスにおけるＫＬＨ免疫化ＰＤ実験の結果を示す。左側のパネルは検出された抗ＫＬＨ　ＩｇＧのレベルを示し、右側のパネルはＣＤ４　Ｔ細胞の拡張パーセントを示す。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧをＩｇＧ１　１Ａ７と比較するｐ値を示す。

【図３１】ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８を１Ａ７及び３Ｃ８のＩｇＧ１バージョンと比較する、ｈＯＸ４０ｋｉマウスにおけるＫＬＨ免疫化ＰＤ実験の結果を示す。左側のパネルはＣＤ８＋Ｔ細胞の総数を示し、右側のパネルは所属リンパ節における細胞の総数を示す。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧをＩｇＧ１　１Ａ７と比較するｐ値を示す。

【図３２】ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８を１Ａ７及び３Ｃ８のＩｇＧ１バージョンと比較する、ｈＯＸ４０ｋｉマウスにおけるＫＬＨ免疫化ＰＤ実験の結果を示す。グラフは、ＫＬＨでの精製ＣＤ４＋Ｔ細胞のエクスビボ再刺激後のインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）の放出を示す。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧをＩｇＧ１　１Ａ７と比較するｐ値を示す。

【図３３】１Ａ７及び３Ｃ８のＩｇＧ１バージョンと共に抗ＯＸ４０二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体形式を比較する、ｈＯＸ４０ｋｉマウスにおけるＫＬＨ免疫化ＰＤ実験の結果を示す。左側のパネルはＣＤ４　Ｔ細胞の総数を示し、右側のパネルは所属リンパ節におけるＣＤ８　Ｔ細胞の総数を示す。示されるように、四価の二重エピトープ形式を、ＩｇＧ１　３Ｃ８（「ｖｓ　３Ｃ８」）、ＩｇＧ１　１Ａ７（「ｖｓ　１Ａ７」）、及び対照ＩｇＧ１抗ｇＤ（「ｖｓ　ｃｔｌ」）と比較する、３つのｐ値を示す。星印の数は以下のｐ値を表す：＊＜０．０５、＊＊＜０．００５、＊＊＊＜０．０００５、＊＜０．０００５。

【図３４】雌ｈＯＸ４０ｋｉ　Ｃ５７ＢＬ／６マウスの同系Ｅ．Ｇ７－ＯＶＡ（ＥＬ４発現ニワトリオボアルブミン（ＯＶＡ））リンパ腫の腫瘍モデルにおける抗体の抗腫瘍活性を示す。試験物質は、四価の二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７、ＩｇＧ１　１Ａ７、及びアイソタイプ対照ＩｇＧ１抗ｇＤを含んだ。

【図３５】ＯＸ４０及び１Ａ７及び３Ｃ８　Ｆａｂの間の三元複合体の結晶構造を示す。Ｎ連結グリコシル化は、ＯＸ４０受容体の１６０位で明らかにされる。

【図３６】三元複合体構造に基づいて１Ａ７（灰色のボックス）及び３Ｃ８（黒色の外枠

のボックス）の結合エピトープを明らかにする、ヒトＯＸ４０の配列を示す。配列番号２８１の残基２９～２１４が示される。
【図３７】ＯＸ４０＋Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて試験したＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体のアゴニスト活性を示す。全ての重鎖定常領域は、これらのアッセイにおいて、ヒトＩｇＧ１であった。
【図３８】一次ヒトＴ細胞アッセイ（左側のパネル）及びＯＸ４０＋Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイ（右側のパネル）の両方における、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの操作されたリンカー変異型及び１Ａ７ヒトＩｇＧ１（１Ａ７）対照抗体のＯＸ４０アゴニスト活性を示す。一次細胞アッセイは、ＣＤ４＋メモリーＴ細胞、抗ＣＤ３抗体、及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞を含んだ。ＧＳ（長い）、ＧＳ（中間）、ＧＳ（短い）、Ｅｌｂｏｗ（長い）、及びＥｌｂｏｗ（短い）は、実施例１６に記載されるように、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７のリンカー変異型を指す。
【図３９】ＩｇＧ１及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式の高親和性及び低親和性変異型バージョンの親和性プロットを示す。Ｈは、高い（より低いＫＤ、より強い親和性）変異型に対応し、Ｌは、低い（より高いＫＤ、より弱い親和性）変異型に対応する。括弧は、３Ｃ８　Ｆｖ及び／または１Ａ７　Ｆｖの親和性が増加したか、または低減したかを示す。例えば、３Ｃ８（Ｈ）／１Ａ７（Ｌ）は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７親と比べて、３Ｃ８　Ｆｖがより強い親和性（Ｎ３１Ｉ／Ｋ６４Ｌ変異型）を有し、１Ａ７　Ｆｖがより弱い親和性（Ｐ９６Ａ変異型）を有するｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７に対応する。
【図４０】一次ヒトＴ細胞アッセイ（左側のパネル）及びＯＸ４０＋Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイ（右側のパネル）の両方における、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの操作された親和性変異型、ならびに１Ａ７ヒトＩｇＧ１（１Ａ７）及び３Ｃ８ヒトＩｇＧ１（３Ｃ８）対照抗体のＯＸ４０アゴニスト活性を示す。一次細胞アッセイは、ＣＤ４＋メモリーＴ細胞、抗ＣＤ３抗体、及びＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞を含んだ。高は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７親と比べて、より強い親和性（より低いＫＤ）変異型に対応し、低は、より弱い親和性（より高いＫＤ）変異型に対応する。括弧は、３Ｃ８　Ｆｖ及び／または１Ａ７　Ｆｖの親和性が増加したか、または低減したかを示す。例えば、３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７親と比べて、３Ｃ８　Ｆｖがより強い親和性（Ｎ３１Ｉ／Ｋ６４Ｌ変異型）を有し、１Ａ７　Ｆｖがより弱い親和性（Ｐ９６Ａ変異型）を有するｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７に対応する。
【図４１】ＨＴ－２９細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンのカスパーゼ８活性を示す。抗体は５０ｎＭ濃度で試験した。ドロジツマブは、Ｄｒｏｚと省略される。ＩｇＧ１抗体は、ドロジツマブ、１３Ｅ３、３Ｈ３、４Ｄ９、及び１１Ｈ１２を含む。二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９、ＩｇＧ１　１３Ｅ３－３Ｈ３、及びＩｇＧ１　１１Ｈ１２－４Ｄ９を含む。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－Ｄｒｏｚ、ならびに四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１３Ｅ３－３Ｈ３、及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１１Ｈ１２－４Ｄ９を含む。
【図４２】ＨＴ－２９細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンの用量応答カスパーゼ８活性を示す。ドロジツマブは、Ｄｒｏｚと省略される。ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ及びＩｇＧ１　４Ｄ９を含む。二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－Ｄｒｏｚ、ならびに四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。
【図４３】ＨＴ－２９細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンの用量応答抗増殖活性を示す。ドロジツマブは、Ｄｒｏｚと省略される。ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ及びＩｇＧ１　４Ｄ９を含む。二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含

む。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－Ｄｒｏｚ、ならびに四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。

【図４４】Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンの用量応答カスパーゼ８活性を示す。ドロジツマブは、Ｄｒｏｚと省略される。ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ及びＩｇＧ１　４Ｄ９を含む。二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－Ｄｒｏｚ、ならびに四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。

【図４５】Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンの用量応答抗増殖活性を示す。ドロジツマブは、Ｄｒｏｚと省略される。ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ及びＩｇＧ１　４Ｄ９を含む。二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ１　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－Ｄｒｏｚ、ならびに四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｄｒｏｚ－４Ｄ９を含む。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

Ｉ．定義

「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、本明細書において、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すように交換可能に使用される。ポリマーは、直鎖状であっても分岐状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。これらの用語はまた、天然にまたは介入によって、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識構成成分もしくは毒素とのコンジュゲーション等によって修飾されているアミノ酸ポリマーを包含する。例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の１つ以上の類似体を含有するポリペプチド、及び当該技術分野で既知の他の修飾もこの定義に含まれる。本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、抗体を具体的に包含する。

【００３６】

本明細書の「抗体」という用語は、最も広義に使用され、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。「免疫グロブリン」（Ｉｇ）という用語は、本明細書において、抗体と交換可能に使用される。

【００３７】

抗体は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子であり、それらの構造は全て免疫グロブリン折り畳みに基づく。例えば、ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合して機能的抗体を形成する２つの「重」鎖及び２つの「軽」鎖を有する。各重鎖及び軽鎖はそれ自体、「定常」（Ｃ）領域及び「可変」（Ｖ）領域を含む。Ｖ領域が抗体の抗原結合特異性を決定する一方で、Ｃ領域は、構造的支持を提供し、免疫エフェクターとの非抗原特異的相互作用において機能する。抗体または抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性は、特定の抗原に特異的に結合する抗体の能力である。

【００３８】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分の配列が抗体間で大きく異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性において使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等には分布していない。これは、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメイン中の超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク

領域（ＦＲ）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、主にβシート構成を採用し、３つの超可変領域によって連結され、βシート構造に連結し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する、４つのＦＲを含む。各鎖内の超可変領域は、ＦＲによって近接して一緒に保持されており、他方の鎖の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）を参照されたい）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）への参加等の様々なエフェクター機能を呈する。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列が超可変であり（「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」）、及び／または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成し、及び／または抗原接触残基（「抗原接触」）を含む、抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、抗体は、６つのＨＶＲを含み、このうち３つがＶＨ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）にあり、３つがＶＬ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）にある。本明細書における例示的なＨＶＲは、

（ａ）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）で生じる超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））と、

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

（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、及び９３～１０１（Ｈ３）で生じる抗原接触体（ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６））と、

（ｄ）ＨＶＲアミノ酸残基４６～５６（Ｌ２）、４７～５６（Ｌ２）、４８～５６（Ｌ２）、４９～５６（Ｌ２）、２６～３５（Ｈ１）、２６～３５ｂ（Ｈ１）、４９～６５（Ｈ２）、９３～１０２（Ｈ３）、及び９４～１０２（Ｈ３）を含む、（ａ）、（ｂ）、及び／または（ｃ）の組み合わせと、を含む。

【００４０】

「フレームワーク」または「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（またはＶＬ）において以下の配列：ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４に現れる。

【００４１】

「抗体断片」は、好ましくはその抗原結合領域を含む、インタクトな抗体の一部分を含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖ断片；ダイアボディ、タンデムダイアボディ（ｔａＤｂ）、直鎖状抗体（例えば、米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２；Ｚａｐａｔａ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２（１９９５））；一アーム抗体、単一可変ドメイン抗体、ミニボディ、一本鎖抗体分子；抗体断片から形成される多重特異性抗体（例えば、Ｄｂ－Ｆｃ、ｔａＤｂ－Ｆｃ、ｔａＤｂ－ＣＨ３、（ｓｃＦＶ）４－Ｆｃ、ジ－ｓｃＦｖ、バイ－ｓｃＦｖ、またはタンデム（ジ、トリ）－ｓｃＦｖが挙げられるが、これらに限定されない

）；及び二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥｓ）が挙げられる。
【００４２】
抗体のパパイン消化により、各々が単一の抗原結合部位を有する、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片、及び容易に結晶化する能力を反映する名称である、残りの「Ｆｃ」断片がもたらされる。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位を有しながら依然として抗原に架橋することができる、Ｆ（ａｂ’）２断片が得られる。
【００４３】
「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、緊密な非共有結合性会合にある１つの重鎖可変ドメイン及び１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。各可変ドメインの３つの超可変領域が相互作用してＶＨ－ＶＬ二量体の表面上の抗原結合部位を規定するのは、この構成においてである。集合的に、６つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な超可変領域を３つのみ含むＦｖの半分）でさえも、抗原を認識してそれに結合する能力を有するが、全結合部位よりも親和性が低い。
【００４４】
Ｆａｂ断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨＩ）も含む。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の１つ以上のシステインを含む重鎖ＣＨＩドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されているという点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が少なくとも１つの遊離チオール基を有するＦａｂ’の表記である。Ｆ（ａｂ’）２抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として産生されたものである。抗体断片の他の化学的結合もまた知られている。
【００４５】
任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それら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つの明確に異なる種類のうちの１つに割り当てられ得る。
【００４６】
抗体は、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割り当てられ得る。インタクトな抗体には５つの主要なクラス、すなわち、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが存在し、これらのうちのいくつかは、「サブクラス」（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、及びＩｇＡ２にさらに分けることができる。抗体の異なるクラス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。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成は、周知である。
【００４７】
「一本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」抗体断片は、抗体のＶＨ及びＶＬドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖内に存在する。いくつかの実施形態では、Ｆｖポリペプチドは、ＶＨドメインとＶＬドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより、ｓｃＦｖが抗原結合に望ましい構造を形成することが可能になる。ｓｃＦｖに関する概説については、例えば、Ｐｌｉｉｃｋｔｈｕｎ ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照されたい。
【００４８】
「ダイアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、これらの断片は、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）内の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続した重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。同じ鎖上の２つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、２つの抗原結合部位を作製することができる。ダイアボディは、例えば、ＥＰ４０４，０９７、ＷＯ９３／１１１６１、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｈ，Ｐｒ

ｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｅｔ ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）にさらに詳述されている。

【００４９】

「多重特異性抗体」という用語は、最も広義に使用され、多重エピトープ特異性を有する抗体を具体的に包含する。かかる多重特異性抗体としては、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む抗体（ＶＨＶＬ単位がポリエピトープ特異性を有する）、２つ以上のＶＬドメイン及びＶＨドメインを有する抗体（各ＶＨＶＬ単位が異なるエピトープに結合する）、２つ以上の単一可変ドメインを有する抗体（各単一可変ドメインが異なるエピトープに結合する）、完全長抗体、抗体断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｄｓＦｖ、ｓｃＦｖ、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、三重機能性抗体、共有結合している抗体断片または非共有結合している抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。「多重エピトープ特異性」とは、同じまたは異なる標的（複数可）上の２つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を指す。「単一特異性」とは、１つのエピトープにのみ結合する能力を指す。一実施形態によれば、多重特異性抗体は、５μＭ～０．００１ｐＭ、３μＭ～０．００１ｐＭ、１μＭ～０．００１ｐＭ、０．５μＭ～０．００１ｐＭ、または０．１μＭ～０．００１ｐＭの親和性で各エピトープに結合するＩｇＧ抗体である。

【００５０】

「単一ドメイン抗体」（ｓｄＡｂ）または「単一可変ドメイン（ＳＶＤ）抗体」という表現は、一般に、単一可変ドメイン（ＶＨまたはＶＬ）が抗原結合を付与し得る抗体を指す。言い換えれば、単一可変ドメインは、標的抗原を認識するために別の可変ドメインと相互作用する必要はない。単一ドメイン抗体の例としては、ラクダ科動物（ラマ及びラクダ）ならびに軟骨魚類（例えば、テンジクザメ）由来の抗体、ならびにヒト及びマウス抗体からの組換え方法から得られる抗体が挙げられる（Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３４１：５４４－５４６、Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ（２００６）３０：４３－５６、Ｔｒｅｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ（２００１）２６：２３０－２３５、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２００３）：２１：４８４－４９０、ＷＯ２００５／０３５５７２、ＷＯ０３／０３５６９４、Ｆｅｂｓ Ｌｅｔｔ（１９９４）３３９：２８５－２９０、ＷＯ００／２９００４、ＷＯ０２／０５１８７０）。

【００５１】

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、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は、同一であり、及び／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の産生中に生じ得る想定される変異型は除外され、かかる変異型は、一般に、少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、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。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されない点でも有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示すものであり、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されないものとする。例えば、本明細書に提供される方法に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にＫｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５（１９７５）によって記載されたハイブリドーマ法によって作製されても、または組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）及びＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載の技法を用いて、ファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。

【００５２】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、具体的には、重鎖及び／または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体

内の対応する配列と同一または相同である一方で、鎖（複数可）の残りが、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにそれらが所望される生物活性を呈する限りは、かかる抗体の断片を含む（米国特許第４，８１６，５６７号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５（１９８４））。本明細書において目的のキメラ抗体としては、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザル等の旧世界ザル）に由来する可変ドメイン抗原結合配列と、ヒト定常領域配列とを含む、「霊長類化」抗体が挙げられる（米国特許第５，６９３，７８０号）。

【００５３】

本明細書の目的での「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（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またはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」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み得るか、またはアミノ酸配列変化を含有してもよい。いくつかの実施形態では、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、または２以下である。いくつかの実施形態では、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またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【００５４】

「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または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。一般に、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列の下位群に由来する。一般に、配列の下位集団は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３にあるような下位集団である。一実施形態では、ＶＬについては、下位群は、Ｋａｂａｔら（上記）にあるような下位群カッパＩである。一実施形態では、ＶＨについては、下位群は、Ｋａｂａｔら（上記）にあるような下位群ＩＩＩである。

【００５５】

「ヒト化」型の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置き換えられる、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、上述のＦＲ置換（複数可）を除いて、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつＦＲの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のＦＲである少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域、典型的には、ヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分を含む。さらなる詳細については、例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９（１９８８）、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照されたい。

【００５６】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生された抗体、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト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保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【００５７】

いくつかの実施形態では、抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然配列Ｆｃ領域またはアミノ酸配列変異型Ｆｃ領域）に起因する生物活性を指し、抗体アイソタイプにより異なる。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃｌｑ結合及び補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体の下方制御が挙げられる。

【００５８】

「抗体依存性細胞媒介細胞傷害性」または「ＡＤＣＣ」とは、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。ＡＤＣＣを媒介するための初代細胞、ＮＫ細胞は、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現するが、一方で単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞上でのＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９：４５７－９２（１９９１）の４６４頁の表３に要約されている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するために、米国特許第５，５００，３６２号または同第５，８２１，３３７号に記載されるようなインビトロＡＤＣＣアッセイを行ってもよい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が含まれる。代替的に、または加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｈ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｅｔ（ＵＳＡ）９５：６５２－６５６（１９９８）に開示される動物モデルにおいて評価することができる。

【００５９】

「ヒトエフェクター細胞」は、１つ以上のＦｃＲを発現し、かつエフェクター機能を実行する、白血球である。いくつかの実施形態では、これらの細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行する。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞傷害性Ｔ細胞、及び好中球を含み、ＰＢＭＣ及びＮＫ細胞が好ましい。

【００６０】

「補体依存性細胞傷害性」または「ＣＤＣ」とは、補体の存在下で標的を溶解させる分子の能力を指す。補体活性化経路は、補体系の第１の構成成分（Ｃｌｑ）の、同種抗原と複合した分子（例えば、ポリペプチド（例えば、抗体））への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０２：１６３（１９９６）に記載のＣＤＣアッセイが行われ得る。

【００６１】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」という用語は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を説明するために使用される。いくつかの実施形態では、ＦｃＲは、天然配列ヒトＦｃＲである。

【００６２】

さらに、好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスの受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異型及び代替的にスプライシングされた形態を含む。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（活性化受容体）及びＦｃγＲＩＩＢ（阻害受容体）を含み、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる同様のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含有する。阻害受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系の

阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）を含有する（Ｄａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３－２３４（１９９７）を参照されたい）。ＦｃＲは、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９：４５７－９２（１９９１）、Ｃａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５－３４（１９９４）、及びｄｅ Ｈａａｓ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１（１９９５）に概説されている。今後特定されるＦｃＲを含む他のＦｃＲは、本明細書において「ＦｃＲ」という用語に包含される。この用語は、母体ＩｇＧの胎児への移行に関与している新生児受容体ＦｃＲｎも含む（Ｇｕｙｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）及びＫｉｍ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「Ｆｃ領域」という用語は、一般に、免疫グロブリン重鎖のＣ末端ポリペプチド配列を含む二量体の複合体を指し、Ｃ末端ポリペプチド配列は、インタクトな抗体のパパイン消化によって得ることができるものである。Ｆｃ領域は、天然または変異型Ｆｃ配列を含んでもよい。免疫グロブリン重鎖のＦｃ配列の境界は様々であり得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ配列は通常、およそＣｙｓ２２６位のアミノ酸残基から、またはおよそＰｒｏ２３０位から、Ｆｃ配列のカルボキシル末端に及ぶと定義される。本明細書において別段明記されない限り、Ｆｃ領域また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に記載される、ＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵ番号付けシステムに従う。免疫グロブリンのＦｃ配列は一般に、２つの定常ドメイン、すなわちＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインを含み、任意選択でＣＨ４ドメインを含む。本明細書において「Ｆｃポリペプチド」とは、Ｆｃ領域、例えば単量体Ｆｃを構成する、ポリペプチドのうちの１つを意味する。Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１ ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、もしくはＩｇＭ等の任意の好適な免疫グロブリンから得ることができる。Ｆｃ領域は、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のＨ鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ領域における配列によって決定される。この領域はまた、ある特定の細胞型に見られるＦｃ受容体（ＦｃＲ）によって認識される部分でもある。いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドは、（一般的にはそのＮ末端に）野生型ヒンジ配列の一部または全てを含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドは、機能性または野生型ヒンジ配列を含まない。

【００６４】

「修飾Ｆｃ領域」または「Ｆｃ変異型」は、少なくとも１つのアミノ酸修飾、好ましくは１つ以上のアミノ酸置換（複数可）によって天然配列Ｆｃ領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、修飾Ｆｃ領域は、天然配列Ｆｃ領域または親ポリペプチドのＦｃ領域と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Ｆｃ領域または親ポリペプチドのＦｃ領域における約１～約１０個のアミノ酸置換、及び好ましくは約１～約５個のアミノ酸置換を有する。本明細書の修飾Ｆｃ領域は、好ましくは、天然配列Ｆｃ領域及び／または親ポリペプチドのＦｃ領域との少なくとも約８０％の相同性、ならびに最も好ましくは、それらと少なくとも約９０％の相同性、より好ましくは、それらと少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の相同性を保有する。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「アゴニスト」、「アゴニスト性の」、「アゴニズム」または「作動する」という用語は一般に、細胞の表面上の受容体に結合し、また、受容体の天然リガンドによって惹起／模倣／刺激される反応または活性と同様または同じである反応または活性を惹起／模倣／刺激することが可能である、結合分子（例えば、抗原結合ポリペプチドまたは抗原結合複合体）を指す。例示的な実施形態では、本明細書に記載され

るアゴニストは、受容体に関連するシグナル伝達経路の活性化を誘導／増強／強化／刺激することが可能である。

【００６６】

本明細書で使用される場合、「細胞表面受容体」という用語は、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の任意の天然細胞表面受容体を指す。この用語は、「完全長」のプロセシングされていない細胞表面受容体、ならびに細胞内のプロセシングから生じる細胞表面受容体の任意の形態を包含する。この用語はまた、細胞表面受容体の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型を包含する。

【００６７】

「がん」及び「がん性」という用語は、制御されていない細胞成長を典型的に特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。この定義には、良性がん及び悪性がんが含まれる。がんの例としては、がん腫、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。かかるがんのより具体的な例としては、上皮性卵巣癌、卵管癌、原発性腹膜癌、扁平上皮細胞癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（ｇａｓｔｒｉｃまたはｓｔｏｍａｃｈ）（胃腸癌を含む）、膵癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌（白金感受性及び白金抵抗性卵巣癌を含む）、肝癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、卵管、腹膜、子宮内膜または子宮の癌腫、唾液腺癌腫、腎臓（ｋｉｄｎｅｙまたはｒｅｎａｌ）癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、及び様々な型の頭頸部癌、ならびにＢ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）；小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ；中悪性度／濾胞性ＮＨＬ；中悪性度びまん性ＮＨＬ；高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ；高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ；高悪性度小非切れ込み型細胞ＮＨＬ；巨大病変ＮＨＬ；マントル細胞リンパ腫；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；及びワルデンストレームのマクログロブリン血症を含む）；慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）；急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）；有毛細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、ならびに母斑症、浮腫（脳腫瘍と関連付けられるもの等）、及びメーグス症候群と関連付けられる異常血管増殖が挙げられる。

【００６８】

「親和性成熟」抗体とは、改変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、かかる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。

【００６９】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的または予防的結果を実現するために必要な投薬量及び期間での有効な量を指す。

【００７０】

「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、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるＦｃ領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように交換可能に使用される。

【００７１】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、交換可能に使用され、その中に外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞は、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含む。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一ではない場合があるが、変異を含み得る。最初に形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

【００７２】

本明細書で別途指定されない限り、可変ドメイン中のＨＶＲ残基及び他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、Ｋａｂａｔら（上記）に従って番号付けされる。

【００７３】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

【００７４】

「単離された」抗体とは、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動法（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動法）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換もしくは逆相ＨＰＬＣ）によって決定される、９５％または９９％を超える純度に精製される。抗体の純度を評価するための方法の概説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【００７５】

「単離された」核酸とは、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、通常は核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子が染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【００７６】

「天然抗体」とは、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合されている２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖で構成される、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は、可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）を有し、その後に３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）が続く。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）を有し、その後に定常軽（ＣＬ）ドメインが続く。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つの種類のうちの１つに割り当てられ得る。

【００７７】

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、配列を整列し、配列同一性最大パーセントを実現するために必要に応じてギャップを導入した後に、かついかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列中の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割合として定義される。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、当業者が備えている技能の範囲内の様々な方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、または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使用して達成され得る。当業者であれば、比較されている配列の完全長にわたって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、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、本明細書における目的のために、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．が作成したものであり、ソースコードは、使用者用書類と共に、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ　Ｏｆｆｉｃｅ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９に提出され、ここで、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されている。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、または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場合はコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定されており、変動しない。

【００７８】

ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較に用いられる状況において、所与のアミノ酸配列Ｂ

への、それとの、またはそれに対する、所与のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（代替的に、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Ａと表現され得る）は、以下、

１００×分数Ｘ／Ｙ

のように計算され、式中、Ｘは、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって、そのプログラムのＡとＢとの整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である。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へのアミノ酸配列同一性％は、ＢのＡへのアミノ酸配列同一性％とは等しくないことが理解されるだろう。別段具体的に述べられない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性％値は、直前の段落に記載されるようにＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを使用して得られる。

【００７９】

「薬学的組成物」または「薬学的製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、製剤が投与されるであろう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何ら含有しない、調製物を指す。

【００８０】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって無毒である、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、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【００８１】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、それが連結している別の核酸を増殖させることが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、及びそれが導入される宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結している核酸の発現を誘導することができる。かかるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

【００８２】

ＩＩ．アゴニスト活性を有する抗原結合複合体

本明細書において、抗原結合複合体、例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体が提供される。本開示の抗原結合複合体の様々な構成は、本明細書において説明及び図示され、異なる形式には、単一エピトープ及び二重または多重エピトープ形式の両方が含まれる（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。本明細書で示されるように、細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体により細胞表面受容体を標的とすることによって、より強い受容体活性化がもたらされる。さらに、細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）により細胞表面受容体の複数のエピトープを標的とすることによって、受容体媒介性シグナル伝達における相乗的増加をもたらす（例えば、同等数の抗原結合部分を有する単一のエピトープのみを標的とすることと比較して）ことは、本開示の驚くべき発見である。重要なことには、本開示は、一価の形態であるとき、既にアゴニスト活性を示す抗体の抗原結合領域（例えば、抗体ＣＤＲ及び／または可変ドメイン）が本明細書に記載の多価の二重エピトープ形式で使用されるとき、優れたアゴニスト活性を示すことを示す。例示的な抗原結合複合体形式は、以下で説明される。

【００８３】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）は、２つのサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、各サブユニットは抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異性抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、各サブユニットは、第１の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_{1}$）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_{1}$）を含む、第１のハーフ抗体と、第２の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_{2}$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_{2}$）を含む、第２のハーフ抗体とを含む。本明細書で使用される場合、「ハーフ抗体」とは、単一の抗体重鎖と対合された単一の抗

体軽鎖を指す。

【００８４】

いくつかの実施形態では、第１のハーフ抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第１の抗体重鎖と、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第１の抗体軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、第２のハーフ抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第２の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第２の抗体重鎖と、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第２の抗体軽鎖とを含む。

【００８５】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む第１の抗体であって、第１の抗体の２つの抗体重鎖のそれぞれが、VH_1－CH_1－ヒンジ－CH_2－CH_3［Ｘ］を含み、第１の抗体の２つの抗体軽鎖のそれぞれが、VL_1－ＣＬ［ＶＩＩ］を含む、第１の抗体と、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む第２の抗体であって、第２の抗体の２つの抗体重鎖のそれぞれが、VH_2－CH_1－ヒンジ－CH_2－CH_3［ＸＩＩ］を含み、第２の抗体の２つの抗体軽鎖のそれぞれが、VL_2－ＣＬ［ＩＸ］を含む、第２の抗体とを含み、第１の抗体の抗体重鎖のそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、第１の抗体の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、第２の抗体の抗体重鎖のそれぞれは、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、第２の抗体の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、第１及び第２の抗体は、リンカーL_1を介して結合され、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。

【００８６】

いくつかの実施形態では、サブユニットのうちの１つまたは両方は、１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合する第１のハーフ抗体（例えば、VH_1及びVL_1）と、異なるエピトープ（例えば、同じ細胞表面受容体の）に特異的に結合する第２のハーフ抗体（例えば、VH_2及びVL_2）とを含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのうちの１つまたは両方は、１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合する第１のハーフ抗体（例えば、VH_1及びVL_1）と、同じエピトープに特異的に結合する第２のハーフ抗体（例えば、VH_2及びVL_2）とを含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２のハーフ抗体は、例えば、本明細書に記載されるように（本開示のリンカーとの結合等、化学結合または遺伝的結合を含むが、これらに限定されない）結合される。本明細書で使用される場合、「異なる」エピトープは、別のエピトープと部分的にまたは完全に重複しないエピトープを指し得る。抗原結合複合体の例示的な構成は、「ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ」形式として、本明細書に説明及び図示される（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。

【００８７】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体を含み、抗体のそれぞれは、VH_1－CH_1－ヒンジ－CH_2－（CH_3）$_x$［Ｘ］を含む第１の抗体重鎖であって、これは、VL_1－ＣＬ［ＶＩＩ］を含む第１の抗体軽鎖と会合する、第１の抗体重鎖と、VH_2－CH_1－ヒンジ－CH_2－（CH_3）$_y$［ＸＩＩ］を含む第２の抗体重鎖であって、これは、VL_2－ＣＬ［ＩＸ］を含む第２の抗体軽鎖と会合する、第２の抗体重鎖とを含み、第１の抗体重鎖のそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、

第１の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、第２の抗体重鎖のそれぞれは、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、第２の抗体軽鎖のうちの１つと会合し、２つの抗体は、リンカーL_1を介して結合され、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$(CH_3)_x$及び$(CH_3)_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。

【００８８】

いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、配列番号５６または１２８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＬドメインは、配列番号５７または１２９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８９】

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への結合を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、抗体のその抗原への結合を５０％以上遮断する。例示的な競合アッセイが本明細書に提供される。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）は、抗体と、抗体と結合される２つ以上の抗体Ｆａｂ断片とを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、２つの抗体重鎖及び２つの抗体軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体Ｆａｂ断片を含む（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。いくつかの実施形態では、抗体重鎖のうちの１つまたは両方は、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）を含む。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖のうちの１つまたは両方は、第１の

抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）を含む。

【００９１】

いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第１の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_1$）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む。いくつかの実施形態では、各抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む。いくつかの実施形態では、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第２の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）及び第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメインを含む、重鎖Ｆａｂ断片を含む。いくつかの実施形態では、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて結合される、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、軽鎖Ｆａｂ断片を含む。

【００９２】

いくつかの実施形態では、抗体は、本開示の細胞表面受容体のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体Ｆａｂ断片のうちの１つまたは両方は、第２の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）を含む。いくつかの実施形態では、抗体Ｆａｂ断片のうちの１つまたは両方は、抗体と同じ細胞表面受容体の異なるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体Ｆａｂ断片のうちの１つまたは両方は、抗体と細胞表面受容体の同じエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、複合体は、複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する。

【００９３】

いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片は、例えば、本開示のリンカーにより抗体に化学的に結合される。いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片は、例えば、本開示のポリペプチドリンカーにより抗体に遺伝的に結合される。

【００９４】

いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片のそれぞれは、抗体の異なる重鎖または軽鎖に結合される。抗原結合複合体の例示的な構成は、「ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ」形式として、本明細書に説明及び図示される（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。遺伝的結合または化学的結合を含み、また本開示の様々なリンカーを使用して、Ｆａｂ断片が抗体重鎖または軽鎖に結合され得る様々な構成が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、３つ以上のＦａｂ断片が抗体に結合される。

【００９５】

いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片は、例えば、それぞれ、２つ以上のＶＨまたはＶＬドメインを含む抗体重鎖及び／または軽鎖を産生することにより、抗体に遺伝的に結合される。

【００９６】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体軽鎖と会合する２つの抗体重鎖と、２つの抗体Ｆａｂ断片とを含む抗体を含み、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、ＶＨ$_1$－（ＣＨ$_1$）$_x$－ヒンジ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$［Ｘ］を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、ＶＬ$_1$－（ＣＬ）$_x$［ＶＩＩ］を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、ＶＨ$_2$－（ＣＨ$_1$）ｙ［ＸＩ］を含む重鎖と、ＶＬ$_2$－（ＣＬ）$_y$［ＩＸ］を含む軽鎖とを含み、抗体重鎖それぞれは、ＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$が抗原結合ドメインを形成するように、抗体軽鎖のうちの１つと会合し、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、ＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$が抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む１つの軽鎖断片と会合する式［ＸＩ］を含む１つの重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、リンカーＬ$_1$を介して、抗体の抗体重鎖のうちの１つまたは抗体軽鎖のうちの１つと結合され、ＶＨ$_1$は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、ＶＨ$_2$は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、ＶＬ$_1$は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＶＬ$_2$は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、（ＣＬ）$_x$及び（ＣＬ）$_y$は、抗体軽鎖定常ドメインであり、（ＣＨ$_1$）$_x$及び（ＣＨ$_1$）$_y$は、抗体の第１の重鎖定

常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインである。

【００９７】

いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、配列番号５６または１２８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＬドメインは、配列番号５７または１２９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、配列番号２３２に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、配列番号２３７に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３１に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、配列番号２３０に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するア

ミノ酸配列を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、配列番号２３６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３３に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体の抗体重鎖のそれぞれは、配列番号２３０または２９４のアミノ酸配列を含み、抗体の抗体軽鎖のそれぞれは、配列番号２３６のアミノ酸配列を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３８のアミノ酸配列を含む重鎖断片を含み、抗体Ｆａｂ断片のそれぞれは、配列番号２３３のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含む。

【００９８】

抗原結合複合体の例示的な構成は、「ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ」形式として、本明細書に説明及び図示される（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。単一エピトープ及び二重もしくは多重エピトープの両方の形態を含む様々な構成が企図される。例えば、いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、重鎖ＣＨ２ドメイン、重鎖ＣＨ３ドメイン、及び任意選択で（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＥ抗体に関して）、重鎖ＣＨ４ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の軽鎖可変ドメイン（VL_1）、第１の軽鎖定常ドメイン（例えば、ＶＫまたはＶＬ）、第２の軽鎖可変ドメイン（VL_2）、及び第２の軽鎖定常ドメイン（例えば、ＶＫまたはＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、第１の重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の軽鎖可変ドメイン（VL_1）は、細胞表面受容体の第１のエピトープを認識し、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の軽鎖可変ドメイン（VL_2）は、細胞表面受容体の同じエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、第１の重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の軽鎖可変ドメイン（VL_1）は、細胞表面受容体の第１のエピトープを認識し、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の軽鎖可変ドメイン（VL_2）は、同じ細胞表面受容体の異なるエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、重鎖ＣＨ２ドメイン、重鎖ＣＨ３ドメイン、及び任意選択で（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＥ抗体に関して）、重鎖ＣＨ４ドメインを含む抗体重鎖を発現し、かつＮ末端からＣ末端にかけて、第１の軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の軽鎖定常ドメイン（ＣＬ；例えば、ＶＫまたはＶＬ）を含む、第１の軽鎖、ならびにＮ末端からＣ末端にかけて、第２の軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の軽鎖定常ドメイン（ＣＬ；例えば、ＶＫまたはＶＬ）を含む、第２の軽鎖の抗体と共発現する（またはさもなければインビトロで構築される）ことによって抗体に結合される。したがって、抗原結合複合体は、２つの修飾された重鎖を含み、それぞれがそれに結合された２つの異なる軽鎖を有する。

【００９９】

ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗原結合複合体を産生するのに好適な技法の説明は、例えば、国際特許公開第ＷＯ／２０１０／１４５７９２号に見出すことができる。本開示の驚くべき発見は、多重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗原結合複合体がＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞及び初代Ｔ細胞系の両方において優れたアゴニスト抗体を示すことである（図１９と２０を参照されたい）。

【０１００】
いくつかの実施形態では、第１の抗体軽鎖は、抗体重鎖の第１の修飾と垂直対合するための修飾を含み、第２の抗体軽鎖は、抗体重鎖の第２の修飾と垂直対合するための修飾を含む。例えば、VH_1及びVL_1のそれぞれ、及び／またはＣＨ１及びＣＬのそれぞれは、抗体のVH_1及びVH_2ドメインがそれぞれ、軽鎖からのそれらのそれぞれのＶＬドメインと結合するように、垂直変異型対の同種修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、第１の抗体軽鎖のVL_1ドメインは、抗体重鎖のVH_1ドメインの修飾と垂直対合するための修飾を含む。いくつかの実施形態では、第１の抗体軽鎖のＣＬドメインは、抗体重鎖の第１のＣＨ１ドメインの修飾と垂直対合するための修飾を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗体軽鎖のVL_2ドメインは、抗体重鎖のVH_2ドメインの修飾と垂直対合するための修飾を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗体軽鎖のＣＬドメインは、抗体重鎖の第２のＣＨ１ドメインの修飾と垂直対合するための修飾を含む。かかる対合を促進するための例示的な垂直変異型対は、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２８８５０に記載されており、限定されないが、変異型対ＶＨ－Ｑ３９Ｋ／ＶＬ－Ｑ３８ＥもしくはＶＨ　Ｑ３９Ｅ／ＶＬ　Ｑ３８Ｋ（Ｋａｂａｔ番号付け）を有するＶＨ／ＶＬ領域；変異型対－ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ／ＣＬ－Ｖ１３３ＫもしくはＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ／ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ（ＥＵ番号付け）を有するＣＨ１／ＣＬ領域；またはＣＨ１　Ａ１４１Ｉ、Ｆ１７０Ｓ、Ｓ１８１Ｍ、Ｓ１８３Ａ、Ｖ１８５Ａ、及びＣＬ　Ｆ１１６Ａ、Ｌ１３５Ｖ、Ｓ１７４Ａ、Ｓ１７６Ｆ、ならびにＴ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）から選択される変異型を含み得る。

【０１０１】
いくつかの実施形態では、本開示の複合体は、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、４つの抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1－L_1－$(CH_1)_x$－L_2－VH_2－L_3－$(CH_1)_y$－ヒンジ－CH_2－CH_3［ＩＩＩ］を含み、４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つは、VL_1－$(CL)_x$［ＩＶ］を含み、４つの抗体軽鎖ポリペプチドのうちの２つは、VL_2－$(CL)_y$［Ｖ］を含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＶ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと、そしてVH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、式［Ｖ］を含む１つの軽鎖ポリペプチドと会合し、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、$(CL)_x$及び$(CL)_y$は、抗体軽鎖定常ドメインであり、$(CH_1)_x$及び$(CH_1)_y$は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、及びL_3は、アミノ酸リンカーである。いくつかの実施形態では、複合体は、VH_1、VL_1、$(CH_1)_x$、もしくは$(CL)_x$に、VH_1及びVL_1の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換、及び／またはVH_2、VL_2、$(CH_1)_y$、もしくは$(CL)_y$に、VH_2及びVL_2の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、国際公開第ＷＯ２０１６１７２４８５及び実施例６を参照されたい。例えば、例示的な置換は、限定されないが、ＶＨ－Ｑ３９Ｋ／ＶＬ－Ｑ３８ＥまたはＶＨ　Ｑ３９Ｅ／ＶＬ　Ｑ３８Ｋ（Ｋａｂａｔ番号付け）；ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ／ＣＬ－Ｖ１３３ＫまたはＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ／ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ（ＥＵ番号付け）；ＣＨ１　Ａ１４１Ｉ、Ｆ１７０Ｓ、Ｓ１８１Ｍ、Ｓ１８３Ａ、Ｖ１８５Ａ；ならびにＣＬ　Ｆ１１６Ａ、Ｌ１３５Ｖ、Ｓ１７４Ａ、Ｓ１７６Ｆ、及びＴ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４４に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、

少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４４または２９２のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４５のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４６のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４７に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４７または２９３のアミノ酸配列を含み、式［ＩＶ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４９のアミノ酸配列を含み、式［Ｖ］を含む抗体軽鎖ポリペプチドの両方は、配列番号２４８のアミノ酸配列を含む。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、複合体は、$VH_1-L_1-CH_1-L_2-VH_1-L_3-CH_1-$ヒンジ$-CH_2-(CH_3)_x$［ＶＩ］を含む第１の抗体重鎖ポリペプチドと、それぞれが、VL_1-CL［ＶＩＩ］を含む、２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと、$VH_2-L_7-CH_1-L_8-VH_2-L_9-CH_1-$ヒンジ$-CH_2-(CH_3)_y$［ＶＩＩ］を含む第２の抗体重鎖ポリペプチドと、それぞれが、VL_2-CL［ＩＸ］を含む、２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、第１の抗体重鎖ポリペプチドは、各VH_1がVL_1と抗原結合ドメインを形成するように、式［ＶＩＩ］を含む２つの第１の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、第２の抗体重鎖ポリペプチドは、各VH_2がVL_2と抗原結合ドメインを形成するように、式［ＩＸ］を含む２つの第２の抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、$(CH_3)_x$及び$(CH_3)_y$は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、L_7、L_8、及びL_9は、アミノ酸リンカーである。いくつかの実施形態では、$(CH_3)_x$は、突起または空隙を含み、$(CH_3)_y$は、突起または空隙を含み、$(CH_3)_x$の突起または空隙は、$(CH_3)_y$の突起または空隙内に配置可能である。例えば、表Ｃを参照されたい。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６の

アミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_2$は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、$ＶＬ_2$は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、$ＶＨ_1$は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_1$は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、$ＶＨ_2$は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_2$は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＨ_2$は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_2$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、$ＶＨ_1$は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、$ＶＬ_1$は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、配列番号５６または１２８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＬドメインは、配列番号５７または１２９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１０４】

抗原結合複合体の別の例示的な構成は、「ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ」形式として、本明細書に説明及び図示される（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）。単一エピトープ及び二重もしくは多重エピトープの両方の形態を含む様々な構成が企図される。例えば、いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）、第２の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）、重鎖ＣＨ１ドメイン、重鎖ＣＨ２ドメイン、重鎖ＣＨ３ドメイン、及び任意選択で、重鎖ＣＨ４ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_1$）、第２の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）、及び軽鎖定常ドメイン（例えば、ＶＫまたはＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、第１の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）及び第１の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_1$）は、細胞表面受容体の第１のエピトープを認識し、第２の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）及び第２の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）は、細胞表面受容体の同じエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、第１の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）及び第１の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_1$）は、細胞表面受容体の第１のエピトープを認識し、第２の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）及び第２の軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）は、同じ細胞表面受容体の異なるエピトープを認識する。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）は、２つ以上の抗体重鎖及び／または２つ以上の抗体軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、各重鎖は、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び一組の重鎖定常メイン、例えば、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、及び任意選択で（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＥ抗体の場合）、ＣＨ４ドメインを含む。いくつかの実施形態では、各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び定常軽（ＣＬ）ドメイン（例えば、カッパまたはラムダ）を含む。いくつかの実施形態では、各サブユニットの重鎖は、例えば本明細書に記載されるように、エフェクター機能を低減する１つ以上の修飾を含む。

【０１０６】

上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、$ＶＨ_1$は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、及び／またはＶＬ$_1$は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含み、及び／またはＶＬ$_1$は、（ｉｖ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、及び／またはＶＬ$_1$は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、ＶＨ$_2$は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、及び／またはＶＬ$_2$は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_2$は、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含み、及び／またはＶＬ$_2$は、（ｉｖ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_2$は、配列番号１２６のアミノ酸配列を含み、及び／またはＶＬ$_2$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む。上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、ＶＨ$_1$は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_1$は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、ＶＨ$_2$は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、ＶＬ$_2$は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨ$_1$は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_1$は、配列番号５７のアミノ酸配列を含み、ＶＨ$_2$は、配列番号１２６のアミノ酸配列を含み、ＶＬ$_2$は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む。

【０１０７】

上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、ＶＨ$_2$は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、ＶＬ$_2$は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ$_2$は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含み、及び／またはＶＬ$_2$は、（ｉｖ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１、２、もしくは３

つの抗体ＨＶＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、及び／またはVL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、VH_1は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、及び／またはVL_1は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含み、及び／またはVL_1は、（ｉｖ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１、２、もしくは３つの抗体ＨＶＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２６のアミノ酸配列を含み、及び／またはVL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む。上記の形式のいずれかのある特定の実施形態では、VH_2は、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、VL_1は、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。ある特定の実施形態では、VH_1は、配列番号１２６のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、複合体は、２つの抗体重鎖ポリペプチドと、２つの抗体軽鎖ポリペプチドとを含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1－L_1－VH_2－L_2－CH_1－ヒンジ－CH_2－CH_3［Ｉ］を含み、抗体軽鎖ポリペプチドのそれぞれは、VL_1－L_3－VL_2－L_4－ＣＬ［ＩＩ］を含み、抗体重鎖ポリペプチドのそれぞれは、VH_1及びVL_1が抗原結合ドメインを形成し、VH_2及びVL_2が抗原結合ドメインを形成するように、１つの抗体軽鎖ポリペプチドと会合し、VH_1は、第１の抗体重鎖可変ドメインであり、VH_2は、第２の抗体重鎖可変ドメインであり、VL_1は、第１の抗体軽鎖可変ドメインであり、VL_2は、第２の抗体軽鎖可変ドメインであり、ＣＬは、抗体軽鎖定常ドメインであり、CH_1は、抗体の第１の重鎖定常ドメインであり、ヒンジは、抗体ヒンジ領域であり、CH_2は、抗体の第２の重鎖定常ドメインであり、CH_3は、抗体の第３の重鎖定常ドメインであり、L_1、L_2、L_3、及びL_4は、アミノ酸リンカーである。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_2は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６の

アミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_2は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、VH_1は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、VL_1は、配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、VH_1は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_2は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH_2は、配列番号１２８のアミノ酸配列を含み、VL_2は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含み、VH_1は、配列番号５６のアミノ酸配列を含み、VL_1は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨドメインは、配列番号５６または１２８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＶＬドメインは、配列番号５７または１２９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、式［Ｉ］に従う抗体重鎖ポリペプチドは、配列番号２４０、２４２、２５０、２５２、２５４、２５６、２５８、２６０、２６２、２６４、または２６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、式［Ｉ］に従う抗体重鎖ポリペプチドは、配列番号２４０または２４２に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、式［Ｉ］に従う抗体重鎖ポリペプチドは、配列番号２４２または２９１のアミノ酸配列を含む。

【０１１０】

上述の複合体のいずれかにおいて、VH_1、VH_2、VL_1、及び／またはVL_2は、表４及び５に列記される配列のうちの１つ以上を含む、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１１１】

本開示の複合体は、以下に記載のアゴニスト活性のうちの１つ以上を有し得る。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、約０．４５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、約１ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０複合体は、約０．４ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０複合体は、約０．５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、結合親和性は、ラジオイムノアッセイを使用して決定される。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、ヒトＯＸ４０及びカニクイザルＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、結合は、ＦＡＣＳアッセイを使用して決定される。いくつかの実施形態では、ヒトＯＸ４０への結合は、約０．２ｕｇ／ｍｌの

ＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、ヒトＯＸ４０への結合は、約０．３ｕｇ／ｍｌ以下のＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、カニクイザルＯＸ４０への結合は、約１．５ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、カニクイザルＯＸ４０への結合は、約１．４ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有する。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、ラットＯＸ４０またはマウスＯＸ４０に結合しない。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、ＯＸ４０発現細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）においてアポトーシスを誘導しない。いくつかの実施形態では、アポトーシスは、３０ｕｇ／ｍｌの抗体濃度を使用して、例えば、アネキシンＶ及びプロプロジウム（ｐｒｏｐｒｏｄｉｕｍ）ヨウ素染色Ｔｒｅｇを使用してアポトーシスが生じたかどうかを判定することにより、アッセイされる。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、メモリーＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＦＮ－γである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、メモリーＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させることによって、メモリーＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、ＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前の増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるサイトカイン産生を増加させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＦＮ－γである。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるガンマインターフェロン産生を増加させる（例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前の、増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して）ことによって、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前のガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の総数、または、例えば、総ＣＤ４＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、個体におけるＣＤ８＋エフェクターＴ細胞は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて強化された増殖、サイトカイン分泌、及び／または細胞溶解活性を有する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて

上昇する。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔエフェクター細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ８＋の割合）を増加させる。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前のガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、総ＣＤ８＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ８＋細胞の割合）を増加させる。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ８＋の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。本発明の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、総ＣＤ８＋細胞中の、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ８＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて増加する。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、個体におけるメモリーＴ細胞は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて強化された増殖及び／またはサイトカイン分泌を有する。いくつかの実施形態では、メモリーＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、メモリーＴ細胞サイトカイン分泌（レベル）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、個体におけるＴｒｅｇは、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて減少したエフェクターＴ細胞機能（例えば、増殖及び／またはサイトカイン分泌）の阻害を有する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌（レベル）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、エフェクターＴ細胞機能のＴｒｅｇ抑制を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞機能は、エフェクターＴ細胞増殖及び／またはサイトカイン産生である。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞増殖及び／またはエフェクターＴ細胞サイトカイン分泌）のＴｒｅｇ抑制を減少させることによって、Ｔｒｅｇ機能を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、腫瘍内（浸潤性）Ｔｒｅｇの数（例えば、Ｔｒｅｇの総数、または、例えば、ＣＤ４＋細胞中のＦｏｘ３ｐ＋細胞の割合）を低減する。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）Ｔｒｅｇの数（例えば、Ｔｒｅｇの総数、または、例えば、ＣＤ４＋細胞中のＦｏｘ３ｐ＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて低減される。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ４＋細

胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。本発明の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ガンマインターフェロンを発現する総ＣＤ４＋細胞、または、例えば、総ＣＤ４＋細胞中の、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト複合体の投与前と比べて上昇する。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＯＸ４０を発現する標的細胞におけるＯＸ４０シグナル伝達を増加させる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０シグナル伝達は、ＮＦｋＢ下流シグナル伝達を監視することによって検出される。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、４０℃で２週間の処理後に安定である。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト複合体は、ヒトＯＸ４０への結合についてＯＸ４０Ｌと競合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０Ｌの付加は、インビトロアッセイにおいてＯＸ４０複合体機能を強化しない。

【０１３０】

別の実施形態によれば、ＯＸ４０アゴニスト複合体には、以下の特性のうちの任意の１つ、任意の組み合わせ、または全てが含まれる：（１）約０．４５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．４ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、結合親和性は、ラジオイムノアッセイを使用して決定される、（２）ヒトＯＸ４０及びカニクイザルＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、結合は、ＦＡＣＳアッセイを使用して決定される、（３）約０．２ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．３ｕｇ／ｍｌ以下のＥＣ５０でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約１．５ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０でカニクイザルＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約１．４ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有するカニクイザルＯＸ４０に結合する、（４）ラットＯＸ４０またはマウスＯＸ４０には実質的に結合しない、（５）（例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト複合体での治療前の増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して）例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるガンマインターフェロン産生を増加させることによって、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能を強化する、（６）例えば、メモリーＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させることによって、メモリーＴ細胞機能を強化する、（７）例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞増殖及び／またはエフェクターＴ細胞サイトカイン分泌）のＴｒｅｇ抑制を減少させることによって、Ｔｒｅｇ機能を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である、（８）ＯＸ４０を発現する標的細胞におけるＯＸ４０シグナル伝達を増加させる（いくつかの実施形態では、ＯＸ４０シグナル伝達は、ＮＦｋＢ下流シグナル伝達を監視することによって検出される）、（９）４０℃で２週間の処理後に安定である。

【０１３１】

二重特異性または多重特異性抗体が本明細書においてさらに企図され、二重特異性または多重特異性抗体の各アームは、同じ細胞表面受容体、例えば、ＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体の各アームは、同じ細胞表面受容体、例えば、ＯＸ４０の異なるエピトープに結合する。例えば、ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、２つのアームを含んでもよく、各アームが、ＯＸ４０の異なるエピトープに結合する。ＯＸ４０に結合する例示的な抗体、抗原結合ドメイン、及び／または抗体断片のいずれか（例えば、本明細書に記載のＯＸ４０アゴニスト抗体のいずれかのＨＶＲ、ＶＨ、及び／またはＶＬドメイン）が、任意の組み合わせで二重特異性または多重特異性抗体において組み合わされ得ることを理解されたい。

【０１３２】
本明細書に記載の他の抗体ＨＶＲ配列、ＶＨ／ＶＬ配列、及び／または結合特異性のいずれかは、上述の配列のうちの１つ以上に加えて、またはその代わりに使用され得る。
【０１３３】
抗原結合ポリペプチド
本明細書に記載の複合体を形成するのに好適な抗原結合ポリペプチドまたはサブユニットは、細胞表面受容体のための少なくとも１つの抗原結合領域を含む。本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドは、抗体、Ｆｃ領域に融合された抗体の抗原結合領域（例えば、抗体断片）、またはＦｃ領域に融合された非抗体抗原結合領域タンパク質を含んでもよい。例示的な実施形態では、抗原結合ポリペプチドは、細胞表面受容体に結合し、修飾Ｆｃ領域を有する、抗体である。
【０１３４】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体またはサブユニットは、少なくとも２つのポリペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、２つのポリペプチドは、ハーフ抗体、例えば、単一の重鎖（重鎖可変領域、ＣＨ１ドメイン、及びＦｃドメインを含む）及び単一の軽鎖（軽鎖可変領域及びＣＬドメインを含む）である。特に、各抗体のためのＦｃ領域は、２つのポリペプチド間で形成された二量体（下記にさらに記載されるホモ二量体またはヘテロ二量体のいずれか）である。同様に、Ｆｃ領域のポリペプチドのうちの１つに結合された抗原結合領域は、２つのポリペプチドを含有してもよく、例えば、抗原結合領域が抗体断片である場合、それは重鎖及び軽鎖可変領域を含有してもよい。
【０１３５】
抗体
ある特定の実施形態では、本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニットは、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号及びＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１－６８５５（１９８４））に記載されている。一例では、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、または非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体である。
【０１３６】
ある特定の実施形態では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減させるために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、ＨＶＲ、例えば、ＣＤＲ（またはその一部）が非ヒト抗体に由来し、及びＦＲ（またはその一部）がヒト抗体配列に由来する１つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体中のいくつかのＦＲ残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または改善するために、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る。
【０１３７】
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）において概説されており、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、同第７，５２７，７９１号、同第６，９８２，３２１号、及び同第７，０８７，４０９号、Ｋａｓｈｍｉｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：２５－３４（２００５）（特異性決定領域（ＳＤＲ）グラフティングを記載する）、Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２８：４８９－４９８（１９９１）（「リサーフェシング（ｒｅ

ｓｕｒｆａｃｉｎｇ）」を記載する）、Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：４３－６０（２００５）（「ＦＲシャフリング」を記載する）、ならびにＯｓｂｏｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：６１－６８（２００５）及びＫｌｉｍｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，８３：２５２－２６０（２０００）（「ＦＲシャフリング」に対する「誘導的選択」アプローチを記載する）においてさらに記載されている。

【０１３８】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：「最良適合（ｂｅｓｔ－ｆｉｔ）」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）を参照されたい）、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位集団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）を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞変異した）フレームワーク領域また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）を参照されたい）、及びスクリーニングＦＲライブラリ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）を参照されたい）。

【０１３９】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニットは、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技法を使用して産生され得る。ヒト抗体は、一般に、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。

【０１４０】

ヒト抗体は、抗原投与に応答して、インタクトなヒト抗体また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修飾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され得る。かかる動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するかもしくは動物の染色体内にランダムに組み込まれているヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、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）を参照されたい。例えば、米国特許第６，０７５，１８１号及び同第６，１５０，５８４号（ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術を記載する）、米国特許第５，７７０，４２９号（ＨＵＭＡＢ（登録商標）技術を記載する）、ならびに米国特許第７，０４１，８７０号（Ｋ－Ｍ ＭＯＵＳＥ（登録商標）技術を記載する）、ならびに米国特許出願公開第２００７／００６１９００号（ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）技術を記載する）も参照されたい。かかる動物により生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによりさらに修飾され得る。

【０１４１】

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され得る。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が説明されている。（例えば、ＫｏｚｂｏｒＪ．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）を参照されたい。）ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体についても、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０３：３５５７－３５６２（２００６）に記載されている。さらなる方法としては、例えば、米国特許第７，１８９，８２６号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトＩｇＭ抗体の産生について記載）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）に記載の方法が挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）については、Ｖｏｌｌｍｅｒｓ 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。

【０１４２】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択される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生成され得る。次いで、かかる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。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法は、以下に記載される。

【０１４３】

本明細書に記載される抗原結合ポリペプチドまたはサブユニットとして好適な抗体は、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性（単数または複数）を有するポリペプチドについてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、所望の結合特性を保有する抗体に関してかかるライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当該技術分野で既知である。かかる方法は、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ １７８：１－３７（Ｏ’Ｂｒｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，２００１）に概説され、またさらに、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，ｉｎ 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）に記載される。

【０１４４】

ある特定のファージディスプレイ法において、ＶＨ及びＶＬ遺伝子のレパートリーが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により別個にクローニングされ、ファージライブラリ内でランダムに組み換えられ、これがその後、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは典型的には、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片またはＦａｂ断片のいずれかとして抗体断片をディスプレイする。免疫化源由来のライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、高親和性抗体を免疫原に提供する。代替的に、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ，１２：７２５－７３４（１９９３）によって記載されるように、ナイーブレパートリーは、（例えば、ヒトから）クローニングされて、いかなる免疫化も伴わずに、幅広い非自己抗原及び自

己抗原に対する抗体の単一源を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリは、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）によって記載されるように、幹細胞由来の再配列されていないＶ遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するＰＣＲプライマーを使用することによっても合成的に作製されて、高度可変ＣＤＲ３領域をコードし、インビトロでの再配列を達成することができる。ヒト抗体ファージライブラリ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、ならびに米国特許公開第２００５／００７９５７４号、同第２００５／０１１９４５５号、同第２００５／０２６６００号、同第２００７／０１１７１２６号、同第２００７／０１６０５９８号、同第２００７／０２３７７６４号、同第２００７／０２９２９３６号、及び同第２００９／０００２３６０号が挙げられる。ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【０１４５】

抗体の抗原結合領域

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）は、細胞表面受容体に結合する抗原結合領域及びＦｃ領域を含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド、抗体、またはサブユニットは、Ｆｃ領域に融合された細胞表面受容体に結合する抗体の抗原結合領域を含む。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合領域とは、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む抗原結合ドメインを指す。例示的な実施形態では、抗体の抗原結合領域とは、抗体断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、及びｓｃＦｖ断片等、ならびに以下に記載の他の断片を指す。ある特定の抗体断片に関する概説については、Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９－１３４（２００３）を参照されたい。ｓｃＦｖの概説については、例えば、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ），ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照されたく、また、ＷＯ９３／１６１８５、ならびに米国特許第５，５７１，８９４号及び同第５，５８７，４５８号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加したインビボ半減期を有する、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$断片の考察については、米国特許第５，８６９，０４６号を参照されたい。

【０１４６】

ダイアボディは、二価また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、ＥＰ４０４，０９７、ＷＯ１９９３／０１１６１、Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９－１３４（２００３）、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３）を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディもまた、Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９－１３４（２００３）に記載されている。

【０１４７】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部、または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Ｄｏｍａｎｔｉｓ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ；例えば、米国特許第６，２４８，５１６Ｂ１号を参照されたい）。

【０１４８】

抗体フラグメントは、本明細書に記載の、インタクトな抗体のタンパク質消化、ならびに組換え宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉまたはファージ）による産生を含むが、これらに限定されない、様々な技法によって作製され得る。抗体断片は、例えば、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ヒト、二重特異性、多重特異性、ＤＡＦ等の抗体形式を含む、本明

細書に記載の抗体のいずれからも作製することができる。

【０１４９】

本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）は、１つ以上のポリペプチドを含み得る。ある特定の実施形態では、抗原結合領域は、例えば、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域がリンカーを介して結合されている一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）等の、１つのポリペプチドを含む。他の実施形態では、抗原結合領域は、例えば、重鎖及び軽鎖可変領域が、自然に会合して６つのＣＤＲを有する抗原結合領域を形成する別個のポリペプチド鎖である、Ｆａｂ抗体断片等の、２つのポリペプチドを含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、複合体は、VH_1、VL_1、$(CH_1)_x$、もしくは$(CL)_x$に、VH_1及びVL_1の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換、及び／またはVH_2、VL_2、$(CH_1)_y$、もしくは$(CL)_y$に、VH_2及びVL_2の抗原結合ドメイン形成を促進する１つ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、国際公開第ＷＯ２０１６１７２４８５及び実施例６を参照されたい。例えば、例示的な置換は、限定されないが、ＶＨ－Ｑ３９Ｋ／ＶＬ－Ｑ３８ＥまたはＶＨ　Ｑ３９Ｅ／ＶＬ　Ｑ３８Ｋ（Ｋａｂａｔ番号付け）；ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ／ＣＬ－Ｖ１３３ＫまたはＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ／ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ（ＥＵ番号付け）；ＣＨ１　Ａ１４１Ｉ、Ｆ１７０Ｓ、Ｓ１８１Ｍ、Ｓ１８３Ａ、Ｖ１８５Ａ；ならびにＣＬ　Ｆ１１６Ａ、Ｌ１３５Ｖ、Ｓ１７４Ａ、Ｓ１７６Ｆ、及びＴ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）を含む。

【０１５１】

ある特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質は、Ａ１４１Ｉ、Ｆ１７０Ｓ、Ｓ１８１Ｍ、Ｓ１８３Ａ、及びＶ１８５Ａ変異（ＥＵ番号付け）を含む（それらからなる、及び実質的にそれらからなるを含む）Ｈ１のＣＨ１ドメイン、ならびにＦ１１６Ａ、Ｌ１３５Ｖ、Ｓ１７４Ａ、Ｓ１７６Ｆ、及びＴ１７８Ｖ変異（ＥＵ番号付け）を含む（それらからなる、及び実質的にそれらからなるを含む）Ｌ１のＣＬドメインを含む。

【０１５２】

ある特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質のＨ１のＶＨドメインは、Ｑ３９Ｅ置換変異（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み、多重特異性抗原結合タンパク質のＬ１のＶＬドメインは、Ｑ３８Ｋ置換変異（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み、多重特異性抗原結合タンパク質のＨ２のＣＨ１ドメインは、Ｓ１８３Ｅ置換変異（ＥＵ番号付け）を含み（それらからなる、及び実質的にそれらからなる等）、多重特異性抗原結合タンパク質のＬ２のＣＬドメインは、Ｖ１３３Ｋ置換変異（ＥＵ番号付け）を含む（それらからなる、及び実質的にそれらからなる等）。

【０１５３】

ある特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質のＨ１のＶＨドメインは、Ｑ３９Ｋ置換変異（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み、多重特異性抗原結合タンパク質のＬ１のＶＬドメインは、Ｑ３８Ｅ置換変異（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み、多重特異性抗原結合タンパク質のＨ２のＣＨ１ドメインは、Ｓ１８３Ｅ置換変異（ＥＵ番号付け）を含み（それらからなる、及び実質的にそれらからなる等）、多重特異性抗原結合タンパク質のＬ２のＣＬドメインは、Ｖ１３３Ｋ置換変異（ＥＵ番号付け）を含む（それらからなる、及び実質的にそれらからなる等）。

【０１５４】

非抗体抗原結合領域

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドは、細胞表面受容体に結合する抗原結合領域と、Ｆｃ領域とを含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドは、Ｆｃ領域に融合された、細胞表面受容体に結合する非抗体抗原結合領域を含む。非抗体抗原結合領域の例としては、例えば、細胞表面受容体に結合する、リガンド、リガンド断片、またはその多量体が挙げられる。ＯＸ４０に結合する非抗体抗原結合領域の例は、以下に記載される。Ｔｉｅ２に結合する非抗体結合領域の例は、

ＷＯ２００８／０４９２２７に記載される。

【０１５５】

Ｆｃ領域への抗原結合領域の結合

本明細書に記載の抗原結合領域（抗体由来の抗原結合領域及び非抗体抗原結合領域の両方）は、本明細書に記載される変異型Ｆｃ領域に融合されてもよい。例えば、（介在するポリペプチドリンカーを用いたまたは用いない）単一のポリペプチドとしての発現、化学結合、または重合体の基（例えば、単一または分岐状のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー等）を介した結合を含む、２つのポリペプチドを共有結合させるための任意の方法を用いて、抗原結合領域をＦｃドメインと一緒に融合してもよい。ある特定の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーであり得る。

【０１５６】

ある特定の実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリンカーであり得る。一実施形態では、ポリペプチドリンカーは、抗体、またはその変異型からのヒンジ配列である。例えば、ヒンジ配列は、抗体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３もしくはＩｇＧ４抗体、またはその断片もしくは誘導体等の、アミノ酸残基２１６～２３８（ＥＵ番号付け）を含み得る。例示的な実施形態では、ヒンジに基づくリンカーは、配列ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ（配列番号２１９）、またはその断片もしくは誘導体を含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、様々な長さ（例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０以上のアミノ酸）の可撓性リンカーであり得る。好適なリンカーは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，９（３），２９９－３０５，１９９６を参照されたい。例示的なペプチドリンカーは、例えば、

Ｓｅｒ

Ｇｌｙ－Ｓｅｒ

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２０）

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２１）

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２２）

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２３）

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２４）

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２５）

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２６）

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２７）

$(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n$（配列番号２２８）、及び

$(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n$（配列番号２２９）を含み、

ｎは、１以上の整数である。ある特定の実施形態では、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０であり得る。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、リンカーは、０～２０のアミノ酸長（包含的）である（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０のアミノ酸長である）。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、リンカーの少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のアミノ酸は、グリシン及び／またはセリンアミノ酸である。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のリンカーは、配列ＧＧＧＧＳＧ（配列番号２７０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号２７３）、ＧＧＳＧＧ（配列番号２７１）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７２）、またはＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ

ＧＳ（配列番号２７４）を含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ヒト抗体定常ドメイン配列（例えば、CH_1ドメインまたはヒンジ領域配列）内に見られるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のリンカーは、配列ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２７５）、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２７７）、ＲＴＶＡＡＰ（配列番号２７６）、またはＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号２７８）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヒト抗体定常ドメイン配列（例えば、CH_1ドメインまたはヒンジ領域配列）内に見られるアミノ酸配列、及び少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％のグリシン及び／またはセリンアミノ酸を有する配列の両方を含む。

【０１６０】

ある特定の実施形態では、リンカーは、化学リンカーであり得る。好適な化学リンカーは、当該技術分野で既知であり、市販されている。例示的な化学リンカーとしては、例えば、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＮＨＳ）、スベリン酸ジスクシンイミジル（ＤＳＳ）、スベリン酸ビス（スルホスクシンイミジル）（BS^3）、ジチオビス（プロピオン酸スクシンイミジル）（ＤＳＰ）、ジチオビス（スルホプロピオン酸スクシンイミジル）（ＤＴＳＳＰ）、エチレングリコビス（コハク酸スクシンイミジル）（ＥＧＳ）、エチレングリコビス（コハク酸スルホスクシンイミジル）（スルホ－ＥＧＳ）、酒石酸ジスクシンイミジル（ＤＳＴ）、酒石酸ジスルホスクシンイミジル（スルホ－ＤＳＴ）、ビス［２－（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ）、及びビス［２－（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ－ＢＳＯＣＯＥＳ）が挙げられる。

【０１６１】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合領域は、Ｆｃドメインを有する単一のポリペプチドとして発現される。Ｆｃドメインが二量体であるとき、Ｆｃ二量体に含有される各ポリペプチドは、抗体の抗原結合領域に融合され得るか、またはＦｃ二量体に含有されるポリペプチドのうちの１つのみが、抗体の抗原結合領域に融合され得る。

【０１６２】

ある特定の実施形態では、非抗体抗原結合領域は、Ｆｃドメインを有する単一のポリペプチドとして発現される。Ｆｃドメインが二量体であるとき、Ｆｃ二量体に含有される各ポリペプチドは、非抗体抗原結合領域に融合され得るか、またはＦｃ二量体に含有されるポリペプチドのうちの１つのみが、非抗体抗原結合領域に融合され得る。

【０１６３】

ＯＸ４０アゴニストを含む抗原結合領域

一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドまたは複合体は、ヒトＯＸ４０に結合し、それを作動する、抗原結合領域を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合ポリペプチドは、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体の抗原結合領域を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合ポリペプチドは、非抗体ＯＸ４０アゴニストである抗原結合領域を含む。以下に記載の例示的なＯＸ４０アゴニスト抗体のいずれかの可変ドメインのいずれかが本開示の複合体に使用され得る。

【０１６４】

ＯＸ４０アゴニスト抗体

本開示のある特定の態様は、ＯＸ４０に結合する抗原結合複合体に関する。いくつかの実施形態では、複合体は、ＯＸ４０（例えば、ヒトＯＸ４０）に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体である。例示的な抗体サブユニット及びその例示的な特徴が、以下に記載される。理論に拘束されることを望むものではないが、アゴニスト抗原結合複合体（例えば、四価のアゴニスト抗原結合複合体）は、エフェクター細胞による抗体架橋が（例えば、標的のクラスター化、及び標的によるその後のシグナル伝達を誘導するこ

とによる）アゴニスト活性に重要であり得るが、エフェクター細胞が作用部位で（例えば、エフェクター細胞が低レベルである腫瘍において）豊富にない場合があるシナリオにおいて、特に有利であり得ると考えられる。これらのシナリオにおいて、四価のアゴニスト抗原結合複合体等のアゴニスト抗原結合複合体は、豊富なエフェクター細胞の不在下でアゴニスト活性を可能にし得、及び／または強化し得る。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、抗原結合複合体は、表Ａに列記される同じ抗体の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つ全てのＨＶＲを含む、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片を含む。例えば、ある特定の実施形態では、複合体に含まれるＯＸ４０抗体またはＦａｂ断片は、表Ａに列記される同じ抗体からのＨＶＲの６つ全てを含有する。他の実施形態では、複合体は、下の表Ａに列記される同じ抗体に関する重鎖可変領域（V_H）及び／または軽鎖可変領域（V_L）を含む、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片を含む。しかしながら、特定の抗体を参照して表Ａに列記されるＨＶＲ、V_H、及び／またはV_L配列は、これらの特定の抗体に限定されず、代わりに、これらの配列は、表Ａに明示的に列記されていない多様な構成で、当業者によって好適に組み合わされ得ることが理解されよう。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。別の実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶ

Ｒ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０１７０】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０１７４】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号２６から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０１７６】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。

【０１７７】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。
【０１７８】
一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号２７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。
【０１７９】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２、８、または９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。
【０１８０】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２、８、または９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２、８、または９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１８２】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２、８、または９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４、１５、または１９から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。
【０１８３】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２、８、または９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３、１０、１１、１２、１３、または１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４、１５、または１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号７、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。
【０１８４】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号１７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ２は、ＤＭＹＰＤＡＡＡＡＳＹＮＱＫＦＲＥ（配列番号２１６）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ３は、ＡＰＲＷＡＡＡＡ（配列番号２１７）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｌ３は、ＱＡＡＡＡＡＡＡＴ（配列番号２１８）ではない。
【０１８５】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号１７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。別の実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号１７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ２は、ＤＭＹＰＤＡＡＡＡＳＹＮＱＫＦＲＥ（配列番号２１６）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ３は、ＡＰＲＷＡＡＡＡ（配列番号２１７）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｌ３は、ＱＡＡＡＡＡＡＡＴ（配列番号２１８）ではない。
【０１８６】
一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び

（ｃ）配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｌ３は、ＱＡＡＡＡＡＡＡＴ（配列番号２１８）ではない。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号１７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１７４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列と、（ｂ）（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号１７２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号１７５から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ２は、ＤＭＹＰＤＡＡＡＡＳＹＮＱＫＦＲＥ（配列番号２１６）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｈ３は、ＡＰＲＷＡＡＡＡ（配列番号２１７）ではない。いくつかの実施形態では、ＨＶＲ－Ｌ３は、ＱＡＡＡＡＡＡＡＴ（配列番号２１８）ではない。

【０１８９】

上記の置換の全ての可能な組み合わせは、配列番号１７２、１７３、１７４、及び１７５のコンセンサス配列に包含される。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。別の実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨ

ＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（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、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０１９４】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）

配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０２００】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０、３１、または３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲを含む。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０、３１、または３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。別の実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０、３１、または３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０、３１、または３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２、４３、または４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０、３１、または３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号３９、４０、または４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号４２、４３、または４４から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲ配列を含む。別の実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３及び配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３、及び配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２を含む。さらなる実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全て

のＶＨ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲ配列を含む、ＶＬドメインとを含む。

【０２０９】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｆ）配列番号１７８から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。

【０２１０】

上記の実施形態のいずれにおいて、抗ＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ヒト化されている。一実施形態では、抗ＯＸ４０抗体またはＦａｂ断片は、上記の実施形態のうちのいずれかにあるようなＨＶＲを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２１１】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０８、１１４、１１６、１８３、または１８４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０８、１１４、１１６、１８３または１８４において置換、挿入、及び／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０８、１１４、１１６、１８３、または１８４のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１２】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０９、１１５、または１１７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有する

が、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０９、１１５、または１１７において置換、挿入、及び／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０９、１１５、または１１７のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１３】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号５６において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５６のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１４】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５７において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号５７のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１５】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１８０のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％

、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号１８０において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１８０のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１６】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１７９のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号１７９において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１７９のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１７】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号９４において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９４のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１８】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、

その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号９５において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９５のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２１９】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号９６において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９６のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２２０】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号９７において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号９７のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２２１】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、または１４８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０

アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、または１４８において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、または１４８のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２２２】

別の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、または１４９のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、ＯＸ４０に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１～１０個のアミノ酸が、配列番号１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、または１４９において置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、配列番号１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７、または１４９のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０２２３】

ある特定の実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号６０及び配列番号６１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号６２及び配列番号６３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号６４及び配列番号６５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦ

ａｂ断片は、それぞれ配列番号７０及び配列番号７１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号７２及び配列番号７３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号７４及び配列番号７５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号８０及び配列番号８１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号８２及び配列番号８３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号８４及び配列番号８５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号８８及び配列番号８９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号９０及び配列番号９１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号９２及び配列番号９３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号９６及び配列番号９７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号９８及び配列番号９９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１００及び配列番号１０１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１０８及び配列番号１０９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１１４及び配列番号１１５のＶＨ及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１１６及び配列番号１１７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１８３及び配列番号６５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１８４及び配列番号６９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０２２４】

一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１１８及び配列番号１１９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１２０及び配列番号１２１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これに

はそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１２２及び配列番号１２３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１２４及び配列番号１２５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１２６及び配列番号１２７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１２８及び配列番号１２９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１３０及び配列番号１３１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１３２及び配列番号１３３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１３４及び配列番号１３５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１３６及び配列番号１３７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１３８及び配列番号１３９のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１４０及び配列番号１４１のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１４２及び配列番号１４３のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１４４及び配列番号１４５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。一実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体またはＦａｂ断片は、それぞれ配列番号１４６及び配列番号１４７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０２２５】

上述のように、本開示のある特定の態様は、複合体に関する。ＯＸ４０に結合する例示的な抗体、抗原結合ドメイン、及び／または抗体Ｆａｂ断片のいずれか（例えば、本明細書に記載のＯＸ４０アゴニスト抗体のいずれかのＨＶＲ、ＶＨ、及び／またはＶＬドメイン）が、任意の組み合わせ及び構成で本開示の複合体において組み合わされ得ることを理解されたい。いくつかの実施形態では、複合体は、ＯＸ４０の同じエピトープに結合する２つ以上の異なるＯＸ４０アゴニスト抗体または抗原結合ポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、複合体は、ＯＸ４０の異なるエピトープ（例えば、ヒトＯＸ４０等のＯＸ４０ポリペプチドの部分的に重複しないまたは完全に重複しないエピトープ）に結合する２つ以上の異なるＯＸ４０アゴニスト抗体または抗原結合ポリペプチドを含み得る。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、本開示の複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、４つの抗原結合ドメインのそれぞれは、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとを含み、複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインとを含み、ＯＸ４０の第１及び第２のエピトープは異なる。いくつかの実施形態では、第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、ＯＸ４０の結合について、第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインと交差競合しない。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、本開示の複合体は、ＯＸ４０に結合する４つの抗原結合ドメインを含み、４つの抗原結合ドメインのそれぞれは、抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、抗体軽鎖可変（ＶＬ）ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、ＯＸ４０の第１のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインと、ＯＸ４０の第２のエピトープに結合する１つ以上の抗原結合ドメインとを含み、第１のエピトープに結合する抗原結合ドメインは、ＯＸ４０への結合について、第２のエピトープに結合する抗原結合ドメインと交差競合しない。いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ドメイン間の競合は、共有される複合体の一部として２つのドメインを試験するのではなく、別個の抗体またはその断片の一部として各抗原結合ドメインを試験することによって行われる。例示的な競合アッセイを以下に提供する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０との結合について第２の抗原結合ドメインと交差競合しない第１の抗原結合ドメインは、競合アッセイにおいて、第２の抗原結合ドメインのＯＸ４０への結合を５０％以下遮断する。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合ドメインは、配列番号２８１の残基１１４～１１９、１２４、１２６、１２７、１２９、１３０、１３２、１４０、及び１４２から選択される、１つ以上のアミノ酸残基（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、または１４の残基）を含むＯＸ４０（例えば、ヒトＯＸ４０）のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合ドメインは、配列番号２８１の残基６８～７１、８３～９０、９５、及び９８から選択される、１つ以上のアミノ酸残基（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、または１４の残基）を含むＯＸ４０（例えば、ヒトＯＸ４０）のエピトープに結合する。

【０２２９】

シグナルペプチドを有するヒトＯＸ４０の完全な配列（シグナルペプチドには下線が引いてある）：

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSR
CSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRA
GTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICED
RDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLG
LLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

（配列番号２８１）。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、約０．４５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、約１ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０抗体は、約０．４ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０抗体は、約０．５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、結合親和性は、ラジオイムノアッセイを使用して決定される。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ヒトＯＸ４０及びカニクイザルＯＸ４０に結合する。いくつかの実施形態では、結合は、ＦＡＣＳアッセイを使用して決定される。いくつかの実施形態では、ヒトＯＸ４０への結合は、約０．２ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、ヒトＯＸ４０への結合は、約０．３ｕｇ／ｍｌ以下のＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、カニクイザルＯＸ４０への結合は、約１．５ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有する。いくつかの実施形態では、カニクイザルＯＸ４０への結合は、約１．４ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０を有する。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ラットＯＸ４０またはマウスＯ

Ｘ４０に結合しない。
【０２３３】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＯＸ４０発現細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）においてアポトーシスを誘導しない。いくつかの実施形態では、アポトーシスは、３０ｕｇ／ｍｌの抗体濃度を使用して、例えば、アネキシンＶ及びプロプロジウム（ｐｒｏｐｒｏｄｉｕｍ）ヨウ素染色Ｔｒｅｇを使用してアポトーシスが生じたかどうかを判定することにより、アッセイされる。
【０２３４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、メモリーＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＦＮ－γである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、メモリーＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させることによって、メモリーＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。
【０２３５】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるサイトカイン産生を増加させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＦＮ－γである。
【０２３６】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させ、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるガンマインターフェロン産生を増加させる（例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の、増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して）ことによって、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前のガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の総数、または、例えば、総ＣＤ４＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。
【０２３７】
いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。本方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、個体におけるＣＤ８＋エフェクターＴ細胞は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて強化された増殖、サイトカイン分泌、及び／または細胞溶解活性を有する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。
【０２３８】
いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔエフェクター細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ８＋の割合）を増加させる。い

くつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前のガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、総ＣＤ８＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ８＋細胞の割合）を増加させる。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ８＋の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。本発明の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、総ＣＤ８＋細胞中の、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ８＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて増加する。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、個体におけるメモリーＴ細胞は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて強化された増殖及び／またはサイトカイン分泌を有する。いくつかの実施形態では、メモリーＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、メモリーＴ細胞サイトカイン分泌（レベル）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。本方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、個体におけるＴｒｅｇは、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて減少したエフェクターＴ細胞機能（例えば、増殖及び／またはサイトカイン分泌）の阻害を有する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞の数は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞サイトカイン分泌（レベル）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、エフェクターＴ細胞機能のＴｒｅｇ抑制を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞機能は、エフェクターＴ細胞増殖及び／またはサイトカイン産生である。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞増殖及び／またはエフェクターＴ細胞サイトカイン分泌）のＴｒｅｇ抑制を減少させることによって、Ｔｒｅｇ機能を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、腫瘍内（浸潤性）Ｔｒｅｇの数（例えば、Ｔｒｅｇの総数、または、例えば、ＣＤ４＋細胞中のＦｏｘ３ｐ＋細胞の割合）を低減する。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）Ｔｒｅｇの数（例えば、Ｔｒｅｇの総数、または、例えば、ＣＤ４＋細胞中のＦｏｘ３ｐ＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて低減される。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ４＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。本発明の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ガンマインターフェロンを発現する総ＣＤ４＋細胞、または、例えば、総ＣＤ４＋細胞中の、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の割合）は、ＯＸ４０アゴニスト抗体の投与前と比べて上昇する。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＯＸ４０を発現する標的細胞に

おけるＯＸ４０シグナル伝達を増加させる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０シグナル伝達は、ＮＦｋＢ下流シグナル伝達を監視することによって検出される。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、４０℃で２週間の処理後に安定である。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ヒトＯＸ４０への結合についてＯＸ４０Ｌと競合する。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０Ｌの付加は、インビトロアッセイにおいてＯＸ４０抗体機能を強化しない。

【０２４８】

別の実施形態によれば、ＯＸ４０アゴニスト抗体には、以下の特性のうちの任意の１つ、任意の組み合わせ、または全てが含まれる：（１）約０．４５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．４ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．５ｎＭ以下の親和性でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、結合親和性は、ラジオイムノアッセイを使用して決定される、（２）ヒトＯＸ４０及びカニクイザルＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、結合は、ＦＡＣＳアッセイを使用して決定される、（３）約０．２ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約０．３ｕｇ／ｍｌ以下のＥＣ５０でヒトＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約１．５ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０でカニクイザルＯＸ４０に結合し、いくつかの実施形態では、約１．４ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０でカニクイザルＯＸ４０に結合する、（４）ラットＯＸ４０またはマウスＯＸ４０には実質的に結合しない、（５）（例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して）例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるガンマインターフェロン産生を増加させることによって、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能を強化する、（６）例えば、メモリーＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させることによって、メモリーＴ細胞機能を強化する、（７）例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞増殖、及び／またはエフェクターＴ細胞サイトカイン分泌）のＴｒｅｇ抑制を減少させることによって、Ｔｒｅｇ機能を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である、（８）ＯＸ４０を発現する標的細胞におけるＯＸ４０シグナル伝達を増加させる（いくつかの実施形態では、ＯＸ４０シグナル伝達は、ＮＦｋＢ下流シグナル伝達を監視することによって検出される）、（９）４０℃で２週間の処理後に安定である。

【０２４９】

本開示の任意の好適な組み合わせにおいて、本明細書に記載の抗体及び／またはＦａｂ断片のうちのいずれかにおける使用に好適な、例示的な抗ＯＸ４０　ＨＶＲ、ＶＨ、及びＶＬ配列を表Ａに提供する。

表Ａ．ＯＸ４０抗体配列

名称	配列	配列番号
ヒトＯＸ４０（シグナルペプチドを欠く）	ＬＨＣＶＧＤＴＹＰＳＮＤＲＣＣＨＥＣＲＰ ＧＮＧＭＶＳＲＣＳＲＳＱＮＴＶＣＲＰＣＧ ＰＧＦＹＮＤＶＶＳＳＫＰＣＫＰＣＴＷＣＮ ＬＲＳＧＳＥＲＫＱＬＣＴＡＴＱＤＴＶＣＲ ＣＲＡＧＴＱＰＬＤＳＹＫＰＧＶＤＣＡＰＣ ＰＰＧＨＦＳＰＧＤＮＱＡＣＫＰＷＴＮＣＴ ＬＡＧＫＨＴＬＱＰＡＳＮＳＳＤＡＩＣＥＤ ＲＤＰＰＡＴＱＰＱＥＴＱＧＰＰＡＲＰＩＴ ＶＱＰＴＥＡＷＰＲＴＳＱＧＰＳＴＲＰＶＥ ＶＰＧＧＲＡＶＡＡＩＬＧＬＧＬＶＬＧＬＬ ＧＰＬＡＩＬＬＡＬＹＬＬＲＲＤＱＲＬＰＰ ＤＡＨＫＰＰＧＧＧＳＦＲＴＰＩＱＥＥＱＡ ＤＡＨＳＴＬＡＫＩ	１
ＨＶＲ－Ｈ１－ １Ａ７．ｇｒ．１ １Ａ７．ｇｒ．２ １Ａ７．ｇｒ．３ １Ａ７．ｇｒ．４ １Ａ７．ｇｒ．５ ＩＡ７．ｇｒ．５’ １Ａ７．ｇｒ．６ １Ａ７．ｇｒ．７ １Ａ７．ｇｒ．７’ １Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＳ １Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＡ １Ａ７．ｇｒ．ＮＧＤＡ １Ａ７．ｇｒ．ＳＧＤＳ １Ａ７．ｇｒ．ＮＧＳＳ １Ａ７．Ａｌａ．１ １Ａ７．Ａｌａ．２ １Ａ７．Ａｌａ．３ １Ａ７．Ａｌａ．４ １Ａ７．Ａｌａ．５ １Ａ７．Ａｌａ．６ １Ａ７．Ａｌａ．７ １Ａ７．Ａｌａ．８ １Ａ７．Ａｌａ．９ １Ａ７．Ａｌａ．１０ １Ａ７．Ａｌａ．１１ １Ａ７．Ａｌａ．１２ １Ａ７．Ａｌａ．１３ １Ａ７．Ａｌａ．１４ １Ａ７．Ａｌａ．１５ １Ａ７．Ａｌａ．１６	ＤＳＹＭＳ	２

ＨＶＲ－Ｈ２－		３
１Ａ７．ｇｒ．１		
１Ａ７．ｇｒ．２		
１Ａ７．ｇｒ．３		
１Ａ７．ｇｒ．４		
１Ａ７．ｇｒ．５		
１Ａ７．ｇｒ．５’		
１Ａ７．ｇｒ．６		
１Ａ７．ｇｒ．７		
１Ａ７．ｇｒ．７’		
１Ａ７．ｇｒ．ＤＡ		
１Ａ７．ｇｒ．ＥＳ		
１Ａ７．Ａｌａ．１		
１Ａ７．Ａｌａ．２		
１Ａ７．Ａｌａ．３		
１Ａ７．Ａｌａ．４		
１Ａ７．Ａｌａ．５		
１Ａ７．Ａｌａ．６		
１Ａ７．Ａｌａ．７		
１Ａ７．Ａｌａ．８		
１Ａ７．Ａｌａ．９		
１Ａ７．Ａｌａ．１０		
１Ａ７．Ａｌａ．１１		
１Ａ７．Ａｌａ．１２		
１Ａ７．Ａｌａ．１３		
１Ａ７．Ａｌａ．１４		
１Ａ７．Ａｌａ．１５		
１Ａ７．Ａｌａ．１６	ＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥ	

ＨＶＲ－Ｈ３－		４
１Ａ７．ｇｒ．１		
１Ａ７．ｇｒ．２		
１Ａ７．ｇｒ．３		
１Ａ７．ｇｒ．４		
１Ａ７．ｇｒ．５		
１Ａ７．ｇｒ．５’		
１Ａ７．ｇｒ．６		
１Ａ７．ｇｒ．７		
１Ａ７．ｇｒ．７’		
１Ａ７．ｇｒ．ＤＡ		
１Ａ７．ｇｒ．ＥＳ		
１Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＳ		
１Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＡ		
１Ａ７．ｇｒ．ＮＧＤＡ		
１Ａ７．ｇｒ．ＳＧＤＳ		
１Ａ７．ｇｒ．ＮＧＳＳ		
１Ａ７．ｇｒ．ＤＡＮＡＤＡ		
１Ａ７．Ａｌａ．１		
１Ａ７．Ａｌａ．２		
１Ａ７．Ａｌａ．３		
１Ａ７．Ａｌａ．４		
１Ａ７．Ａｌａ．５		
１Ａ７．Ａｌａ．６		
１Ａ７．Ａｌａ．７		
１Ａ７－Ａｌａ．１５		
１Ａ７．Ａｌａ．１６	ＡＰＲＷＹＦＳＶ	

HVR－L1－ 1A7．gr．1 1A7．gr．2 1A7．gr．3 1A7．gr．4 1A7．gr．5 1A7．gr．5’ 1A7．gr．6 1A7．gr．7 1A7．gr．7’ 1A7．gr．DA 1A7．gr．ES 1A7．gr．NADS 1A7．gr．NADA 1A7．gr．NGDA 1A7．gr．SGDS 1A7．gr．NGSS 1A7．gr．DANA DA 1A7．Ala．1 1A7．Ala．2 1A7．Ala．3 1A7．Ala．4 1A7．Ala．5 1A7．Ala．6 1A7．Ala．7 1A7．Ala．8 1A7．Ala．9 1A7．Ala．10 1A7．Ala．11 1A7．Ala．12 1A7．Ala．13 1A7．Ala．14 1A7．Ala．15 1A7．Ala．16	RASQDISNYLN	5

ＨＶＲ－Ｌ２－ １Ａ７．ｇｒ．１ １Ａ７．ｇｒ．２ １Ａ７．ｇｒ．３ １Ａ７．ｇｒ．４ １Ａ７．ｇｒ．５ １Ａ７．ｇｒ．５’ １Ａ７．ｇｒ．６ １Ａ７．ｇｒ．７ １Ａ７．ｇｒ．７’ １Ａ７．ｇｒ．ＤＡ １Ａ７．ｇｒ．ＥＳ １Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＳ １Ａ７．ｇｒ．ＮＡＤＡ １Ａ７．ｇｒ．ＮＧＤＡ １Ａ７．ｇｒ．ＳＧＤＳ １Ａ７．ｇｒ．ＮＧＳＳ １Ａ７．ｇｒ．ＤＡＮＡＤＡ １Ａ７．Ａｌａ．１ １Ａ７．Ａｌａ．２ １Ａ７．Ａｌａ．３ １Ａ７．Ａｌａ．４ １Ａ７．Ａｌａ．５ １Ａ７．Ａｌａ．６ １Ａ７．Ａｌａ．７ １Ａ７．Ａｌａ．８ １Ａ７．Ａｌａ．９ １Ａ７．Ａｌａ．１０ １Ａ７．Ａｌａ．１１ １Ａ７．Ａｌａ．１２ １Ａ７．Ａｌａ．１３ １Ａ７．Ａｌａ．１４ １Ａ７．Ａｌａ．１５ １Ａ７．Ａｌａ．１６	ＹＴＳＲＬＲＳ	６

HVR－L3－ 1A7.gr.1 1A7.gr.2 1A7.gr.3 1A7.gr.4 1A7.gr.5 1A7.gr.5’ 1A7.gr.6 1A7.gr.7 1A7.gr.7’ 1A7.gr.DA 1A7.gr.ES 1A7.gr.NADS 1A7.gr.NADA 1A7.gr.NGDA 1A7.gr.SGDS 1A7.gr.NGSS 1A7.gr.DANA DA 1A7.Ala.8 1A7.Ala.9 1A7.Ala.10 1A7.Ala.11 1A7.Ala.12 1A7.Ala.13 1A7.Ala.14 1A7.Ala.15 1A7.Ala.16	QQGHTLPPT	7
HVR－H1－ 1A7.gr.DA	DAYMS	8
HVR－H1－ 1A7.gr.ES 1A7.gr.DANA DA	ESYMS	9
HVR－H2－ 1A7.gr.NADS	DMYPDNADSSYNQKFRE	10
HVR－H2－ 1A7.gr.NADA 1A7.gr.DANA DA	DMYPDNADASYNQKFRE	11
HVR－H2－ 1A7.gr.NGDA	DMYPDNGDASYNQKFRE	12
HVR－H2－ 1A7.gr.SGDS	DMYPDSGDSSYNQKFRE	13
HVR－H2－ 1A7.gr.NGSS	DMYPDNGSSSYNQKFRE	14
HVR－H3－ 1A7.Ala.8	APRWYFSA	15

ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．９	ＡＰＲＷＹＡＳＶ	１６
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．１０	ＡＰＲＷＡＦＳＶ	１７
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．１１	ＡＰＡＷＹＦＳＶ	１８
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．１２	ＡＰＲＷＹＦＡＶ	１９
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．１３	ＡＰＲＡＹＦＳＶ	２０
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ａ７．Ａｌａ．１４	ＡＡＲＷＹＦＳＶ	２１
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．１	ＱＱＧＨＴＬＰＡＴ	２２
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．２	ＱＱＧＨＴＡＰＰＴ	２３
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．３	ＱＱＧＡＴＬＰＰＴ	２４
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．４	ＱＱＧＨＡＬＰＰＴ	２５
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．５	ＱＱＡＨＴＬＰＰＴ	２６
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．６	ＱＱＧＨＴＬＡＰＴ	２７
ＨＶＲ－Ｌ３－１Ａ７．Ａｌａ．７	ＱＡＧＨＴＬＰＰＴ	２８

ＨＶＲ－Ｈ１－ ３Ｃ８．ｇｒ．１ ３Ｃ８．ｇｒ．２ ３Ｃ８．ｇｒ．３ ３Ｃ８．ｇｒ．４ ３Ｃ８．ｇｒ．５ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＥＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＱＧ ３Ｃ９．ｇｒ．５．ＤＱ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ ３Ｃ８．ｇｒ．６ ３Ｃ８．ｇｒ．７ ３Ｃ８．ｇｒ．８ ３Ｃ８．ｇｒ．９ ３Ｃ８．ｇｒ．１０ ３Ｃ８．ｇｒ．１１ ３Ｃ８．Ａ．１ ３Ｃ８．Ａ．２ ３Ｃ８．Ａ．３ ３Ｃ８．Ａ．４ ３Ｃ８．Ａ．５ ３Ｃ８．Ａ．６ ３Ｃ８．Ａ．７ ３Ｃ８．Ａ．８ ３Ｃ８．Ａ．９ ３Ｃ８．Ａ．１０	ＮＹＬＩＥ	２９

ＨＶＲ－Ｈ２－ ３Ｃ８．ｇｒ．１ ３Ｃ８．ｇｒ．２ ３Ｃ８．ｇｒ．３ ３Ｃ８．ｇｒ．４ ３Ｃ８．ｇｒ．５ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＥＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＱＧ ３Ｃ８．ｇｒ．６ ３Ｃ８．ｇｒ．７ ３Ｃ８．ｇｒ．８ ３Ｃ８．ｇｒ．９ ３Ｃ８．ｇｒ．１０ ３Ｃ８．ｇｒ．１１ ３Ｃ８．Ａ．１ ３Ｃ８．Ａ．２ ３Ｃ８．Ａ．３ ３Ｃ８．Ａ．４ ３Ｃ８．Ａ．５ ３Ｃ８．Ａ．６ ３Ｃ８．Ａ．７ ３Ｃ８．Ａ．８ ３Ｃ８．Ａ．９ ３Ｃ８．Ａ．１０	ＶＩＮＰＧＳＧＤＴＹＹＳＥＫＦＫＧ	３０
ＨＶＲ－Ｈ２－ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ	ＶＩＮＰＧＳＧＤＡＹＹＳＥＫＦＫＧ	３１
ＨＶＲ－Ｈ２－ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＱ	ＶＩＮＰＧＳＧＤＱＹＹＳＥＫＦＫＧ	３２

ＨＶＲ－Ｈ３－ ３Ｃ８．ｇｒ．１ ３Ｃ８．ｇｒ．２ ３Ｃ８．ｇｒ．３ ３Ｃ８．ｇｒ．４ ３Ｃ８．ｇｒ．５ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＥＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＱＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＱ ３Ｃ８．ｇｒ．６ ３Ｃ８．ｇｒ．７ ３Ｃ８．ｇｒ．８ ３Ｃ８．ｇｒ．９ ３Ｃ８．ｇｒ．１０ ３Ｃ８．ｇｒ．１１ ３Ｃ８．Ａ．１ ３Ｃ８．Ａ．２ ３Ｃ８．Ａ．３ ３Ｃ８．Ａ．４ ３Ｃ８．Ａ．５ ３Ｃ８．Ａ．６ ３Ｃ８．Ａ．７	ＤＲＬＤＹ	３３
ＨＶＲ－Ｈ３－ ３Ｃ８．Ａ．８	ＡＲＬＤＹ	３４
ＨＶＲ－Ｈ３－ ３Ｃ８．Ａ．９	ＤＡＬＤＹ	３５
ＨＶＲ－Ｈ３－ ３Ｃ８．Ａ．１０	ＤＲＡＤＹ	３６

ＨＶＲ－Ｌ１－		３７
３Ｃ８．ｇｒ．１		
３Ｃ８．ｇｒ．２		
３Ｃ８．ｇｒ．３		
３Ｃ８．ｇｒ．４		
３Ｃ８．ｇｒ．５		
３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ		
３Ｃ８．ｇｒ．５．ＥＧ		
３Ｃ８．ｇｒ．５．ＱＧ		
３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ		
３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＱ		
３Ｃ８．ｇｒ．６		
３Ｃ８．ｇｒ．７		
３Ｃ８．ｇｒ．８		
３Ｃ８．ｇｒ．９		
３Ｃ８．ｇｒ．１０		
３Ｃ８．ｇｒ．１１		
３Ｃ８．Ａ．１		
３Ｃ８．Ａ．２		
３Ｃ８．Ａ．３		
３Ｃ８．Ａ．４		
３Ｃ８．Ａ．５		
３Ｃ８．Ａ．６		
３Ｃ８．Ａ．７		
３Ｃ８．Ａ．８		
３Ｃ８．Ａ．９		
３Ｃ８．Ａ．１０	ＨＡＳＱＤＩＳＳＹＩＶ	

ＨＶＲ－Ｌ２－ ３Ｃ８．ｇｒ．１ ３Ｃ８．ｇｒ．２ ３Ｃ８．ｇｒ．３ ３Ｃ８．ｇｒ．４ ３Ｃ８．ｇｒ．５ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＱ ３Ｃ８．ｇｒ．６ ３Ｃ８．ｇｒ．７ ３Ｃ８．ｇｒ．８ ３Ｃ８．ｇｒ．９ ３Ｃ８．ｇｒ．１０ ３Ｃ８．ｇｒ．１１ ３Ｃ８．Ａ．１ ３Ｃ８．Ａ．２ ３Ｃ８．Ａ．３ ３Ｃ８．Ａ．４ ３Ｃ８．Ａ．５ ３Ｃ８．Ａ．６ ３Ｃ８．Ａ．７ ３Ｃ８．Ａ．８ ３Ｃ８．Ａ．９ ３Ｃ８．Ａ．１０	ＨＧＴＮＬＥＤ	３８
ＨＶＲ－Ｌ２－３Ｃ８． ｇｒ５．ＳＧ	ＨＧＴＮＬＥＳ	３９
ＨＶＲ－Ｌ２－３Ｃ８． ｇｒ．５．ＥＧ	ＨＧＴＮＬＥＥ	４０
ＨＶＲ－Ｌ２－３Ｃ８． ｇｒ．５．ＱＧ	ＨＧＴＮＬＥＱ	４１

ＨＶＲ－Ｌ３ ３Ｃ８．ｇｒ．１ ３Ｃ８．ｇｒ．２ ３Ｃ８．ｇｒ．３ ３Ｃ８．ｇｒ．４ ３Ｃ８．ｇｒ．５ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＥＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＱＧ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＡ ３Ｃ８．ｇｒ．５．ＤＱ ３Ｃ８．ｇｒ．６ ３Ｃ８．ｇｒ．７ ３Ｃ８．ｇｒ．８ ３Ｃ８．ｇｒ．９ ３Ｃ８．ｇｒ．１０ ３Ｃ８．ｇｒ．１１ ３Ｃ８．Ａ．８ ３Ｃ８．Ａ．９ ３Ｃ８．Ａ．１０	ＶＨＹＡＱＦＰＹＴ	４２
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．１	ＡＨＹＡＱＦＰＹＴ	４３
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．２	ＶＡＹＡＱＦＰＹＴ	４４
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．３	ＶＨＡＡＱＦＰＹＴ	４５
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．４	ＶＨＹＡＡＦＰＹＴ	４６
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．５	ＶＨＹＡＱＡＰＹＴ	４７
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．６	ＶＨＹＡＱＦＡＹＴ	４８
ＨＶＲ－Ｌ３－ ３Ｃ８．Ａ．７	ＶＨＹＡＱＦＰＡＴ	４９
ＨＶＲ－Ｈ１－ １Ｄ２．ｇｒ．１ １Ｄ２．ｇｒ．２ １Ｄ２．ｇｒ．３	ＤＹＧＶＬ	５０
ＨＶＲ－Ｈ２－１Ｄ２． ｇｒ．１ １Ｄ２．ｇｒ．２ １Ｄ２．ｇｒ．３	ＭＩＷＳＧＧＴＴＤＹＮＡＡＦＩＳ	５１
ＨＶＲ－Ｈ３－１Ｄ２． ｇｒ．１ １Ｄ２．ｇｒ．２ １Ｄ２．ｇｒ．３	ＥＥＭＤＹ	５２

HVR－L1－ 1D2．gr．1 1D2．gr．2 1D2．gr．3	RASQDISNFLN	53
HVR－L2－ 1D2．gr．1 1D2．gr．2 1D2．gr．3	YTSRLHS	54
HVR－L3－ 1D2．gr．1 1D2．gr．2 1D2．gr．3	QQGNTLPWT	55
1A7．gr．1 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	56
1A7．gr．1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	57
1A7．gr．2 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	58
1A7．gr．2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	59
1A7．gr．3 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTLTVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	60
1A7．gr．3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	61

1A7.gr.4 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	62
1A7.gr.4 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKTVKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	63
1A7.gr.5 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	64
1A7.gr.5 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKTVKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	65
1A7.gr.6 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	66
1A7.gr.6 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKTVKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGKDYTLTISSLQP EDFATYFCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	67
1A7.gr.7 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	68
1A7.gr.7 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKTVKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGKDYTLTISSLQP EDFATYFCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	69

1A7.gr.DA V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDAYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	70
1A7.gr.DA V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	71
1A7.gr.ES V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTESYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	72
1A7.gr.ES V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	73
1A7.gr.NADS V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNADSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	74
1A7.gr.NADS V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	75
1A7.gr.NADA V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNADASY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	76
1A7.gr.NADA V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	77

1A7.gr.NGDA V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDASY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	78
1A7.gr.NGDA V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	79
1A7.gr.SGDS V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDSGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	80
1A7.gr.SGDS V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	81
1A7.gr.NGSS V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGSSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	82
1A7.gr.NGSS V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	83
1A7.gr.DANA DA V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDAYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNADASY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	84
1A7.gr.DANA DA V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	85

1A7.Ala.1 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	86
1A7.Ala.1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPATFGQ GTKVEIK	87
1A7.Ala.2 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	88
1A7.Ala.2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTAPPTFGQ GTKVEIK	89
1A7.Ala.3 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	90
1A7.Ala.3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGATLPPTFGQ GTKVEIK	91
1A7.Ala.4 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	92
1A7.Ala.4 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHALPPTFGQ GTKVEIK	93

1A7.Ala.5 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	94
1A7.Ala.5 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQAHTLPPTFGQ GTKVEIK	95
1A7.Ala.6 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	96
1A7.Ala.6 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLAPTFGQ GTKVEIK	97
1A7.Ala.7 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	98
1A7.Ala.7 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQAGHTLPPTFGQ GTKVEIK	99
1A7.Ala.8 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSAWGQGTLVTVSS	100
1A7.Ala.8 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	101

1A7.Ala.9 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYASVWGQGTLVTVSS	102
1A7.Ala.9 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	103
1A7.Ala.10 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWAFSVWGQGTLVTVSS	104
1A7.Ala.10 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	105
1A7.Ala.11 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP AWYFSVWGQGTLVTVSS	106
1A7.Ala.11 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	107
1A7.Ala.12 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFAVWGQGTLVTVSS	108
1A7.Ala.12 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	109

1A7.Ala.13 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAP RAYFSVWGQGTLVTVSS	110
1A7.Ala.13 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	111
1A7.Ala.14 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVLAA RWYFSVWGQGTLVTVSS	112
1A7.Ala.14 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	113
1A7.Ala.15 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCALAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	114
1A7.Ala.15 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	115
1A7.Ala.16 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDSYMSWVRQA PGQGLEWIGDMYPDNGDSSY NQKFRERVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCVAAP RWYFSVWGQGTLVTVSS	116
1A7.Ala.16 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLRSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK	117

3C8.gr.1 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTITRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	118
3C8.gr.1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKAPKLLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	119
3C8.gr.2 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTITADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	120
3C8.gr.2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKAPKLLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	121
3C8.gr.3 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	122
3C8.gr.3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKAPKLLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	123
3C8.gr.4 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTITADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	124
3C8.gr.4 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	125

3C8.gr.5 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	126
3C8.gr.5 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	127
3C8.gr.5.SG V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	128
3C8.gr.5.SG V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	129
3C8.gr.5.EG V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	130
3C8.gr.5.EG V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEEGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	131
3C8.gr.5.QG V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	132
3C8.gr.5.QG V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEQGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	133

3C8.gr.6 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTITADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	134
3C8.gr.6 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGADYTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	135
3C8.gr.7 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	136
3C8.gr.7 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGADYTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	137
3C8.gr.8 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	138
3C8.gr.8 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	139
3C8.gr.9 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	140
3C8.gr.9 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSPKLLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	141

3C8.gr.10 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	142
3C8.gr.10 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKAFKLLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	143
3C8.gr.11 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	144
3C8.gr.11 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKAPKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	145
3C8.A.1 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	146
3C8.A.1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCAHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	147
3C8.A.2 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	148
3C8.A.2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVAYAQFPYTFGQ GTKVEIK	149

3C8.A.3 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	150
3C8.A.3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHAAQFPYTFGQ GTKVEIK	151
3C8.A.4 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	152
3C8.A.4 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAAFPYTFGQ GTKVEIK	153
3C8.A.5 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	154
3C8.A.5 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQAPYTFGQ GTKVEIK	155
3C8.A.6 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	156
3C8.A.6 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFAYTFGQ GTKVEIK	157

3C8.A.7 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR LDYWGQGTLVTVSS	158
3C8.A.7 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPATFGQ GTKVEIK	159
3C8.A.8 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARAR LDYWGQGTLVTVSS	160
3C8.A.8 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	161
3C8.A.9 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDA LDYWGQGTLVTVSS	162
3C8.A.9 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	163
3C8.A.10 V_H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTNYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINPGSGDTYY SEKFKGRVTLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDR ADYWGQGTLVTVSS	164
3C8.A.10 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCHASQDISSYIVWYQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCVHYAQFPYTFGQ GTKVEIK	165

1D2．gr．1 V_H	EVQLVESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSLTDYGVLWIRQP PGKGLEWIGMIWSGGTTDYN AAFISRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCVREEM DYWGQGTLVTVSS	166
1D2．gr．1 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNFLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGNTLPWTFGQ GTKVEIK	167
1D2．gr．2 V_H	EVQLVESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSLTDYGVLWIRQP PGKGLEWIGMIWSGGTTDYN AAFISRVTISKDTSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCVREEM DYWGQGTLVTVSS	168
1D2．gr．2 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNFLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGNTLPWTFGQ GTKVEIK	169
1D2．gr．3 V_H	EVQLVESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSLTDYGVLWVRQP PGKGLEWLGMIWSGGTTDYN AAFISRLTISKDTSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCVREEM DYWGQGTLVTVSS	170
1D2．gr．3 V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNFLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQGNTLPWTFGQ GTKVEIK	171
CON1（1A7）HVR－H1	X_1X_2YMS、式中、X_1はDまたはEであり、X_2はSまたはAである	172
CON1（1A7）HVR－H2	DMYPD$X_1X_2X_3X_4$SYNQKFRE、式中、X_1はNまたはSであり、X_1はAまたはGであり、X_3はDまたはSであり、X_4はAまたはSである	173
CON1（1A7）HVR－H3	APRW$X_1X_2X_3X_4$、式中、X_1はYまたはAであり、X_2はAまたはFであり、X_3はSまたはAであり、X_4はAまたはVである。	174

ＣＯＮ１（１Ａ７）ＨＶＲ－Ｌ３	ＱＸ$_1$Ｘ$_2$Ｘ$_3$Ｘ$_4$Ｘ$_5$Ｘ$_6$Ｘ$_7$Ｔ、式中、Ｘ$_1$はＡまたはＱであり、Ｘ$_2$はＡまたはＧであり、Ｘ$_3$はＡまたはＨであり、Ｘ$_4$はＡまたはＴであり、Ｘ$_5$はＡまたはＬであり、Ｘ$_6$はＡまたはＰであり、Ｘ$_7$はＡまたはＰである。	１７５
ＣＯＮ２（３Ｃ８）ＨＶＲ－Ｈ２	ＶＩＮＰＧＳＧＤＸ$_1$ＹＹＳＥＫＦＫＧ、式中、Ｘ$_1$はＴ、ＡまたはＱである。	１７６
ＣＯＮ２（３Ｃ８）ＨＶＲ－Ｌ２	ＨＧＴＮＬＥＸ$_1$、式中、Ｘ$_1$はＳ、Ｅ、またはＱである。	１７７
ＣＯＮ２（３Ｃ８）ＨＶＲ－Ｌ３	Ｘ$_1$Ｘ$_2$ＹＡＱＦＰＹＸ$_3$、式中、Ｘ$_1$はＶまたはＡであり、Ｘ$_2$はＨまたはＡであり、Ｘ$_3$はＹまたはＡである。	１７８
１Ａ７　Ｖ$_L$	ＤＩＱＭＴＱＴＴＳＳＬＳＡＳＬＧＤＲＶＴＩＳＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＤＧＴＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＲＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＫＤＹＦＬＴＩＳＮＬＥＱＥＤＶＡＡＹＦＣＱＱＧＨＴＬＰＰＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ	１７９
１Ａ７　Ｖ$_H$	ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＫＱＳＨＧＫＴＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＫＶＴＬＴＶＤＫＳＳＴＴＡＹＭＥＦＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＶＬＡＰＲＷＹＦＳＶＷＧＴＧＴＴＶＴＶＳＳ	１８０
３Ｃ８　Ｖ$_L$	ＤＩＬＭＴＱＳＰＳＳＭＳＶＳＬＧＤＴＶＳＩＴＣＨＡＳＱＤＩＳＳＹＩＶＷＬＱＱＫＰＧＫＳＦＲＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＤＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＤＹＳＬＴＩＳＳＬＥＳＥＤＦＡＤＹＹＣＶＨＹＡＱＦＰＹＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ	１８１
３Ｃ８　Ｖ$_H$	ＱＶＱＬＱＱＳＧＡＥＬＶＲＰＧＴＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＡＦＴＮＹＬＩＥＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＶＩＮＰＧＳＧＤＴＹＹＳＥＫＦＫＧＫＶＴＬＴＡＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＦＣＡＲＤＲＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ	１８２
１Ａ７．ｇｒ．５’Ｖ$_H$	ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＲＶＴＬＴＶＤＴＳＴＳＴＡＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＶＬＡＰＲＷＹＦＳＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ	１８３
１Ａ７．ｇｒ．７’Ｖ$_H$	ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＲＶＴＬＴＶＤＴＳＴＳＴＡＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＶＬＡＰＲＷＹＦＳＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ	１８４

１Ａ７　ＨＶＲ－Ｈ１Ｍ３４Ｉ　ｖａｒｉａｎｔ	ＤＳＹＩＳ	２８２
１Ａ７　ＨＶＲ－Ｈ３Ｐ９６Ａ　ｖａｒｉａｎｔ	ＡＡＲＷＹＦＳＶ	２８３
１Ａ７　ＶＨ　Ｍ３４Ｉ　ｖａｒｉａｎｔ	ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＩＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＲＶＴＩＴＲＤＴＳＴＳＴＡＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＶＬＡＰＲＷＹＦＳＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ	２８４
１Ａ７　ＶＨ　Ｐ９６Ａ　ｖａｒｉａｎｔ	ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＲＶＴＩＴＲＤＴＳＴＳＴＡＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＶＬＡＡＲＷＹＦＳＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ	２８５
１Ａ７　ＨＶＲ－Ｌ２Ｒ５３Ｙ　ｖａｒｉａｎｔ	ＹＴＳＹＬＲＳ	２８６
１Ａ７　ＶＬ　Ｒ５３Ｙ　ｖａｒｉａｎｔ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＹＬＲＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＨＴＬＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ	２８７
３Ｃ８　ＨＶＲ－Ｈ１Ｎ３１Ｉ　ｖａｒｉａｎｔ	ＩＹＬＩＥ	２８８
３Ｃ８　ＨＶＲ－Ｈ２Ｋ６４Ｌ　ｖａｒｉａｎｔ	ＶＩＮＰＧＳＧＤＴＹＹＳＥＫＦＬＧ	２８９
３Ｃ８　ＶＨ　Ｎ３１Ｉ＋　Ｋ６４Ｌ　ｖａｒｉａｎｔ	ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＡＦＴＩＹＬＩＥＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＶＩＮＰＧＳＧＤＴＹＹＳＥＫＦＬＧＲＶＴＬＴＡＤＴＳＴＳＴＡＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＤＲＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ	２９０

【０２５０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＮＹＴＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＳＧＳＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＤＲＹＳＱＶＨＹＡＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴ

ＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１８５）の配列を含む重鎖及び／またはＤＩＶＭＴＱＳＰＤＳＬＰＶＴＰＧＥＰＡＳＩＳＣＲＳＳＱＳＬＬＨＳＮＧＹＮＹＬＤＷＹＬＱＫＡＧＱＳＰＱＬＬＩＹＬＧＳＮＲＡＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＶＧＶＹＹＣＱＱＹＹＮＨＰＴＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１８６）の配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体００８の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体００８の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＤＩＱＭＴＱＳＰＤＳＬＰＶＴＰＧＥＰＡＳＩＳＣＲＳＳＱＳＬＬＨＳＮＧＹＮＹＬＤＷＹＬＱＫＡＧＱＳＰＱＬＬＩＹＬＧＳＮＲＡＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＶＧＶＹＹＣＱＱＹＹＮＨＰＴＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１８７）の配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体ＳＣ０２００８の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体ＳＣ０２００８の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＨＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＧＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＧＴＧＧＧＴＹＹＡＤＳＶＭＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＤＮＶＭＧＬＹＷＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１８８）の配列を含む重鎖及び／またはＥＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＤＡＳＮＲＡＴＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＲＳＮＷＰＰＡＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶ

ＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１８９）の配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体０２３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，５５０，１４０号に記載される抗体０２３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＳＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＹＩＳＳＳＳＳＴＩＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＤＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＳＧＷＹＬＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１９０）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＳＳＷＬＡＷＹＱＱＫＰＥＫＡＰＫＳＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＮＳＹＰＰＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１９１）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載される抗体１１Ｄ４の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載される抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＡＭＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＳＷＮＳＧＳＩＧＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＬＹＹＣＡＫＤＱＳＴＡＤＹＹＦＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号１９２）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＥＩＶＶＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＤＡＳＮＲＡＴＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＲＳＮＷＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１９３）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載される抗体１８Ｄ８の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、米国特許第７，９６０，５１５号に記載される抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＳＥＬＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＳＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＥＴＧＥＰＴＹＡＤＤＦＫＧＲＦＶＦＳＬＤＴＳＶＳＴＡＹＬＱＩＳＳＬＫＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＰＹＹＤＹＶＳＹＹＡＭＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号１９４）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＹＬＹＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＨＹＳＴＰＲＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号１９５）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載される抗体ｈｕ１０６－２２２の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載の抗体ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５６】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＥＹＥＦＰＳＨＤＭＳＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＬＶＡＡＩＮＳＤＧＧＳＴＹＹＰＤＴＭＥＲＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＨＹＤＤＹＹＡＷＦＡＹＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（配列番号１９６）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＥＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＫＳＶＳＴＳＧＹＳＹＭＨＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＬＡＳＮＬＥＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＨＳＲＥＬＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１９７）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載される抗体Ｈｕ１１９－１２２の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１２／０２７３２８に記載される抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５７】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１３／０２８２３１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＹＬＧＬＮＹＶＦＩＶＦＬＬＮＧＶＱＳＥＶＫＬＥＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＭＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＡＷＭＤＷＶＲＱＳＰＥＫＧＬＥＷＶＡＥＩＲＳＫＡＮＮＨＡＴＹＹＡＥＳＶＮＧＲＦＴＩＳＲＤＤＳＫＳＳＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＧＩＹＹＣＴＷＧＥＶＦＹＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＴＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１９８）の配列を含む重鎖及び／またはＭＲＰＳＩＱＦＬＧＬＬＬＦＷＬＨＧＡＱＣＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＬＧＧＫＶＴＩＴＣＫＳＳＱＤＩＮＫＹＩＡＷＹＱＨＫＰＧＫＧＰＲＬＬＩＨＹＴＳＴＬＱＰＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＲＤＹＳＦＳＩＳＮＬＥＰＥＤＩＡＴＹＹＣＬＱＹＤＮＬＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１９９）の配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＹＬＧＬＮＹＶＦＩＶＦＬＬＮＧＶＱＳＥＶＫＬＥＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＭＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＡＷＭＤＷＶＲＱＳＰＥＫＧＬＥＷＶＡＥＩＲＳＫＡＮＮＨＡＴＹＹＡＥＳＶＮＧＲＦＴＩＳＲＤＤＳＫＳＳＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＧＩＹＹＣＴＷＧＥＶＦＹＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ（配列番号２１４）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＭＲＰＳＩＱＦＬＧＬＬＬＦＷＬＨＧＡＱＣＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＬＧＧＫＶＴＩＴＣＫＳＳＱＤＩＮＫＹＩＡＷＹＱＨＫＰＧＫＧＰＲＬＬＩＨＹＴＳＴＬＱＰＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＲＤＹＳＦＳＩＳＮＬＥＰＥＤＩＡＴＹＹＣＬＱＹＤＮＬＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫ（配列番号２１５）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０２８２３１に記載される抗体Ｍａｂ　ＣＨ　１１９－４３－１の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０２８２３１に記載される抗体Ｍａｂ　ＣＨ　１１９－４３－１の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５８】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＫＱＫＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＳＤＫＳＳＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳ（配列番号２００）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＴＴＳＳＬＳＡＳＬＧＤＲＶＴＩＳＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＤＧＴＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＳＬＴＩＳＮＬＥＱＥＤＩＡＴＹＦＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲ（配列番号２０１）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２５９】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＳＣＫＴＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＫＱＳＨＧＫＳＬＥＷＩＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹＭＥＦＲＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＡＧＴＴＶＴＶＳＰ（配列番号２０２）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＶＭＴＱＳＨＫＦＭＳＴＳＬＧＤＲＶＳＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＤＲＦＴＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＮＶＱＳＥＤＬＴＤＹＦＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲ（配列番号２０３）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１３／０３８１９１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６０】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＭＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＶＴＩＴＳＤＴＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０４）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０５）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６１】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＭＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＶＴ

ＩＴＳＤＴＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０４）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＦＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０６）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＩＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＡＴＩＴＳＤＴＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０７）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０５）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＩＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＡＴＩＴＳＤＴＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０７）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＦＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０６）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＩＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＡＴＬＴＳＤＫＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０８）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０５）の配列を含む

軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＳＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＲＬＥＷＩＧＹＩＮＰＹＮＤＧＴＫＹＮＥＫＦＫＧＲＡＴＬＴＳＤＫＳＡＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＮＹＹＧＳＳＬＳＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２０８）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＦＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２０６）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン２０Ｅ５の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２０９）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１０）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２０９）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＤＲＦＳＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１１）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６８】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＶＴＬＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２１２）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１０）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２６９】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＶＴＬＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２１２）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＤＲＦＳＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１１）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７０】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＡＴＬＴＶＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２１３）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１０）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７１】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載の抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＫＤＹＴＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＧＩＹＰＮＮＧＧＳＴＹＮＱＮＦＫＤＲＡＴ

ＬＴＶＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＭＧＹＨＧＰＨＬＤＦＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２１３）の配列を含む重鎖可変領域及び／またはＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＱＤＶＧＡＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＨＴＧＶＰＤＲＦＳＧＧＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＩＮＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号２１１）の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＷＯ２０１４／１４８８９５Ａ１に記載される抗体クローン１２Ｈ３の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、アゴニスト抗ヒトＯＸ４０抗体は、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、アゴニスト抗ヒトＯＸ４０抗体は、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９である。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＭＥＤＩ６４６９の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ０５６２である。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＭＥＤＩ０５６２の少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの超可変領域（ＨＶＲ）配列を含む。いくつかの実施形態では、本抗体は、抗体ＭＥＤＩ０５６２の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【０２７６】

非抗体ＯＸ４０アゴニスト

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドは、非抗体ＯＸ４０アゴニストを含む抗原結合領域を含む。非抗体ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で周知である。

【０２７７】

ＯＸ４０Ｌ（別名、ＣＤ１３４Ｌ）は、ＯＸ４０のリガンドとしての機能を果たす。したがって、ＯＸ４０Ｌの一部または全てを提示するアゴニストは、ＯＸ４０アゴニストとしての機能を果たし得る。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＯＸ４０Ｌの細胞外ドメインを１つ以上含み得る。ＯＸ４０Ｌの細胞外ドメインの例としては、ＯＸ４０結合ドメインが挙げられ得る。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＯＸ４０Ｌの細胞外ドメインを１つ以上含むが、タンパク質の他の不溶性ドメイン、例えば、膜貫通ドメインを欠くＯＸ４０Ｌの可溶性形態であり得る。いくつかの実施形態では、

ＯＸ４０アゴニストは、ＯＸ４０Ｌに結合することができるＯＸ４０Ｌの細胞外ドメインを１つ以上含む可溶性タンパク質である。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、米国特許第７，６９６，１７５号または欧州特許第ＥＰ０６７２１４１　Ｂ１号に記載のＯＸ４０アゴニストのうちのいずれか１つであり得る。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＯＸ４０イムノアドヘシン等の国際公開第ＷＯ２００６／１２１８１０号に記載のＯＸ４０アゴニストのうちのいずれか１つであり得る。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。

【０２７９】

エフェクター機能を低減するＦｃ修飾

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体、サブユニット、または抗原結合ポリペプチドは、エフェクター機能（ＣＤＣ及び／またはＡＤＣＣ等）を減衰させるための１つ以上のアミノ酸修飾を含む。例示的な実施形態では、エフェクター機能を減衰させる修飾は、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンを改変する修飾、例えば、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらす修飾である。例示的な実施形態では、エフェクター機能を減衰させる修飾は、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンを改変しない修飾である。ある特定の実施形態では、エフェクター機能を減衰させる修飾は、ヒトエフェクター細胞への結合、１つ以上のＦｃ受容体への結合、及び／またはＦｃ受容体を発現する細胞への結合を低減または排除する。例示的な実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域においてＮ２９７ＧまたはＮ２９７Ａ修飾を含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、以下の修飾、すなわち、減衰したエフェクター機能をもたらす、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇを含む。

【０２８０】

様々な実施形態では、低減したエフェクター機能を有するＦｃ変異型とは、エフェクター機能（例えば、ＣＤＣ、ＡＤＣＣ、及び／またはＦｃＲへの結合等の活性）を、野生型Ｆｃ領域（例えば、他の変異を有し得るが、エフェクター機能を低減する変異は有しないＦｃ領域）によって達成されるエフェクター機能と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％以上低減するＦｃ変異型を指す。ある特定の実施形態では、低減したエフェクター機能を有するＦｃ変異型とは、野生型Ｆｃ領域と比較して、全ての検出可能なエフェクター機能を排除するＦｃ変異型を指す。エフェクター機能を測定するためのアッセイが当該技術分野で既知であり、以下に記載される。

【０２８１】

インビトロ及び／またはインビボ細胞傷害性アッセイを行って、ＣＤＣ及び／またはＡＤＣＣ活性の低減／欠乏を確認することができる。例えば、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠く（故にＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）ことを確実にすることができる。ＡＤＣＣを媒介するための初代細胞であるＮＫ細胞がＦｃγＲＩＩＩのみを発現する一方で、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩを発現する。造血細胞上でのＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）に要約されている。目的の分子の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）を参照されたい）、及びＨｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：１４９９－１５０２（１９８５）、５，８２１，３３７（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６６：１３５１－１３６１（１９８７）を参照されたい）に記載されている。代替的に、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のためのＡＣＴＩ（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（ＣｅｌｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉ

ｅｗ，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）を参照されたい）。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が含まれる。代替的に、または加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、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することができる。Ｃ１ｑ結合アッセイを実行して、抗体がＣ１ｑに結合することができないためにＣＤＣ活性を欠くことを確認することもできる。例えば、ＷＯ２００６／０２９８７９及びＷＯ２００５／１００４０２におけるＣ１ｑ及びＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照されたい。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを行ってもよい（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）を参照されたい）。

【０２８２】

低減したエフェクター機能を有するＦｃ変異型としては、アミノ酸残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７、及び３２９のうちの１つ以上にアミノ酸置換を有するものが挙げられる（米国特許第６，７３７，０５６号）。かかるＦｃ変異型には、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変異型を含む、アミノ酸２６５、２６９、２７０、２９７、及び３２７位のうちの２つ以上に置換を有するＦｃ変異型が含まれる（米国特許第７，３３２，５８１号）。

【０２８３】

ＦｃＲへの改善または減少した結合を有するある特定の抗体変異型が、記載されている（例えば、米国特許第６，７３７，０５６号、ＷＯ２００４／０５６３１２、及びＳｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい）。

【０２８４】

ある特定の実施形態では、本開示は、全てではないが一部のエフェクター機能を有し、それによりインビボでの複合体の半減期が重要であるが、ある特定のエフェクター機能（補体及びＡＤＣＣ等）が不要または有害である用途にとって望ましい候補となる、抗原結合複合体変異型を企図する。インビトロ及び／またはインビボ細胞傷害性アッセイを行って、ＣＤＣ及び／またはＡＤＣＣ活性の低減／欠乏を確認することができる。例えば、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを行って、抗体がＦｃγＲ結合を欠く（故にＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎ結合能力を保持していることを確実にすることができる。ＡＤＣＣを媒介するための初代細胞であるＮＫ細胞がＦｃ（ＲＩＩＩのみを発現する一方で、単球は、Ｆｃ（ＲＩ、Ｆｃ（ＲＩＩ、及びＦｃ（ＲＩＩＩを発現する。造血細胞上でのＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ　ａｎｄ　Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）の頁４６４の表３に要約されている。目的の分子の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）を参照されたい）、及びＨｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：１４９９－１５０２（１９８５）、５，８２１，３３７（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６６：１３５１－１３６１（１９８７）を参照されたい）に記載されている。代替的に、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のためのＡＣＴＩ（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（ＣｅｌｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，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）を参照のこと）。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が含まれる。代

替的に、または加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、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することができる。Ｃ１ｑ結合アッセイを実行して、抗体がＣ１ｑに結合することができないためにＣＤＣ活性を欠くことを確認することもできる。例えば、ＷＯ２００６／０２９８７９及びＷＯ２００５／１００４０２におけるＣ１ｑ及びＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照されたい。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを行ってもよい（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）を参照されたい）。ＦｃＲｎ結合及びインビボクリアランス／半減期の決定は、当該技術分野で既知の方法を使用して行うこともできる（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ，Ｓ．Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ’ｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８（１２）：１７５９－１７６９（２００６）を参照されたい）。

【０２８５】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、米国特許第６，１９４，５５１号、ＷＯ９９／５１６４２、及びＩｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４１７８－４１８４（２０００）に記載されるように、減少したＣ１ｑ結合及び／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）をもたらす、Ｆｃ領域における１つ以上の修飾を含むことができる。例示的な実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、ヒトＩｇＧ１（残基のＥＵ番号付け）のＦｃ領域においてリジン３２２の修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾（複数可）は、例えば、修飾（複数可）を有しないＦｃ領域と比較して、減少したＣ１ｑ結合及び／またはＣＤＣをもたらす。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、米国特許第６，１９４，５５１号、ＷＯ９９／５１６４２、及びＩｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４１７８－４１８４（２０００）に記載されるように、ヒトＩｇＧ１（残基のＥＵ番号付け）のＦｃ領域においてＫ３２２Ａ修飾を含む。他のかかる例示的な修飾（ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における、及び残基のＥＵ番号付けに従う）としては、Ｄ２７０Ｋ、Ｄ２７０Ｖ、Ｐ３２９Ａ、及びＰ３３１Ａが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８６】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、Ｓｔｒｏｈｌ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０；６８５－６９１（２００９）に記載されるように、エフェクター機能を低減するＦｃ領域への修飾を含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、以下のものから選択される１つ以上のアミノ酸残基の修飾を含む（残基のＥＵ番号付け）：

（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２３４及び２３７、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域における２６７及び３２８
（これらの修飾は、Ｆｃドメインのエフェクター機能を低減する）。

【０２８７】

他の例示的な実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、以下のものから選択される、エフェクター機能を減衰させる修飾を含む（残基のＥＵ番号付け）：
（ａ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ。

【０２８８】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＦｃ変異型は、エフェクター機能を減衰させるＮ２９７Ａ修飾を含まない。

【０２８９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるアゴニスト抗原結合複合体は、ＦｃＲ結合の不在下でＯＸ４０に結合し、それを作動する。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるアゴニスト抗原結合複合体は、エフェクター機能を減衰させるＦｃ領域における変異を含有しない同等の抗原結合複合体と比較して、低減されたＦｃＲ結合を有しながらＯＸ４０に結合し、それを作動する。様々な実施形態では、本明細書で提供されるアゴニスト抗原結合複合体は、エフェクター機能を減衰させるＦｃ領域における変異を含有しない同等の抗原結合複合体と比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％以上低減されたＦｃＲ結合を有しながら、ＯＸ４０に結合し、それを作動する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるアゴニスト抗原結合複合体は、エフェクター機能を減衰させるＦｃ領域における変異を含有しない同等の抗原結合複合体と比較して、少なくとも５０％、７５％、８０％、８５％、９０、９５％、９７％、９８％以上低減されたＦｃＲ結合を有しながら、ＯＸ４０に結合し、それを作動する。

【０２９０】

ＩＩＩ．アゴニスト活性を有する抗原結合複合体の産生

本開示のある特定の態様は、細胞表面受容体に対するアゴニスト活性を有する抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）の産生方法に関する。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、本方法は、第１及び第２のサブユニットを構築することと、リンカーを介して第１及び第２のサブユニットを結合することとを含む。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のサブユニットは、二重特異性抗体である。二重特異性または多重特異性抗体を構築するための様々な技法が、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されている（例えば、以下を参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、本方法は、第１のハーフ抗体及び第２のハーフ抗体を提供し、次に、インビトロで第１及び第２のハーフ抗体を構築して、第１のサブユニットまたは二重特異性抗体を形成することを含む。いくつかの実施形態では、第１のハーフ抗体は、第１の抗体重鎖可変ドメ

イン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む。いくつかの実施形態では、第２のハーフ抗体は、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、第３のハーフ抗体及び第４のハーフ抗体を提供し、次に、インビトロで第３及び第４のハーフ抗体を構築して、第２のサブユニットまたは二重特異性抗体を形成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第３のハーフ抗体は、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む。いくつかの実施形態では、第４のハーフ抗体は、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのうちの１つまたは両方は、１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合する第１のハーフ抗体（例えば、VH_1及びVL_1）と、異なるエピトープ（例えば、同じ細胞表面受容体の）に特異的に結合する第２のハーフ抗体（例えば、VH_2及びVL_2）とを含む。いくつかの実施形態では、サブユニットのうちの１つまたは両方は、１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合する第１のハーフ抗体（例えば、VH_1及びVL_1）と、同じエピトープに特異的に結合する第２のハーフ抗体（例えば、VH_2及びVL_2）とを含む。これは、抗原結合複合体（例えば、図３Ａと３Ｂに図示される「ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ」形式）を産生するための例示的な方法を表すが、本開示は、当該技術分野で既知の技法を使用する他の好適な産生方法を企図し、これには二重特異性抗体、異なるリンカー、異なる結合戦略等を生成するための他の技法が含まれる。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットは、リンカーを介して化学的に結合される。様々な化学結合技法が当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されている（例えば、以下を参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、各サブユニットからの１つのハーフ抗体は、操作された遊離システインを含み、操作された遊離システインは、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載される（例えば、以下を参照されたい）技法を用いて結合される。したがって、この非対称性は、１つの対合のみが可能であるため、複合体の一貫した構成を可能にする。例示的な遊離システインは本明細書で記載されており、限定されないが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から選択される重鎖中のシステインアミノ酸、ならびにＩ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から選択される軽鎖中のシステインアミノ酸を含む。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、第１及び第２のサブユニットは、本開示のビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーを介して化学的に結合される。例えば、いくつかの実施形態では、サブユニットの結合には、２つのサブユニットを本開示のビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させ、複合体を精製することが含まれる。当該技術分野で既知の様々な精製技法を使用することができる。いくつかの実施形態では、精製は、サイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーを含む。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、本方法は、抗体及び２つの抗体Ｆａｂ断片を提供し、次に、抗体Ｆａｂ断片のうちの１つを、リンカーを介して２つのハーフ抗体のそれぞれに結合することを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、２つのハーフ抗体を含む。いくつかの実施形態では、各ハーフ抗体は、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）を含む抗体重鎖と、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む抗体軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、各抗体Ｆａｂ断片は、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、それぞれが１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合するVH_1及びVL_1を有す

る２つのハーフ抗体と、それぞれが異なるエピトープ（例えば、同じ細胞表面受容体の）に特異的に結合するＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$を有する２つのＦａｂ断片とを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、それぞれが１つのエピトープ（例えば、細胞表面受容体の）に特異的に結合するＶＨ$_1$及びＶＬ$_1$を有する２つのハーフ抗体と、それぞれが細胞表面受容体の同じエピトープに特異的に結合するＶＨ$_2$及びＶＬ$_2$を有する２つのＦａｂ断片とを含む。これは、抗原結合複合体（例えば、図３Ａと３Ｂに図示される「ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ」形式）を産生するための例示的な方法を表すが、本開示は、当該技術分野で既知の技法を使用する他の好適な産生方法を企図し、これには、異なるリンカー（例えば、ポリペプチドリンカー）、異なる結合戦略（例えば、Ｆａｂ断片（複数可）に連結される単一鎖抗体またはハーフ抗体を使用した遺伝的結合）等が含まれる。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、２つのＦａｂ断片は、リンカーを介して抗体にそれぞれ化学的に結合される。様々な化学結合技法が当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されている（例えば、以下を参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、各ハーフ抗体及びＦａｂ断片は、操作された遊離システインを含み、各Ｆａｂ断片は、操作された遊離システインを介して１つのハーフ抗体に結合され、操作された遊離システインは、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載される（例えば、以下を参照されたい）技法を用いて結合される。例示的な遊離システインは本明細書で記載されており、限定されないが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）から選択される重鎖中のシステインアミノ酸、ならびにＣ末端システイン、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から選択される軽鎖中のシステインアミノ酸を含む。例えば、ある特定の実施形態では（例えば、図６と７に関して記載される）、各Ｆａｂ断片は、Ｆａｂ断片上のＣ末端の操作された遊離システイン及び抗体軽鎖上のＫ１４９Ｃの操作された遊離システインを使用して、リンカーを介して抗体軽鎖に化学的に結合される。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、抗体及び２つのＦａｂ断片は、本開示のビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーを介して化学的に結合される。例えば、いくつかの実施形態では、サブユニットの結合は、２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれをビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させて、２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片を形成することと、過剰なビス－マレイミドＰＥＧリンカーを除去することと、２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片のそれぞれを抗体と反応させて複合体を形成することと、複合体を精製することとを含む。当該技術分野で既知の様々な精製技法を使用することができる。いくつかの実施形態では、精製は、サイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーを含む。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、本方法は、宿主細胞において、２つの抗体重鎖を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、各抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_1$）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン（ＣＨ１$_1$）、第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン（ＣＨ１$_2$）、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む。いくつかの実施形態では、各ＶＨ$_1$及び／または各ＣＨ１$_1$は、例えば、ＶＨ$_1$及び／またはＣＨ１$_1$の修飾と比較して、垂直対合のための第１の修飾を含み、各ＶＨ$_2$及び／または各ＣＨ１$_2$は、垂直対合のための異なる第２の修飾を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、宿主細胞において、２つの第１の抗体軽鎖を発現させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、２つの第１の抗体軽鎖のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ$_1$）を含む。いくつかの実施形態では、ＶＬ$_1$及び／またはＣＬ$_1$は、抗体重鎖の第１の修飾と垂直対合するための修飾を含む。い

くつかの実施形態では、本方法は、宿主細胞において、２つの第２の抗体軽鎖を発現させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、２つの第２の抗体軽鎖のそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（$ＣＬ_2$）を含む。いくつかの実施形態では、$ＶＬ_2$及び／または$ＣＬ_2$は、抗体重鎖の第２の修飾と垂直対合するための修飾を含む。宿主細胞における発現時に、２つの重鎖のそれぞれが垂直対合を介して第１の抗体軽鎖と結合し、２つの重鎖のそれぞれが垂直対合を介して第２の抗体軽鎖と結合する、２つの抗体重鎖が会合する。いくつかの実施形態では、抗原結合複合体は二重エピトープである。これは、抗原結合複合体（例えば、図３Ａと３Ｂに図示される「ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ」形式）を産生するための例示的な方法を表すが、本開示は、当該技術分野で既知の技法を使用する他の好適な産生方法を企図し、これには、異なるリンカー（例えば、ポリペプチドリンカー）、異なる結合戦略（例えば、Ｆａｂ断片（複数可）に連結される単一鎖抗体またはハーフ抗体を使用した遺伝的結合）等が含まれる。

【０２９８】

例示的な垂直変異型対合は、本明細書に記載されており、さらなる説明については、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２８８５０を参照されたい。例えば、いくつかの実施形態では、抗体重鎖の第１及び／または第２の修飾は、ＶＨ－Ｑ３９Ｋ、ＶＨ－Ｑ３９Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ、ＣＨ１－Ａ１４１Ｉ、ＣＨ１－Ｆ１７０Ｓ、ＣＨ１－Ｓ１８１Ｍ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ａ、及びＣＨ１－Ｖ１８５Ａ（ＥＵ番号付け）から選択される。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２の抗体軽鎖の修飾は、ＶＬ－Ｑ３８Ｅ、ＶＬ－Ｑ３８Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ、ＣＬ－Ｆ１１６Ａ、ＣＬ－Ｌ１３５Ｖ、ＣＬ－Ｓ１７４Ａ、ＣＬ－Ｓ１７６Ｆ、及びＣＬ－Ｔ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）から選択される。

【０２９９】

二重特異性抗体

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗原結合ポリペプチド、サブユニット、または抗体は、多重特異性、例えば、二重特異性である。多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる部位またはエピトープに対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体、サブユニット、または抗原結合ポリペプチドは、同じ標的、例えば細胞表面受容体の少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する。

【０３００】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、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，Ｎａｔｕｒｅ３０５：５３７（１９８３））、ＷＯ９３／０８８２９、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：３６５５（１９９１）を参照されたい）、ならびに「ノブ・イン・ホール（ｋｎｏｂ－ｉｎ－ｈｏｌｅ）」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング（ｅｌｅｃｔｒｏｓｔａｔｉｃ ｓｔｅｅｒｉｎｇ）効果を操作して抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製すること（ＷＯ２００９／０８９００４Ａ１）、２つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号、及びＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）を参照されたい）、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）を参照されたい）、及び単一鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体を使用すること（例えば、Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照されたい）、ならびに例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１

）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、例えば、以下に例示されるように、二重特異性抗体は、「ノブ・イン・ホール」操作によって作製される。例えば、第１のハーフ抗体が突起を形成するそのＣＨ３ドメインにアミノ酸修飾を含み、第２のハーフ抗体が空隙を形成するそのＣＨ３ドメインにアミノ酸修飾を含む、２つのハーフ抗体がインビトロで二重特異性抗体に構築され得る。突起は空隙内に配置可能であり、それにより、構築時に二重特異性抗体を形成する。

【０３０２】

このアプローチにおいて、２つの免疫グロブリンポリペプチド（例えば、重鎖ポリペプチド）はそれぞれ、界面を含む。一方の免疫グロブリンポリペプチドの界面は、他方の免疫グロブリンポリペプチドの対応する界面と相互作用し、それにより、２つの免疫グロブリンポリペプチドが会合できる。これらの界面は、一方の免疫グロブリンポリペプチドの界面に位置する「ノブ」または「突起」（これらの用語は、本明細書で互換的に使用され得る）は、他方の免疫グロブリンポリペプチドの界面に位置する「ホール」または「空隙」（これらの用語は、本明細書で互換的に使用され得る）に対応するように操作され得る。いくつかの実施形態では、ホールは、ノブと同一または同様のサイズのものであり、２つの界面が相互作用するときに、一方の界面のノブが他方の界面の対応するホール内に配置可能であるように好適に位置付けられる。理論に束縛されることを望むものではないが、これは、ヘテロ多量体を安定させ、かつ他の種、例えば、ホモ多量体よりもヘテロ多量体の形成を好むと考えられる。いくつかの実施形態では、このアプローチは、２つの異なる免疫グロブリンポリペプチドのヘテロ多量体化を促進し、異なるエピトープに対する結合特異性を有する２つの免疫グロブリンポリペプチドを含む二重特異性抗体を作製するために使用され得る。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、ノブは、小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖で置き換えることにより構築され得る。いくつかの実施形態では、ホールは、大きいアミノ酸側鎖をより小さい側鎖で置き換えることにより構築され得る。ノブまたはホールは、元の界面内に存在し得るか、またはそれらは合成的に導入され得る。例えば、ノブまたはホールは、界面をコードする核酸配列を改変させて、少なくとも１つの「元の」アミノ酸残基を少なくとも１つの「移入」アミノ酸残基で置き換えることにより合成的に導入され得る。核酸配列を改変するための方法には、当該技術分野で周知の標準の分子生物学技法が含まれ得る。様々なアミノ酸残基の側鎖容積は、以下の表に示される。いくつかの実施形態では、元の残基は、小さい側鎖容積（例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン、またはバリン）を有し、ノブを形成するための移入残基は、天然に存在するアミノ酸であり、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンを含み得る。いくつかの実施形態では、元の残基は、大きい側鎖容積（例えば、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン）を有し、ホールを形成するための移入残基は、天然に存在するアミノ酸であり、アラニン、セリン、スレオニン、及びバリンを含み得る。

表Ｂ．アミノ酸残基の特性

アミノ酸	一文字略語	質量[a]（ダルトン）	体積[b]（Å^3）	利用可能な表面積[c]（Å^2）
アラニン（Ａｌａ）	Ａ	７１．０８	８８．６	１１５
アルギニン（Ａｒｇ）	Ｒ	１５６．２０	１７３．４	２２５
アスパラギン（Ａｓｎ）	Ｎ	１１４．１１	１１７．７	１６０
アスパラギン酸（Ａｓｐ）	Ｄ	１１５．０９	１１１．１	１５０
システイン（Ｃｙｓ）	Ｃ	１０３．１４	１０８．５	１３５
グルタミン（Ｇｌｎ）	Ｑ	１２８．１４	１４３．９	１８０
グルタミン酸（Ｇｌｕ）	Ｅ	１２９．１２	１３８．４	１９０
グリシン（Ｇｌｙ）	Ｇ	５７．０６	６０．１	７５
ヒスチジン（Ｈｉｓ）	Ｈ	１３７．１５	１５３．２	１９５
イソロイシン（Ｉｌｅ）	Ｉ	１１３．１７	１６６．７	１７５
ロイシン（Ｌｅｕ）	Ｌ	１１３．１７	１６６．７	１７０
リジン（Ｌｙｓ）	Ｋ	１２８．１８	１６８．６	２００
メチオニン（Ｍｅｔ）	Ｍ	１３１．２１	１６２．９	１８５
フェニルアラニン（Ｐｈｅ）	Ｆ	１４７．１８	１８９．９	２１０
プロリン（Ｐｒｏ）	Ｐ	９７．１２	１２２．７	１４５
セリン（Ｓｅｒ）	Ｓ	８７．０８	８９．０	１１５
スレオニン（Ｔｈｒ）	Ｔ	１０１．１１	１１６．１	１４０
トリプトファン（Ｔｒｐ）	Ｗ	１８６．２１	２２７．８	２５５
チロシン（Ｔｙｒ）	Ｙ	１６３．１８	１９３．６	２３０
バリン（Ｖａｌ）	Ｖ	９９．１４	１４０．０	１５５

[a]アミノ酸の分子量から水の分子量を差し引いたものである。値は、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃｓ，４３^{ｒｄ} ｅｄ．Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｕｂｂｅｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，１９６１からのものである。

[b]値は、Ａ．Ａ．Ｚａｍｙａｔｎｉｎ，Ｐｒｏｇ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：１０７－１２３，１９７２からのものである。

[c]値は、Ｃ．Ｃｈｏｔｈｉａ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：１－１４，１９７５からのものである。利用可能な表面積は、この参考文献の図６～２０に定義されている。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、ノブまたはホールを形成するための元の残基は、ヘテロ多量体の三次元構造に基づいて特定される。三次元構造を得るための当該技術分野で既知の技法には、Ｘ線結晶学及びＮＭＲが含まれ得る。いくつかの実施形態では、界面は、免疫グロブリン定常ドメインのＣＨ３ドメインである。これらの実施形態では、ヒトＩｇＧ$_1$のＣＨ３／ＣＨ３界面は、４つの逆平行βストランド上に位置する各ドメイン上に１６個の残基を伴う。理論に束縛されることを望むものではないが、変異残基は好ましくは、ノブがパートナーＣＨ３ドメイン内の補償ホールよりも周囲の溶媒により収容され得る危険性を最小限に抑えるように、２つの中央逆平行βストランド上に位置する。いくつかの実施形態では、２つの免疫グロブリンポリペプチド内の対応するノブ及びホールを形成する変異は、以下の表に提供される１つ以上の対に対応する。

表Ｃ．対応するノブ及びホール形成変異の例示的なセット

第１の免疫グロブリンのＣＨ３	第２の免疫グロブリンのＣＨ３
Ｔ３６６Ｙ	Ｙ４０７Ｔ
Ｔ３６６Ｗ	Ｙ４０７Ａ
Ｆ４０５Ａ	Ｔ３９４Ｗ
Ｙ４０７Ｔ	Ｔ３６６Ｙ
Ｔ３６６Ｙ：Ｆ４０５Ａ	Ｔ３９４Ｗ：Ｙ４０７Ｔ
Ｔ３６６Ｗ：Ｆ４０５Ｗ	Ｔ３９４Ｓ：Ｙ４０７Ａ
Ｆ４０５Ｗ：Ｙ４０７Ａ	Ｔ３６６Ｗ：Ｔ３９４Ｓ
Ｆ４０５Ｗ	Ｔ３９４Ｓ

変異は、元の残基、続いて、Ｋａｂａｔ番号付けシステムを使用した位置、その後、移入残基により表示されている（全ての残基は、一文字のアミノ酸コードで示されている）。複数の変異は、コロンで区切られている。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリンポリペプチドは、上の表Ｃに列記される１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、表Ｃの左側の欄に列記される１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを含む第１の免疫グロブリンポリペプチドと、表Ｃの右側の欄に列記される１つ以上の対応するアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを含む第２の免疫グロブリンポリペプチドとを含む。

【０３０６】

上記で考察されるようにＤＮＡを変異させた後、１つ以上の対応するノブまたはホール形成変異を有する修飾された免疫グロブリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野で既知の標準の組換え技法及び細胞系を使用して発現及び精製され得る。例えば、米国特許第５，７３１，１６８号、同第５，８０７，７０６号、同第５，８２１，３３３号、同第７，６４２，２２８号、同第７，６９５，９３６号、同第８，２１６，８０５号、米国公開第２０１３／００８９５５３号、及びＳｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３１：７５３－７５８，２０１３を参照されたい。修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、Ｅ．ｃｏｌｉ等の原核宿主細胞、またはＣＨＯ細胞等の真核宿主細胞を使用して産生され得る。対応するノブ及びホールを持つ免疫グロブリンポリペプチドは、共培養物中で、宿主細胞で発現され、ヘテロ多量体として一緒に精製され得るか、またはそれらは、単一培養物中で発現され、別個に精製され、インビトロで構築され得る。いくつかの実施形態では、細菌宿主細胞の２つの菌株（一方はノブを有する免疫グロブリンポリペプチドを発現し、他方はホールを有する免疫グロブリンポリペプチドを発現する）は、当該技術分野で既知の標準の細菌培養技法を使用して共培養される。いくつかの実施形態では、２つの菌株は、例えば、培養物中において等しい発現レベルを達成するように、特定の比率で混合され得る。いくつかの実施形態では、２つの菌株は、５０：５０、６０：４０、または７０：３０の比率で混合され得る。ポリペプチドが発現した後、細胞が一緒に溶解され得、タンパク質が抽出され得る。ホモ多量体種対ヘテロ多量体種の存在量の測定を可能にする当該技術分野で既知の標準の技法には、サイズ排除クロマトグラフィーが含まれ得る。いくつかの実施形態では、各修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、標準の組換え技法を使用して別個に発現され、それらはインビトロで一緒に構築され得る。構築は、例えば、各修飾された免疫グロブリンポリペプチドを精製し、それらを等しい質量で一緒に混合及びインキュベートし、ジスルフィドを還元し（例えば、ジチオスレイトールで処理することにより）、濃縮し、ポリペプチドを再酸化することにより達成され得る。形成された二重特異性抗体は、カチオン交換クロマトグラフィーを含む標準の技法を使用して精製され得、サイズ排除クロマトグラフィーを含む標準の技法を使用して測定され得る。これらの方法のより詳細な説明について

は、Ｓｐｅｉｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３１：７５３－８，２０１３を参照されたい。いくつかの実施形態では、修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、ＣＨＯ細胞で別個に発現され、上述の方法を使用してインビトロで構築され得る。

【０３０７】

異なるアプローチに従って、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）が免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合は、好ましくは、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。融合物のうちの少なくとも１つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが典型的である。免疫グロブリン重鎖融合物と、所望の場合、免疫グロブリン軽鎖とをコードするＤＮＡは、別個の発現ベクターに挿入され、好適な宿主生物に共トランスフェクトされる。これにより、構築に使用される３つのポリペプチド鎖の不等比が最適収率をもたらす実施形態では、３つのポリペプチド断片の相互比率の調整において優れた柔軟性が提供される。しかしながら、等比での少なくとも２つのポリペプチド鎖の発現により高収率がもたらされる場合、またはそれらの比が特に重要ではない場合に、２つまたは３つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を１つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【０３０８】

このアプローチの一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームに第１の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対（第２の結合特異性を提供する）とで構成される。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が分離の容易な方法を提供するため、この非対称構造が、所望の二重特異性化合物の望ましくない免疫グロブリン鎖組み合わせからの分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、ＷＯ９４／０４６９０に開示されている。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照されたい。

【０３０９】

ＷＯ９６／２７０１１に記載の別のアプローチによれば、一対の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を最大化するように操作され得る。１つの界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１の抗体分子の界面からの１つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えられる。大きい側鎖（複数可）と同一のまたは類似のサイズの代償性「空隙」が、大きいアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置き換えることにより、第２の抗体分子の界面上に作製される。これは、ホモ二量体等の他の望ましくない最終産物を上回るヘテロ二量体の収率を増加させるための機序を提供する。

【０３１０】

二重特異性抗体としては、架橋または「ヘテロコンジュゲート」抗体が挙げられる。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体のうちの一方がアビジンに結合され得、他方がビオチンに結合され得る。かかる抗体は、例えば、望ましくない細胞に対して免疫系細胞の標的とするために（米国特許第４，６７６，９８０号）、かつＨＩＶ感染を治療するために（ＷＯ９１／００３６０、ＷＯ９２／２００３７３、及びＥＰ０３０８９）提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤が当該技術分野で周知であり、いくつかの架橋技法と共に米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０３１１】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技法もこの文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Ｂｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体がタンパク質分解

的に切断されてＦ（ａｂ’）$_2$断片が生成される手順を記載している。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、隣接ジチオールを安定させ、分子間ジスルフィド形成を阻止する。次いで、生成されたＦａｂ’断片は、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換される。Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体のうちの１つが、メルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ’－チオールに再変換され、等モル量の他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合されて、二重特異性抗体が形成される。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【０３１２】

近年の進歩により、化学的に結合されて二重特異性抗体を形成し得るＦａｂ’－ＳＨ断片をＥ．ｃｏｌｉから直接回収することが容易になった。Ｓｈａｌａｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）は、完全ヒト化二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の産生を記載する。各Ｆａｂ’断片は、Ｅ．ｃｏｌｉから別個に分泌され、インビトロでの指向性化学的結合にかけられて、二重特異性抗体が形成された。

【０３１３】

二重特異性抗体断片を組換え細胞培養物から直接作製及び単離するための様々な技法についても記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合により２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結された。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、その後、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生にも利用され得る。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８（１９９３）により記載される「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的機序を提供している。断片は、同じ鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。したがって、１つの断片のV_H及びV_Lドメインは、別の断片の相補的なV_L及びV_Hドメインと対合させられ、それにより、２つの抗原結合部位が形成される。単一鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体を使用して二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１５２：５３６８（１９９４）を参照されたい。

【０３１４】

二重特異性抗体断片を作製するための別の技法は、「二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー」またはＢｉＴＥ（登録商標）アプローチである（例えば、ＷＯ２００４／１０６３８１、ＷＯ２００５／０６１５４７、ＷＯ２００７／０４２２６１、及びＷＯ２００８／１１９５６７を参照されたい）。このアプローチは、単一のポリペプチド上に配列された２つの抗体可変ドメインを利用する。例えば、単一のポリペプチド鎖は、それぞれが可変重鎖（V_H）及び可変軽鎖（V_L）ドメインを有する２つの単一鎖Ｆｖ（ｓＣＦｖ）断片を含み、これらのドメインは、２つのドメイン間の分子内会合を可能にする十分な長さのポリペプチドリンカーにより分離される。この単一のポリペプチドは、２つのｓＣＦｖ断片間のポリペプチドスペーサー配列をさらに含む。各ｓＣＦｖは、異なるエピトープを認識し、２つの異なる細胞型の細胞が、各ｓＣＦｖがその同族のエピトープと係合するときに近接近するかまたは係留されるように、これらのエピトープは、異なる細胞型に対して特異的であり得る。このアプローチの１つの特定の実施形態は、免疫細胞により発現される細胞表面抗原を認識するｓＣＦｖ、例えば、Ｔ細胞上のＣＤ３ポリペプチドを含み、これは、悪性または腫瘍細胞等の標的細胞により発現される細胞表面抗原を認識する別のｓＣＦｖに連結する。

【０３１５】

それが単一のポリペプチドであるため、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーは、当該技術分野で既知の任意の原核または真核細胞発現系、例えば、ＣＨＯ細胞株を使用して発現さ

れ得る。しかしながら、特定の精製技法（例えば、ＥＰ１６９１８３３を参照されたい）が、単量体二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーを、単量体の意図される活性以外の生物活性を有し得る他の多量体種から分離するために必要であり得る。１つの例示的な精製スキームにおいて、分泌ポリペプチドを含有する溶液はまず、金属親和性クロマトグラフィーにかけられ、ポリペプチドは、イミダゾール濃度の勾配を用いて溶出される。この溶出物は、アニオン交換クロマトグラフィーを使用してさらに精製され、ポリペプチドは、塩化ナトリウム濃度の勾配を用いて使用して溶出される。最後に、この溶出物は、サイズ排除クロマトグラフィーにかけられ、多量体種から単量体が分離される。

【０３１６】

多重特異性抗体を作製するための方法の追加説明は、Ｓｐｉｅｓｓ，Ｃ．ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６７：９５－１０６（例えば、表２を参照されたい）に見出すことができる。これらには、限定されないが、以下の技術が含まれる（第１及び第２の重鎖における例示的な変異が含まれる）：ノブ－イントゥ－ホール（第１の重鎖におけるＴ３６６Ｗ；第２の重鎖におけるＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖ）、ＤｕｏＢｏｄｙ（登録商標）（第１の重鎖におけるＦ４０５Ｌ；第２の重鎖におけるＫ４０９Ｒ）、Ａｚｙｍｅｔｒｉｃ（商標）（第１の重鎖におけるＴ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、及びＹ４０７Ｖ；第２の重鎖におけるＴ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ、及びＴ３９４Ｗ）、Ａｍｇｅｎ電荷対（第１の重鎖におけるＫ４０９Ｄ及びＫ３９２Ｄ；第２の重鎖におけるＤ３９９Ｋ及びＥ３５６Ｋ）、Ｒｉｎａｔ－Ｐｆｉｚｅｒ電荷対（第１の重鎖におけるＤ２２１Ｅ、Ｐ２２８Ｅ、及びＬ３６８Ｅ；第２の重鎖におけるＤ２２１Ｒ、Ｐ２２８Ｒ、及びＫ４０９Ｒ）、ＨＡ－ＴＦ（第１の重鎖におけるＳ３６４Ｈ及びＦ４０５Ａ；第２の重鎖におけるＹ３４９Ｔ及びＴ３９４Ｆ）、ＳＥＥＤＢｏｄｙ（第１及び第２の重鎖におけるＩｇＡ／Ｇキメラ）、及び差別的プロテインＡ親和性（第１の重鎖におけるＨ４３５Ｒ）。

【０３１７】

結合

いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチド、抗体、またはサブユニットが結合される。いくつかの実施形態では、抗体及び１つ以上のＦａｂ断片が結合される。本明細書で使用される場合、結合された、及びその文法的変形は、２つ以上の巨大分子が１つ以上の化学結合または力（例えば、非共有結合、共有結合、イオン結合もしくは電荷－電荷相互作用、水素結合、芳香族スタッキング相互作用、またはファンデルワールス相互作用）によって接続または接合されている状態を指し得る。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、巨大分子は、別の実体として提供され、例えば、化学反応を介して化学的に一緒に結合され得る。非限定的な例として、本明細書に記載され、例示されるｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式（例えば、図３Ａと３Ｂを参照されたい）は、それぞれ、２つの抗体（例えば二重特異性抗体）、または抗体及び２つ以上のＦａｂ断片を化学的に結合することにより産生され得る。いくつかの実施形態では、２つの巨大分子を化学的に結合することは、本開示のリンカーで巨大分子を接合することを含み得る。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、巨大分子は、区別可能な単位または分子を含むが、単一の実体（例えば、単一のポリペプチド鎖）として遺伝的にまたは組換えにより産生された単位または分子を含み得る。非限定的な例として、本明細書に記載され、例示されるｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式（図３Ａと３Ｂを参照されたい）は、Ｆａｂ断片またはＦｖを結合することにより産生され得る。いくつかの実施形態では、２つの巨大分子を結合することは、遺伝的結合を含み得、それにより、２つの巨大分子は、単一のポリヌクレオチドまたはオープンリーディングフレームによりコードされ、単一のポリペプチド鎖として発現されるように操作される（例えば、組換え技法を用いて）。いくつかの実施形態では、２つの巨大分子を遺伝的に結合することは、本開示のリンカーで巨大分子を操

作することを含み得る。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチドまたはサブユニットは、リンカーを介して結合される。いくつかの実施形態では、抗体及び２つ以上のＦａｂ断片は、リンカーを介して結合される。例えば、２つの抗体（例えば、２つの二重特異性抗体）または抗体及び２つ以上のＦａｂ断片は、リンカーを介して結合され得る。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、本開示のリンカーは、約１０Å～約１００Å長である。例えば、本開示のリンカーは、１５Å、２０Å、２５Å、３０Å、３５Å、４０Å、４５Å、５０Å、５５Å、６０Å、６５Å、７０Å、７５Å、８０Å、８５Å、９０Å、９５Å、及び１００Åの上限、及び１０Å、１５Å、２０Å、２５Å、３０Å、３５Å、４０Å、４５Å、５０Å、５５Å、６０Å、６５Å、７０Å、７５Å、８０Å、８５Å、９０Å、及び９５Åの独立して選択される下限を有する長さの範囲内の任意の長さを有し得、上限は低減よりも大きい。

【０３２２】

様々なリンカーが当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、リンカーは、化学リンカーであり得る。好適な化学リンカーは、当該技術分野で既知であり、市販されている。例示的な化学リンカーとしては、例えば、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＮＨＳ）、スベリン酸ジスクシンイミジル（ＤＳＳ）、スベリン酸ビス（スルホスクシンイミジル）（$ＢＳ^{3}$）、ジチオビス（プロピオン酸スクシンイミジル）（ＤＳＰ）、ジチオビス（スルホプロピオン酸スクシンイミジル）（ＤＴＳＳＰ）、エチレングリコビス（コハク酸スクシンイミジル）（ＥＧＳ）、エチレングリコビス（コハク酸スルホスクシンイミジル）（スルホ－ＥＧＳ）、酒石酸ジスクシンイミジル（ＤＳＴ）、酒石酸ジスルホスクシンイミジル（スルホ－ＤＳＴ）、ビス［２－（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ）、及びビス［２－（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ－ＢＳＯＣＯＥＳ）が挙げられる。

【０３２３】

ある特定の実施形態では、リンカーは、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーであり得る。ＰＥＧリンカーは、例えば、所望の長さを達成するために、いくつかのＰＥＧ単位で構成され得る。様々なＰＥＧ長が利用され得ることが企図される。例えば、いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１個のＰＥＧサブユニットを含む。ある特定の実施形態では、ＰＥＧリンカーは、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリンカーであり得る。一実施形態では、ポリペプチドリンカーは、抗体、またはその変異型からのヒンジ配列である。例えば、ヒンジ配列は、抗体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３もしくはＩｇＧ４抗体、またはその断片もしくは誘導体等の、アミノ酸残基２１６～２３８（ＥＵ番号付け）を含み得る。例示的な実施形態では、ヒンジに基づくリンカーは、配列ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰ（配列番号２１９）、またはその断片もしくは誘導体を含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、様々な長さ（例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０以上のアミノ酸）の可撓性リンカーであり得る。好適なリンカーは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，９（３），２９９－３０５，１９９６を参照されたい。例示的なペプチドリンカーは、例えば、

Ｓｅｒ

Ｇｌｙ－Ｓｅｒ

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ

Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２０）
Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２１）
Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２２）
Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２３）
Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２４）
Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２５）
Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号２２６）
Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号２２７）
（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_n$（配列番号２２８）、及び
（Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ）$_n$（配列番号２２９）を含み、
ｎは、１以上の整数である。ある特定の実施形態では、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０であり得る。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチドまたはサブユニットは、クリックケミストリーを介して結合される。いくつかの実施形態では、抗体及び２つ以上のＦａｂ断片は、クリックケミストリーを介して結合される。例えば、２つの抗体（例えば、２つの二重特異性抗体）または抗体及び２つ以上のＦａｂ断片は、クリックケミストリーを介して結合され得る。当該技術分野で既知であるクリックケミストリーは、典型的には本来双直交であり、２つ以上の分子化学単位を接合するために使用され、形成が容易であり、広く適用可能であり、高収率であり、立体特異的及び／または位置特異的であり、酸素及び水に反応しにくく、容易に入手可能な試薬を使用し、及び／または非クロマトグラフ方法により除去可能な無害な副産物を生成する、様々な化学反応を指し得る。クリック反応の例示的なクラスとしては、限定されないが、環化付加（例えば、１，３－双極環化付加）、非アルドールカルボニルケミストリー、求核開環、及び炭素－炭素多重結合への付加が挙げられる。クリックケミストリー及び例示的なクリック反応の追加説明は、例えば、Ｔｈｉｒｕｍｕｒｕｇａｎ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．１１３：４９０５－４９７９に見出すことができる。

【０３２６】

いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチドは、テトラジン－トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）クリック反応を介して結合される。例えば、一方の抗原結合ポリペプチドはテトラジンと結合され得、他方の抗原結合ポリペプチドはＴＣＯと結合され得、クリック反応時に２つの抗原結合ポリペプチドが結合される。テトラジン－ＴＣＯクリック反応の例示的な説明は、例えば、Ｂｌａｃｋｍａｎ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１３０：１３５１８－９に見出すことができる。

【０３２７】

操作されたシステイン

いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチド、抗体、またはサブユニットは、操作された遊離システインを介して結合される。いくつかの実施形態では、抗体及び１つ以上のＦａｂ断片は、操作された遊離システインを介して結合される。例えば、いくつかの実施形態では、２つの抗原結合ポリペプチドもしくはサブユニット、または抗体及び１つ以上のＦａｂ断片は、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）抗体技術を介して結合される。ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体技術の例示的な説明は、例えば、米国特許第７，５２１，５４１号、同第７，８５５，２７５号、同第８，３０９，３００号、及び同第９，０００，１３０号、ならびに米国登録前公開第２０１６０１３０３５８号に見出すことができる。いくつかの実施形態では、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体技術は、リンカーを介して抗原結合ポリペプチド、サブユニット、抗体、またはＦａｂ断片を結合するために使用される。

【０３２８】

ｐＨ７付近でプロトン化され、求核性が低いほとんどのアミンとは異なり、システインチオールは中性ｐＨで反応する。遊離チオール（ＲＳＨ、スルフヒドリル）基は比較的反

応性が高いため、システイン残基を有するタンパク質は、ジスルフィド連結したオリゴマーとしてその酸化形態で存在するか、またはジスルフィド基が内部架橋していることが多い。抗体システインチオール基は一般に、抗体のアミンまたはヒドロキシル基よりも求電子性コンジュゲーション試薬に対する反応性が高く、すなわち、求核性が高い。タンパク質の様々なアミノ酸残基をシステインアミノ酸に変異させることによるシステインチオール基の操作には、特に、不対（遊離Ｃｙｓ）残基または反応もしくは酸化が比較的起こりやすい残基の場合に、問題が生じる潜在性がある。Ｅ．ｃｏｌｉの周辺質中、培養上清中、または部分的もしくは完全に精製されたタンパク質中のいずれにせよ、タンパク質の濃縮溶液中では、タンパク質の表面上の不対Ｃｙｓ残基が対合し、酸化して、分子間ジスルフィドを形成し、故にタンパク質二量体または多量体を形成することができる。ジスルフィド二量体の形成により、新たなＣｙｓは、薬物、リガンド、または他の標識に対するコンジュゲーションについて非反応性となる。さらに、タンパク質が、酸化により新たに操作されたＣｙｓ残基と既存のＣｙｓ残基との間で分子間ジスルフィド結合を形成した場合、いずれのＣｙｓ基も、活性部位の関与及び相互作用に利用することができない。さらに、このタンパク質は、誤った折り畳みまたは三次構造の喪失により不活性または非特異的となり得る（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ（２００２）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３１１：１－９）。

【０３２９】

操作されたシステインをコンジュゲーションに利用することができる部位にシステイン置換を有する抗体／サブユニット／Ｆａｂ断片（ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体）は、しかしながら、免疫グロブリンの折り畳み及び構築を乱すことも抗原の結合及びエフェクター機能を改変させることもない（Ｊｕｎｕｔｕｌａ，ｅｔ　ａｌ．，２００８ｂ　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２６（８）：９２５－９３２、Ｄｏｒｎａｎ　ｅｔ　ａｌ（２００９）Ｂｌｏｏｄ　１１４（１３）：２７２１－２７２９、ＵＳ７５２１５４１、ＵＳ７７２３４８５、ＷＯ２００９／０５２２４９）。

【０３３０】

いくつかの実施形態では、システイン操作された抗体／サブユニット／Ｆａｂ断片とは、抗体の１つ以上の残基がシステイン残基で置換されている抗体を指す。システイン操作された抗体のチオール基（複数可）は、リンカーを介してコンジュゲートされ得る。特定の実施形態では、置換された残基は、抗体の利用可能な部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基がそれにより抗体の利用可能な部位に位置付けられ、それを使用して、他の部分に抗体またはＦａｂ断片をコンジュゲートすることができる。例えば、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体は、軽鎖におけるシステインではない天然残基のシステインへの単一の変異（例えば、Ｋａｂａｔ番号付けに従うＧ６４Ｃ、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、またはＲ１４２Ｃ）または重鎖におけるもの（例えば、Ｋａｂａｔ番号付けに従うＨＣ－Ｄ１０１Ｃ、ＨＣ－Ｖ１８４Ｃ、もしくはＨＣ－Ｔ２０５Ｃ、またはＥＵ番号付けに従うＨＣ－Ｔ１１４Ｃ、ＨＣ－Ａ１４０Ｃ、ＨＣ－Ｌ１７４Ｃ、ＨＣ－Ｌ１７９Ｃ、ＨＣ－Ｔ１８７Ｃ、ＨＣ－Ｔ２０９Ｃ、ＨＣ－Ｖ２６２Ｃ、ＨＣ－Ｇ３７１Ｃ、ＨＣ－Ｙ３７３Ｃ、ＨＣ－Ｅ３８２Ｃ、ＨＣ－Ｓ４２４Ｃ、ＨＣ－Ｎ４３４Ｃ、及びＨＣ－Ｑ４３８Ｃ（すなわち、Ｋａｂａｔ番号付けに従うＨＣ－Ａ１３６Ｃは、ＥＵ番号付けによるＨＣ－Ａ１４０Ｃである）を有する抗体であり得る。

【０３３１】

いくつかの実施形態では、遊離システインアミノ酸とは、親抗体に操作がなされ、チオール官能基（－ＳＨ）を有し、分子内または分子間のジスルフィド架橋として対合していない、システインアミノ酸残基を指す。

【０３３２】

例示的な操作された遊離システインアミノ酸は、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、重鎖は、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番

号付けに従う）から選択される、重鎖中のシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖は、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）から選択される、軽鎖中のシステインアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、Ｆａｂ断片は、Ｃ末端システインアミノ酸を含む。

【０３３３】

単一部位の変異により、ＴｈｉｏＦａｂに単一の操作されたシステイン残基が生じるが、単一部位の変異により、ＩｇＧ抗体の二量体性に起因してＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体に２つの操作されたシステイン残基が生じることに留意されたい。操作されたシステイン（Ｃｙｓ）残基を有する変異体に、新たに導入された操作されたシステインチオール基の反応性に関する評価を行った。チオール反応性値は、０～１．０の範囲内の相対的な数値であり、任意のシステイン操作された抗体に関して測定され得る。本発明のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．０～１．０の範囲である。具体的には、本発明のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．１～１．０の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．０～０．１、０．１～０．５、０．１～０．６、０．１～０．７、０．１～０．８、０．１～０．９、または０．１～１．０の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．２～１．０、０．３～１．０、０．４～１．０、０．５～１．０、０．６～１．０、０．７～１．０、または０．８～１．０の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．６～１．０の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．７～１．０の範囲である。ある特定の実施形態では、本発明のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．８～１０の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．５～０．８の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．５～０．９の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．５～０．７の範囲である。ある特定の実施形態では、本開示のシステイン操作された抗体のチオール反応性値は、０．５～１．０の範囲である。

【０３３４】

本開示の設計、選択、及び調製方法は、求電子性官能基と反応するシステイン操作された抗体を可能にする。抗体表面上の反応性システイン残基により、マレイミドまたはハロアセチル等のチオール反応性基を介して結合が可能となる。マレイミド基に対するＣｙｓ残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはＮ末端アミノ基等、タンパク質中の任意の他のアミノ酸官能基と比較して、約１０００倍高い。ヨードアセチル及びマレイミド試薬中のチオール特異的官能基は、アミン基と反応することができるが、より高いｐＨ（９．０超）及びより長い反応時間が必要である（Ｇａｒｍａｎ，１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ）。

【０３３５】

本開示のシステイン操作された抗体／サブユニット／Ｆａｂ断片は、それらの野生型の親対応物の抗原結合能力を保持することが好ましい。したがって、システイン操作された抗体は、抗原、例えば、細胞表面受容体のエピトープに、好ましくは特異的に結合することができる。

【０３３６】

本開示のシステイン操作された抗体／サブユニット／Ｆａｂ断片は、チオール反応性試薬と部位特異的かつ効率的に結合し得る。チオール反応性試薬の一例は、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）である。例示的な実施形態では、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体とビオチン－リンカー試薬との反応により、ビオチニル化ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体が得られ、これによって、操作されたシステイン残基の存在及び反応性を検出及び測定することができる。ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体と多官能性リンカー試薬との反応により、官能化リン

カーを有するＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体が得られ、これをさらに抗体またはＦａｂ断片と反応させてもよい。ある特定の実施形態では、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体は、ＴｈｉｏＦａｂである。

【０３３７】

本明細書に記載の例示的な方法は、一般に、抗体の特定及び産生、ならびにより一般には、本明細書に記載の設計及びスクリーニングステップの適用を通じて他のタンパク質に適用され得る。

【０３３８】

かかるアプローチは、他のチオール反応性物質のコンジュゲーションに適用することができ、ここで、反応性基は、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、または他のチオール反応性コンジュゲーションパートナーである（Ｈａｕｇｌａｎｄ，２００３，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｂｒｉｎｋｌｅｙ，１９９２，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．３：２、Ｇａｒｍａｎ，１９９７，Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ；Ｍｅａｎｓ（１９９０）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１：２、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．ｉｎ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９６）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ｐｐ．４０－５５，６４３－６７１）。

【０３３９】

ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）、またはそのサブユニットの組換え産生では、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング（ＤＮＡの増幅）のため、または発現のために、複製可能ベクターに挿入される。抗原結合ポリペプチドをコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（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することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）容易に単離及び配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核性または真核性のいずれか（一般に哺乳類であるが、真菌類（例えば酵母）、昆虫、植物、及び他の多細胞生物由来の有核細胞も含む）のものである。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、単離された宿主細胞、例えば、細胞培養で成長させられる無脊椎動物（例えば昆虫）または脊椎動物（例えば、マウス、ヒト、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞等）生物に由来する細胞株等の、単離された細胞として成長させられる多細胞生物に由来する宿主細胞である。抗原結合ポリペプチドが抗体である場合、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＥ定常領域を含む任意のアイソタイプの定常領域がこの目的で使用され得、かかる定常領域が任意のヒトまたは動物種から得られ得ることが理解される。

【０３４０】

ａ．原核宿主細胞を使用した抗原結合ポリペプチドの生成

ｉ．ベクター構築

本明細書に提供される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）のポリペプチド構成成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準の組換え技法を用いて得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列は、例えば、ハイブリドーマ細胞等の抗体産生細胞から単離及び配列決定され得る。代替的に、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機またはＰＣＲ技術を使用して合成され得る。得られた時点で、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主内で異種ポリヌクレオチドを複製及び発現することができる組換えベクターに挿入される。利用可能であり、当該技術分野で既知である多くのベクターが本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、ベクターに挿入される核酸の大きさ及

びベクターで形質転換される特定の宿主細胞に主に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはこれらの両方）及びそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性に応じて様々な構成成分を含有する。ベクターの構成成分としては、一般に、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、シグナル配列、異種核酸挿入、及び転写終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド配列は、変異、例えば、操作された遊離システインまたはＦｃ領域のエフェクター機能を減衰させるための修飾等、本明細書に記載のアミノ酸置換をコードする変異を含む。開始ポリペプチドのアミノ酸配列変異型をコードするＤＮＡは、当該技術分野で既知の様々な方法によって調製される。これらの方法には、部位指向性（またはオリゴヌクレオチド媒介性）変異生成、ＰＣＲ変異生成、及び事前に調製したポリペプチドをコードするＤＮＡのカセット変異生成による調製が挙げられるがこれらに限定されない。組換え抗体の変異型は、制限断片操作または合成オリゴヌクレオチドとのオーバーラップ伸長ＰＣＲによっても構築することができる。変異生成プライマーは、システインコドン置き換え（複数可）をコードする。標準の変異生成技法を用いて、かかる変異体のシステイン操作された抗体をコードするＤＮＡを生成することができる。一般的な指針は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９９３に見出すことができる。

【０３４２】

部位指向性変異生成は、置換変異型、すなわち変異体タンパク質を調製するための１つの方法である。この技法は、当該技術分野で周知である（例えば、Ｃａｒｔｅｒ（１９８５）ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：４４３１－４４４３、Ｈｏ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｇｅｎｅ（Ａｍｓｔ．）７７：５１－５９、及びＫｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：４８８を参照されたい）。簡単に、ＤＮＡの部位指向性変異生成の実行時に、開始ＤＮＡを、所望される変異をコードするオリゴヌクレオチドをかかる開始ＤＮＡの一本鎖にハイブリダイズさせることによって、まず改変させる。ハイブリダイゼーションの後に、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、開始ＤＮＡの一本鎖を鋳型として用いて、ＤＮＡポリメラーゼを用いて第２の鎖全体を合成する。したがって、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドが、結果として得られる二本鎖ＤＮＡに組み込まれる。部位指向性変異生成は、発現プラスミドにおいて変異生成を受けるタンパク質を発現する遺伝子内において行うことができ、結果として得られるプラスミドに配列決定を行って、所望のシステイン置き換え変異の導入を確認することができる（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：２０２５２－２０２６０）。市販入手可能な、例えば、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｍｕｌｔｉ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を含む部位指向性のプロトコル及び形式。

【０３４３】

ＰＣＲ変異生成はまた、開始ポリペプチドのアミノ酸配列変異型を作製するのにも好適である。Ｈｉｇｕｃｈｉ，（１９９０）ｉｎ ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｐｐ．１７７－１８３，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ（１９９１）Ｇｅｎｅ １０２：６７－７０、Ｂｅｒｎｈａｒｄ ｅｔ ａｌ（１９９４）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：１２６－１３２、及びＶａｌｌｅｔｔｅ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：７２３－７３３を参照されたい。簡単に、少量の

鋳型ＤＮＡをＰＣＲにおいて出発物質として使用する場合、鋳型ＤＮＡの対応する領域とは配列がわずかに異なるプライマーを使用して、プライマーが鋳型と異なっている位置のみが鋳型配列とは異なる、比較的大量の特異的ＤＮＡフラグメントを生成することができる。

【０３４４】

変異型を調製するための別の方法であるカセット変異生成は、Ｗｅｌｌｓ ｅｔ ａｌ（１９８５）Ｇｅｎｅ ３４：３１５－３２３によって説明される技法に基づく。出発物質は、変異を受ける出発ポリペプチドＤＮＡを含むプラスミド（または他のベクター）である。変異を受ける出発ＤＮＡ内のコドン（複数）が特定される。特定された変異部位（複数可）の両側には固有の制限エンドヌクレアーゼが必要である。かかる制限部位が存在しない場合、出発ポリペプチドＤＮＡの適切な位置でそれらを導入するために上述のオリゴヌクレオチド媒介性変異生成法を用いて生成することができる。プラスミドＤＮＡは、これらの位置で切断され、直線状となる。制限部位間のＤＮＡの配列をコードするが所望される変異（複数可）を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、標準の手順を用いて合成され、ここで、オリゴヌクレオチドの２つの鎖は、別個に合成された後、標準の技法を用いて一緒にハイブリダイズされる。オリゴヌクレオチドは、ホスホラミダイト合成方法（ＵＳ４４１５７３２、ＵＳ４４５８０６６、Ｂｅａｕｃａｇｅ，Ｓ．ａｎｄ Ｉｙｅｒ，Ｒ．（１９９２）“Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｂｙ ｔｈｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅ ａｐｐｒｏａｃｈ”，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ４８：２２２３－２３１１）によって調製される。この二本鎖オリゴヌクレオチドは、カセットと称される。このカセットは、直鎖状プラスミドの末端と適合性があり、そのためプラスミドに直接ライゲーションすることができる、５’末端及び３’末端を有するように設計される。このプラスミドは、ここで、変異ＤＮＡ配列を含有する。コードされたシステイン置き換えを含有する変異体ＤＮＡを、ＤＮＡ配列決定によって確認することができる。

【０３４５】

単一の変異は、オリゴヌクレオチド指向性変異生成によって、二本鎖プラスミドＤＮＡを鋳型として使用してＰＣＲに基づく変異生成（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌ，（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｚｏｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ（１９８３）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１００：４６８－５００、Ｚｏｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｍ．（１９８２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１０：６４８７－６５００）によっても生成される。

【０３４６】

一般に、宿主細胞と適合性のある種由来のレプリコン及び制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。このベクターは、通常、複製部位、及び形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を持つ。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉは、典型的には、Ｅ．ｃｏｌｉ種に由来のプラスミドであるｐＢＲ３２２を使用して形質転換される。ｐＢＲ３２２は、アンピシリン（Ａｍｐ）及びテトラサイクリン（Ｔｅｔ）耐性をコードする遺伝子を含有し、したがって形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供する。ｐＢＲ３２２、その誘導体、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージは、内因性タンパク質の発現のための微生物によって使用され得るプロモーターも含有し得るか、またはそれを含有するように修飾され得る。特定の抗体の発現のために使用されるｐＢＲ３２２誘導体の例は、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，６４８，２３７号に詳細に記載されている。

【０３４７】

加えて、宿主微生物と適合性のあるレプリコン及び制御配列を含有するファージベクターは、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用され得る。例えば、λＧＥＭ．ＴＭ．－１１等のバクテリオファージが、Ｅ．ｃｏｌｉ ＬＥ３９２等の感受性宿主細胞を形質転換するために使用され得る組換えベクターを作製する際に利用されてもよい。

【０３４８】
本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成成分の各々をコードする２つ以上のプロモーター－シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流（５’）に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、２つのクラス、誘導プロモーター及び構成プロモーターに分けられる。誘導プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の存在もしくは不在、または温度の変化に応答してその制御下で増加したレベルのシストロンの転写を開始するプロモーターである。
【０３４９】
様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化によりソースＤＮＡからプロモーターを除去し、かつ単離されたプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することによって、例えば、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作動可能に連結され得る。天然プロモーター配列及び多くの異種プロモーターの両方が、標的遺伝子の増幅及び／または発現を指向するために使用され得る。いくつかの実施形態では、異種プロモーターが一般に天然標的ポリペプチドプロモーターと比較して発現された標的遺伝子のより大きい転写及びより高い収率を可能にするため、異種プロモーターが利用される。
【０３５０】
原核生物宿主との使用に好適なプロモーターには、ＰｈｏＡプロモーター、β－ガラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば、ｔａｃまたはｔｒｃプロモーターが含まれる。しかしながら、細菌において機能的な他のプロモーター（他の既知の細菌またはファージプロモーター等）も好適である。それらのヌクレオチド配列が公開されており、それにより、当業者が、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカーまたはアダプターを使用して、抗原結合ポリペプチドタンパク質の遺伝子、例えば、標的軽鎖及び重鎖をコードする、シストロンにそれらを作動可能にライゲーションすることが可能になっている（Ｓｉｅｂｅｎｌｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８０）Ｃｅｌｌ　２０：２６９）。
【０３５１】
一実施形態では、組換えベクター内の各シストロンは、膜にわたる発現ポリペプチドの転位を指向する分泌シグナル配列構成成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成成分であり得るか、またはベクターに挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であり得る。選択されたシグナル配列は、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識及びプロセシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｉｐｐ、または熱安定性エンテロトキシンＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡ、及びＭＢＰからなる群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。本発明の一実施形態では、発現系の両シストロンにおいて使用されるシグナル配列は、ＳＴＩＩシグナル配列またはその変異型である。
【０３５２】
別の実施形態では、免疫グロブリンの産生は、宿主細胞の細胞質で生じ得、したがって、各シストロン内での分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点で、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は、細胞質内で発現され、折り畳まれ、構築されて機能的免疫グロブリンを形成する。ある特定の宿主株（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｔｒｘＢ⁻株）は、ジスルフィド結合形成に好ましい細胞質条件を提供し、それにより発現タンパク質サブユニットの適切な折り畳み及び構築を可能にする。Ｐｒｏｂａ　ａｎｄ　Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ　Ｇｅｎｅ，１５９：２０３（１９９５）を参照されたい。
【０３５３】
本発明の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）の発現に好適な原核生物宿主細胞には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物等のＡｒｃｈａｅｂａｃｔｅｒｉａ及びＥｕｂａｃｔｅｒｉａが含まれる。有用な細菌の例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、

Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｂａｃｉｌｌｉ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種（例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｒｈｉｚｏｂｉａ、Ｖｉｔｒｅｏｓｃｉｌｌａ、またはＰａｒａｃｏｃｃｕｓが挙げられる。一実施形態では、グラム陰性細胞が使用される。一実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞が、本発明の宿主として使用される。Ｅ．ｃｏｌｉ株の例としては、株Ｗ３１１０（Ｂａｃｈｍａｎｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９８７），ｐｐ．１ １９０－１２１９；ＡＴＣＣ Ｄｅｐｏｓｉｔ Ｎｏ．２７，３２５）及びその誘導体（遺伝子型Ｗ３１１０ ＡｆｈｕＡ（ＡｔｏｎＡ）ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ＡｏｍｐＴＡ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ｄｅｇＰ４１ ｋａｎＲを有する株３３Ｄ３（米国特許第５，６３９，６３５号）を有する株３３Ｄ３を含む）が挙げられる。他の株及びその誘導体、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ２９４（ＡＴＣＣ ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｂ、Ｅ ｃｏｌｉｘ１７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）、及びＥ．ｃｏｌｉ ＲＶ３０８（ＡＴＣＣ ３１，６０８）も好適である。一実施形態では、Ｅ ｃｏｌｉ Ａｌｐｐが特に使用される。これらの例は、限定するものではなく、例示である。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のうちのいずれかの誘導体の構築方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｂａｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）に記載されている。一般に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製可能性を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、またはｐＫＮ４１０等の周知のプラスミドを使用してレプリコンを提供する場合、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、またはＳａｌｍｏｎｅｌｌａ種が宿主として好適に使用され得る。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素しか分泌すべきでなく、さらなるプロテアーゼ阻害剤が細胞培養物に組み込まれることが望ましい場合がある。

【０３５４】

ｉｉ．ポリペプチド産生

宿主細胞は、上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切になるように修飾された従来の栄養素培地で培養される。

【０３５５】

形質転換とは、ＤＮＡが染色体外要素として、または染色体組み込み体によってのいずれかで複製可能になるように、ＤＮＡを原核生物宿主に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換がかかる細胞に適切な標準の技法を使用して行われる。一般に、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理が、実質的な細胞壁障壁を含有する細菌細胞に使用される。形質転換の別の方法は、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯを用いる。使用されるさらに別の技法は、電気穿孔法である。

【０３５６】

本発明のポリペプチドを産生するために使用される原核生物細胞は、当該技術分野で既知の、かつ選択された宿主細胞の培養に好適な培地で成長させられる。好適な培地の例としては、必要な栄養素補充物を含むルリアブロス（ＬＢ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地は、発現ベクターを含有する原核生物細胞の成長を選択的に可能にするために、発現ベクターの構築に基づいて選択された選択剤も含有する。例えば、アンピシリンは、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞を成長させるための培地に添加される。

【０３５７】

炭素、窒素、及び無機リン酸塩源に加えて、単独で、または複合窒素源等の別の補助剤もしくは培地との混合物として導入される任意の必要な補助剤も、適切な濃度で含まれ得る。任意選択で、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール、及びジチオスレイトールからなる群から選択される１つ以上

の還元剤を含有し得る。
【０３５８】
原核生物宿主細胞は、好適な温度で培養される。Ｅ．ｃｏｌｉ成長の場合、例えば、好ましい温度は、約２０℃～約３９℃の範囲、より好ましくは約２５℃～約３７℃の範囲、さらにより好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に宿主生物に応じて約５～約９の範囲の任意のｐＨであり得る。Ｅ．ｃｏｌｉの場合、ｐＨは、好ましくは約６．８～約７．４、より好ましくは約７．０である。
【０３５９】
誘導プロモーターが本発明の発現ベクターに使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一実施形態では、ＰｈｏＡプロモーターが、ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、形質転換宿主細胞は、誘導のためにリン酸塩制限培地で培養される。好ましくは、リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地である（例えば、Ｓｉｍｍｏｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（２００２），２６３：１３３－１４７を参照されたい）。様々な他の誘導因子が、当該技術分野で既知の用いられるベクター構築物に従って使用され得る。
【０３６０】
本発明の一実施形態では、抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体等）産生は、発酵プロセスによって大量に行われる。様々な大規模供給バッチ発酵手順が、組換えタンパク質の産生に利用可能である。大規模発酵は、少なくとも１０００リットルの容量、好ましくは約１，０００～１００，０００リットルの容量を有する。これらの発酵槽は、酸素及び栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を分布させるために撹拌インペラーを使用する。小規模発酵とは、一般に、容積がおよそ１００リットル以下であり、約１リットル～約１００リットルの範囲であり得る発酵槽での発酵を指す。
【０３６１】
発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が所望の密度、例えば、約１８０～２２０のＯＤ５５０になるまで好適な条件下で成長した後に開始され、その段階で、細胞は、初期静止期にある。様々な誘導因子が、当該技術分野で既知であり、上述の用いられるベクター構築物に従って使用され得る。細胞は、誘導前により短い期間成長し得る。細胞は、通常、約１２～５０時間誘導されるが、より長いまたはより短い誘導時間も使用され得る。
【０３６２】
発現抗原結合ポリペプチド（特にタンパク質分解感受性のもの）のタンパク質分解を最小限に抑えるために、タンパク質分解酵素が欠損したある特定の宿主株が本発明に使用され得る。例えば、宿主細胞株は、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ、及びそれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子変異（複数可）をもたらすように修飾され得る。いくつかのＥ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株が利用可能であり、例えば、Ｊｏｌｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：２７７３－２７７７、Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，２６４，３６５号、Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５０８，１９２号、Ｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，２：６３－７２（１９９６）に記載されている。
【０３６３】
一実施形態では、タンパク質分解酵素が欠損し、かつ１つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換されたＥ．ｃｏｌｉ株が、本発明の発現系における宿主細胞として使用される。第２の実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ株は、外膜のリポタンパク質が欠損している（ΔＩρρ）。
【０３６４】
ｉｉｉ．抗原結合ポリペプチド精製

一実施形態では、本明細書で産生される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニットは、さらなるアッセイ及び使用のために実質的に同種の調製物を得るためにさらに精製される。当該技術分野で既知の標準のタンパク質精製方法が用いられ得る。以下の手順：免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、ＤＥＡＥ等のシリカまたはカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、及び例えばＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５を使用したゲル濾過が、好適な精製手順の例示である。

【０３６５】

一実施形態では、固相に固定化されたプロテインＡが、例えば、本発明の抗原結合ポリペプチドの免疫親和性精製に使用される。プロテインＡは、高親和性で抗原結合ポリペプチドのＦｃ領域に結合するＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ由来の４１ｋＤの細胞壁タンパク質である。Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３。プロテインＡが固定化される固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ表面を含むカラム、より好ましくは、制御孔ガラスカラムまたはケイ酸カラムである。いくつかの適用では、カラムは、混入物質の非特異的付着を阻止するためにグリセロール等の試薬でコーティングされている。

【０３６６】

精製の第１のステップとして、上述のように細胞培養から得られた調製物がプロテインＡ固定化固相上に適用されて、目的の抗原結合ポリペプチドのプロテインＡへの特異的結合を可能にする。その後、固相が洗浄されて、固相に非特異的に結合している混入物質を除去する。抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体等）が、溶出により固相から回収される。

【０３６７】

ｂ．真核宿主細胞を使用した抗原結合ポリペプチドの生成

ベクター構成成分としては、一般に、シグナル配列、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうちの１つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６８】

ｉ．シグナル配列構成成分

真核宿主細胞において使用するためのベクターもまた、目的の成熟タンパク質またはポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドを含有してもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳類細胞発現において、哺乳類シグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスｇＤシグナルが利用可能である。かかる前駆体領域のＤＮＡは、リーディングフレームにおいて、所望の抗原結合ポリペプチド（複数可）（例えば、抗体）をコードするＤＮＡにライゲーションされる。

【０３６９】

ｉｉ．複製起点

一般に、複製起点構成成分は、哺乳類発現ベクターに必要とされない。例えば、ＳＶ４０起点が典型的に使用され得るが、これは単に、ＳＶ４０起点が初期プロモーターを含有するためである。

【０３７０】

ｉｉｉ．選択遺伝子構成成分

発現及びクローニングベクターは、選択遺伝子、別名、選択可能なマーカーを含有し得る。典型的な選択遺伝子は、（ａ）抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンへの耐性を与えるか、（ｂ）栄養要求性欠損を補完するか（関連性のある場合）、または（ｃ）複合培地から入手不可能な必須の栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

【０３７１】
選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止する薬物を利用する。異種遺伝子で形質転換に成功した細胞は、薬物耐性を与えるタンパク質を産生し、したがって選択レジメンで生き残る。かかる優性選択の例は、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンを使用する。
【０３７２】
哺乳類細胞に好適な選択可能なマーカーの別の例は、ＤＨＦＲ、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン－Ｉ及び－ＩＩ、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等の、抗体核酸を取り込むための細胞構成成分の特定を可能にするものである。
【０３７３】
例えば、ＤＨＦＲ選択遺伝子で形質転換された細胞は、最初に、ＤＨＦＲの競合アンタゴニストであるメトトレキサート（Ｍｔｘ）を含有する培養培地中で全ての形質転換体を培養することによって特定される。野生型ＤＨＦＲが用いられるときの適切な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞株（例えば、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－９０９６）である。
【０３７４】
代替的に、抗体、野生型ＤＨＦＲタンパク質、及びアミノグリコシド３’－ホスホトランスフェラーゼ（ＡＰＨ）等の別の選択可能なマーカーをコードするＤＮＡ配列で形質転換または共形質転換された宿主細胞（特に、内因性ＤＨＦＲを含有する野生型宿主）は、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはＧ４１８等の選択可能なマーカー用の選択剤を含有する培地中での細胞成長によって選択され得る。例えば、米国特許第４，９６５，１９９号を参照されたい。
【０３７５】
ｉｖ．プロモーター構成成分
発現ベクター及びクローニングベクターは通常、宿主生物によって認識され、所望のＦｃ含有ポリペプチド（複数可）（例えば、抗体）核酸に作動可能に連結されるプロモーターを含有する。真核生物のためのプロモーター配列が既知である。事実上全ての真核遺伝子が、転写が開始する部位からおよそ２５～３０塩基上流に位置するＡＴに富んだ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から７０～８０塩基上流に見られる別の配列は、Ｎが任意のヌクレオチドであるＣＮＣＡＡＴ領域である。大半の真核遺伝子の３’末端は、コード配列の３’末端へのポリＡ尾部の付加のためのシグナルであり得るＡＡＴＡＡＡ配列である。これらの配列は全て、真核発現ベクターに好適に挿入される。
【０３７６】
Ｆｃ含有ポリペプチド（複数可）（例えば、抗体等）の産生の場合、哺乳類宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス２等）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、及びサルウイルス４０（ＳＶ４０）等のウイルスのゲノムから、異種哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーターから、または熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって制御されるが、但し、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合性であることを条件とする。
【０３７７】
ＳＶ４０ウイルスの初期及び後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルス複製起点も含有するＳＶ４０制限フラグメントとして好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即時初期プロモーターは、Ｈｉｎｄ　１１１Ｅ制限断片として好都合に得られる。ウシ乳頭腫ウイルスをベクターとして使用して哺乳類宿主におけるＤＮＡを発現させるための系は、米国特許第４，４１９，４４６号で開示されている。この系の修飾は、米国特許第４，６０１，９７８号に記載されている。単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトβ－インターフェロンｃＤＮＡの発現につい

て、Ｒｅｙｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２９７：５９８－６０１（１９８２）も参照されたい。代替的に、ラウス肉腫ウイルス長末端反復がプロモーターとして使用され得る。

【０３７８】

ｖ．エンハンサー要素構成成分

より高次の真核生物による、抗原結合ポリペプチド（複数可）（例えば、抗体等）をコードするＤＮＡの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加され得る。哺乳類遺伝子（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテイン、及びインスリン遺伝子）由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている。また、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用してもよい。例としては、複製起点の後半側のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ１００～２７０）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後半側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核プロモーターの活性化を強化するための要素の説明に関しては、Ｙａｎｉｖ，Ｎａｔｕｒｅ　２９７：１７－１８（１９８２）も参照されたい。エンハンサーは、強化が達成される限り、抗体ポリペプチドコード配列の５’位側または３’位側でベクターへとスプライシングされ得るが、一般には、プロモーターから５’部位に位置する。

【０３７９】

ｖｉ．転写終結構成成分

真核宿主細胞において使用される発現ベクターはまた、典型的には、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含有する。かかる配列は、一般に、真核もしくはウイルスＤＮＡまたはｃＤＮＡの５’非翻訳領域、時折、３’非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。１つの有用な転写終結構成成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。ＷＯ９４／１１０２６及びそこで開示される発現ベクターを参照されたい。

【０３８０】

ｖｉｉ．宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書におけるベクター中のＤＮＡのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞としては、脊椎動物宿主細胞を含む本明細書に記載のより高次の真核生物細胞が挙げられる。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、日常的な手順になっている。有用な哺乳類宿主細胞の例としては、ＳＶ４０で形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚性腎臓株（懸濁培養における成長のためにサブクローニングされた２９３または２９３細胞、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；仔ハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：４２１６（１９８０））；マウスＳｅｒｔｏｌｉ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））；サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２、ＨＢ　８０６５）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ　５細胞；ＦＳ４細胞；及びヒト肝癌株（Ｈｅｐ　Ｇ２）である。

【０３８１】

宿主細胞は、所望の抗原結合ポリペプチド（複数可）（例えば、抗体等）産生のために、上述の発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターの誘導

、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜修飾された従来の栄養素培地中で培養される。

【０３８２】

ｖｉｉｉ．宿主細胞の培養

本開示の所望の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニットを産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養され得る。Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、及びダルベッコ修飾イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）等の市販されている培地は、宿主細胞の培養に好適である。加えて、Ｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９）、Ｂａｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０）、米国特許第４，７６７，７０４号、同第４，６５７，８６６号、同第４，９２７，７６２号、同第４，５６０，６５５号、または同第５，１２２，４６９号、ＷＯ９０／０３４３０、ＷＯ８７／００１９５、または米国特再発行第３０，９８５号に記載の培地のいずれかが、宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれにも、必要に応じて、ホルモン及び／または他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子等）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩等）、緩衝液（ＨＥＰＥＳ等）、ヌクレオチド（アデノシン及びチミジン等）、抗生物質（ＧＥＮＴＡＭＹＣＩＮ（商標）薬等）、微量元素（マイクロモルの範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と定義される）、及びグルコースまたは同等のエネルギー源が補充され得る。任意の他の必要な補助剤も、当業者に既知であろう適切な濃度で含まれ得る。温度、ｐＨ等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞と共にこれまでに使用されているものであり、当業者には明らかであろう。

【０３８３】

ｉｘ．抗原結合ポリペプチドの精製

組換え技法を使用する場合、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニットは、細胞内に産生されるか、または培地中に直接分泌され得る。ポリペプチドが細胞内に産生される場合、第１のステップとして、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの粒子状残屑が、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。ポリペプチドが培地中に分泌される場合、かかる発現系の上清は、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えば、ＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過ユニットを使用して最初に濃縮される。ＰＭＳＦ等のプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するために前述のステップのうちのいずれかに含まれ得、抗生物質は、外来性混入物質の成長を阻止するために含まれ得る。

【０３８４】

細胞から調製されたポリペプチド組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技法である。親和性リガンドとしてのプロテインＡの好適性は、抗体に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る（Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３（１９８３））。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ３に対して推奨されている（Ｇｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯＪ．５：１５６７１５７５（１９８６））。親和性リガンドが結合する基質は、ほとんどの場合アガロースであるが、他の基質も利用可能である。制御孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定した基質により、アガロースで達成され得るよりも速い流速及び短い処理時間が可能になる。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，Ｎ．Ｊ．）が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技法、例えば、イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンＳＥ

ＰＨＡＲＯＳＥ（商標）でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラム等）でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収される抗体に応じて利用可能である。

【０３８５】

任意の予備精製ステップ（複数可）後、目的のポリペプチド（複数可）及び汚染物質を含む混合物が、約２．５～４．５のｐＨの溶出緩衝液を使用して、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけられてもよく、好ましくは、低塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍの塩）で行われ得る。抗原結合ポリペプチドの産生は、（前述の特定の方法のうちのいずれかに対して）代替的にまたは追加的に、ポリペプチドの混合物を含む溶液を透析することを含む。

【０３８６】

ｘ．バキュロウイルスを使用した抗原結合ポリペプチド産生

組換えバキュロウイルスは、例えば、リポフェクチン（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販されている）を用いて、抗原結合ポリペプチド及びＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ（商標）ウイルスＤＮＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）をコードするプラスミドをＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞（例えば、Ｓｆ９細胞；ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ Ｓ２細胞等の昆虫細胞内に共トランスフェクトすることによって生成され得る。特定の例では、抗原結合ポリペプチド配列は、バキュロウイルス発現ベクター内に含有されるエピトープタグの上流に融合される。かかるエピトープタグには、ポリ－Ｈｉｓタグが含まれる。ｐＶＬ１３９３（Ｎｏｖａｇｅｎ）またはｐＡｃＧＰ６７Ｂ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）等の市販のプラスミドに由来するプラスミドを含む、様々なプラスミドが用いられてもよい。簡潔に、抗原結合ポリペプチドをコードする配列が、５’及び３’領域に相補的なプライマーを用いてＰＣＲによって増幅され得る。５’プライマーは、隣接（選択の）制限酵素部位を組み込んでもよい。産物は次いで、選択の制限酵素で消化され、発現ベクター中にサブクローニングされ得る。

【０３８７】

発現ベクターでトランスフェクトした後、宿主細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）は、２８℃で４～５日間インキュベートされ、放出されたウイルスが採取され、さらなる増幅に使用される。ウイルス感染及びタンパク質発現が、例えば、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｏｘｆｏｒｄ：Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９４））によって記載されるように行われてもよい。

【０３８８】

発現されたポリ－Ｈｉｓタグ抗原結合ポリペプチドは次いで、例えば、Ｎｉ２＋－キレート親和性クロマトグラフィーによって、以下のように精製することができる。抽出物は、Ｒｕｐｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ ３６２：１７５－１７９（１９９３））によって記載されるように、組換えウイルス感染Ｓｆ９から調製され得る。簡潔に、Ｓｆ９細胞が洗浄され、超音波処理緩衝液（２５ｍＬ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．９、１２．５ｍＭ $MgCl_2$、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、１０％グリセロール、０．１％ ＮＰ－４０、０．４Ｍ ＫＣｌ）に再懸濁され、氷上で２０秒間、２回超音波処理される。超音波処理物が遠心分離によって清澄化され、上清がローディング緩衝液（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭ ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ７．８）中で５０倍希釈され、０．４５μｍフィルタを通して濾過される。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販されている）を、５ｍＬのベッド容積で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬのローディング緩衝液で平衡化する。濾過された細胞抽出物が、毎分０．５ｍＬでカラム上にローディングされる。カラムが、ローディング緩衝液でＡ２８０のベースラインまで洗浄され、その時点で画分収集が開始される。次に、カラムは、二次洗浄緩衝液（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭ Ｎａｌ、１０％グリセロールｐＨ６．０）で洗浄され、それにより、非特異的に結合したタンパク質が溶出される。再びＡ２８０のベースラインに達した後、カラムは、二次洗浄緩衝液中０～５００ｍＭのイミダゾール勾配で呈色させられる。１

ｍＬ画分が収集され、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされたNi^{2+}－ＮＴＡ－（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び銀染色またはウェスタンブロットによって分析される。溶出されたＨｉｓ１０タグ抗原結合ポリペプチドを含有する画分がプールされ、ローディング緩衝液に対して透析される。

【０３８９】

代替的に、抗原結合ポリペプチドの精製は、例えば、プロテインＡまたはプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む、既知のクロマトグラフィー技法を用いて行うことができる。一実施形態では、目的の抗原結合ポリペプチドは、カオトロピック剤または中性洗剤を含有する溶液中への溶出によって、カラムの固相から回収されてもよい。例示的なカオトロピック剤及び中性洗剤には、グアニジン－ＨＣＩ、尿素、過塩素酸リチウム（ｌｉｔｈｉｕｍ　ｐｅｒｃｌｏｒａｔｅ）、アルギニン、ヒスチジン、ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）、Ｔｗｅｅｎ、Ｔｒｉｔｏｎ、及びＮＰ－４０が含まれるが、これらに限定されず、これらの全てが市販されている。

【０３９０】

ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）抗体は、抗体内にジスルフィド結合を形成する天然のシステイン残基を含む完全長抗体である。したがって、これらの天然のシステイン残基は、薬物－マレイミドとコンジュゲートするいずれの反応性チオール基も有さない（還元剤で処理されない限り）。したがって、新たに操作されたＣｙｓ残基は、対合しないままとなり得、また求電子性リンカー試薬または薬物－リンカー中間体、例えば薬物－マレイミドと反応することができる、すなわち、コンジュゲートすることができる。

【０３９１】

チオール反応性はまた、軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）ならびに重鎖定常ドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３等の、抗体のある特定のドメインに対して一般化され得る。約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、及び０．９５以上のチオール反応性値をもたらすシステイン置き換えは、それぞれ、インタクトな抗体：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ（ＩｇＧサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、及びＩｇＡ２を含む）の重鎖定常ドメインα、δ、ε、γ、及びμにおいてなされる。

【０３９２】

標的分子及び使用方法

本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）は、シグナル伝達経路を活性化するために標的と相互作用するように使用することができる。ある特定の実施形態では、標的は、シグナル伝達経路を活性化、惹起、調節、及び／または制御する任意の標的であり得る。本明細書に記載される抗原結合ポリペプチドまたは抗原結合複合体が標的とし得る分子の例としては、細胞表面受容体が挙げられるが、これに限定されない。ある特定の実施形態では、細胞表面受容体は、リガンドと組み合わせることによって、オリゴマー化、例えば二量体化（ホモ二量体化またはヘテロ二量体化）し、それによって細胞中にシグナルを伝達する、受容体であり得る。

【０３９３】

ある特定の実施形態では、標的は、例えばそのリガンドと相互作用した際に、オリゴマー化して、シグナル伝達経路を活性化する、任意の標的であり得る。ある特定の実施形態では、標的は、多量体の受容体であり得る。本明細書で使用される場合、「多量体の受容体」という用語は、シグナル伝達活性のために、例えば、同じ種類の及び／または同じファミリーからの、２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、または６つ以上の受容体のオリゴマー化を必要とする受容体を指す。例えば、Ｈｅｉｄｉｎ（１９９５）Ｃｅｌｌ ８０：２１３－２２３を参照されたい。

【０３９４】

ある特定の実施形態では、標的受容体は、「二量体の」のものであり得、活性のために２つの受容体のオリゴマー化を必要とする。二量体の受容体の非限定的な例としては、神

経栄養受容体、神経成長因子、成長因子、セリン／スレオニンキナーゼ受容体、及び受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）が挙げられる。例えば、Ｌｉ ａｎｄ Ｈｒｉｓｔｏｖａ（２０１０）Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ ａｎｄ Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ４（２）：２４９－２５４を参照されたい。

【０３９５】

ある特定の実施形態では、標的受容体は、「三量体の」のものであり得、活性のために３つの受容体のオリゴマー化を必要とする。三量体の受容体の非限定的な例としては、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）が挙げられる。例えば、Ｂｒａｚｉｌ（２００６）Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ５：２０を参照されたい。

【０３９６】

ある特定の実施形態では、標的は、本開示の抗原結合ポリペプチドまたは抗原結合複合体と相互作用するときに、上記で定義される「アゴニズム」をもたらす、任意の標的であり得、そのアゴニズムは、単量体の親抗体よりも強化されている。

【０３９７】

細胞表面受容体には、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ受容体ファミリー、ＴＮＦ受容体ファミリー、Ｇタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）ファミリー、ＧＰＩアンカー受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ受容体ファミリー、接着因子ファミリー、及びホルモン受容体ファミリー等の受容体ファミリーに属する受容体が含まれる。これらの受容体ファミリーに属する受容体及びそれらの特徴に関する様々な参考文献が入手可能であり、例えば、Ｃｏｏｋｅ Ｂ Ａ．，Ｋｉｎｇ Ｒ Ｊ Ｂ．，ｖａｎ ｄｅｒ Ｍｏｌｅｎ ＨＪ．ｅｄ．Ｎｅｗ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｖｏｌ．１８Ｂ“Ｈｏｒｍｏｎｅｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ Ａｃｔｉｏｎｓ Ｐａｒｔ ＩＩ”ｐｐ．１－４６（１９８８）Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ ＢＶ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ、Ｐａｔｔｈｙ Ｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ，６１：１３－１４、Ｕｌｌｒｉｃｈ Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ，６１：２０３－２１２、ＭａｓｓａｇｕｌＪ．（１９９２）Ｃｅｌｌ，６９：１０６７－１０７０、Ｍｉｙａｊｉｍａ Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１０：２９５－３３１、Ｔａｇａ Ｔ．ａｎｄ Ｋｉｓｈｉｍｏｔｏ Ｔ．（１９９２）ＦＡＳＥＢ Ｊ．，７：３３８７－３３９６、Ｆａｎｔｌ Ｗ Ｉ．，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，６２：４５３－４８１、Ｓｍｉｔｈ Ｃ Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｃｅｌｌ，７６：９５９－９６２、Ｆｌｏｗｅｒ Ｄ Ｒ．（１９９９）Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１４２２：２０７－２３４、及びＭ．Ｍｉｙａｓａｋａ ｅｄ．，Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ ｖｏｌｕｍｅ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｓｅｒｉｅｓ，“Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｆｏｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｆａｃｔｏｒｓ”（１９９４）（Ｓｈｕｊｕｎｓｈａ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）が含まれる。

【０３９８】

ある特定の実施形態では、細胞表面受容体には、例えば、ホルモン受容体及びサイトカイン受容体が含まれる。例示的なホルモン受容体には、例えば、エストロゲン受容体が含まれる。例示的なサイトカイン受容体には、例えば、造血因子受容体、リンフォカイン受容体、成長因子受容体、分化制御因子受容体等が含まれる。サイトカイン受容体の例としては、エリスロポエチン（ＥＰＯ）受容体、トロンボポエチン（ＴＰＯ）受容体、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）受容体、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）受容体、顆粒マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）受容体、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体、インターロイキン－１（ＩＬ－１）受容体、インターロイキン－２（ＩＬ－２）受容体、インターロイキン－３（ＩＬ－３）受容体、インターロイキン－４（ＩＬ－４）受容体、インターロイキン－５（ＩＬ－５）受容体、インターロイキン－６（ＩＬ－６）受容体、インターロイキン－７（ＩＬ－７）受容体、インターロイキン－９（ＩＬ－９）受容体、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）受容体、インターロイキン－

１１（ＩＬ－１１）受容体、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）受容体、インターロイキン－１３（ＩＬ－１３）受容体、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）受容体、インターフェロン－アルファ（ＩＦＮ－アルファ）受容体、インターフェロン－ベータ（ＩＦＮ－ベータ）受容体、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮ－ガンマ）受容体、成長ホルモン（ＧＨ）受容体、インスリン受容体、血液幹細胞増殖因子（ＳＣＦ）受容体、血管上皮細胞成長因子（ＶＥＧＦ）受容体、上皮細胞成長因子（ＥＧＦ）受容体、神経成長因子（ＮＧＦ）受容体、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）受容体、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）受容体、トランスフォーミング成長因子－ベータ（ＴＧＦ－ベータ）受容体、白血球遊走阻止因子（ＬＩＦ）受容体、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）受容体、オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）受容体、及びノッチファミリー受容体が挙げられる。サイトカイン受容体の追加の非限定的な例は、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７：２９－６０に開示されている。

【０３９９】

ある特定の実施形態では、標的は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）ファミリーのメンバーを含み得る。ＴＮＦＲの非限定的な例としては、ＴＮＦＲ１、ＴＮＦＲ２、リンフォトキシンβ受容体、ＯＸ４０、ＣＤ４０、Ｆａｓ、デコイ受容体３、ＣＤ２７、ＣＤ７０、ＣＤ２２６、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、２Ｂ４、ＣＤ３０、４－１ＢＢ、デス受容体３（ＤＲ３）、デス受容体４（ＤＲ４）、デス受容体５（ＤＲ５）、デス受容体６（ＤＲ６）、デコイ受容体１、デコイ受容体２、ＮＦκＢ活性化受容体（ＲＡＮＫ）、オステオプロテゲリン（ＯＰＧ）、ＴＷＥＡＫ受容体、ＴＡＣＩ、ＢＡＦＦ受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）、ＨＶＥＭ（ヘルペスウイルス侵入メディエーター、神経成長因子受容体、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、グルココルチコイド誘発性ＴＮＦ受容体（ＧＩＴＲ）、毒性及びＪＮＫ誘導因子（ＴＡＪ）、ＲＥＬＴ、ＴＮＦＲＳＦ２２、ＴＮＦＲＳＦ２３、エクトジスプラシンＡ２アイソフォーム受容体及びエクトジスプラシン１、無汗性受容体が挙げられる。ＴＮＦＲの追加の非限定的な例は、Ｎａｉｓｍｉｔｈ　ａｎｄ　Ｓｐｒａｎｇ（１９９８）Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　２３（２）：７４－７９に開示される。

【０４００】

ある特定の実施形態では、標的は、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）ファミリーのメンバーを含み得る。ＬＤＬＲの非限定的な例としては、ＬＤＬＲ、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（ＬＲＰ）１、ＬＲＰ１０、ＬＲＰ１Ｂ、ＬＲＰ２、ＬＲＰ４、ＬＲＰ５、ＬＲＰ５Ｌ、ＬＲＰ６、ＬＲＰ８、Ｎｉｄｏｇｅｎ（ＮＩＤ）－１、ＮＩＤ２、Ｓｏｒｔｉｌｉｎ関連受容体、Ｌ（ＳＯＲＬ１）、及び超低密度リポタンパク質受容体（ＶＬＤＬＲ）が挙げられる。

【０４０１】

ある特定の実施形態では、標的は、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）ファミリーのメンバーを含み得る。ＲＴＫの非限定的な例としては、白血球受容体チロシンキナーゼ（ＬＴＫ）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体（ＲＯＲ）、エフリン受容体（Ｅｐｈ）、Ｔｒｋ受容体、インスリン受容体（ＩＲ）、及びＴｉｅ２が挙げられる。ＲＴＫの追加の非限定的な例は、Ａｌｅｘａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｔｈｅ　Ｃｏｎｃｉｓｅ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　２０１３／１４：Ｅｎｚｙｍｅｓ．Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１７０：１７９７－１８６７、Ｌｉ　ａｎｄ　Ｈｒｉｓｔｏｖａ（２０１０）、及びＬｅｍｍｏｎ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｅｓｓｉｎｇｅｒ（２０１０）Ｃｅｌｌ　１４１（７）：１１１７－１１３４に開示されている。

【０４０２】

他の実施形態では、細胞表面受容体は、成長ホルモン受容体、インスリン受容体、レプチン受容体、Ｆｌｔ－３リガンド受容体、またはインスリン様成長因子（ＩＧＦ）－Ｉ受容体であってもよい。例示的な受容体としては、例えば、ｈＥＰＯＲ（Ｓｉｍｏｎ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｂｌｏｏｄ　７６，３１－３）、ｍＥＰＯＲ（Ｄ’Ａｎｄｒｅａ，ＡＤ．ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｃｅｌｌ　５７，２７７－２８５）、ｈＧ－ＣＳＦ

Ｒ（Ｆｕｋｕｎａｇａ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８７，８７０２－８７０６）、ｍＧ－ＣＳＦＲ（Ｆｕｋｕｎａｇａ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ ６１，３４１－３５０）、ｈＴＰＯＲ（Ｖｉｇｏｎ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．（１９９２）８９，５６４０－５６４４）、ｍＴＰＯＲ（Ｓｋｏｄａ，ＲＣ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）１２，２６４５－２６５３）、ｈＩｎｓＲ（Ｕｌｌｒｉｃｈ，Ａ．ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３，７５６－７６１）、ｈＦｌｔ－３（Ｓｍａｌｌ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９１，４５９－４６３）、ｈＰＤＧＦＲ（Ｇｒｏｎｗａｌｄ，Ｒ ＧＫ．ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８５，３４３５－３４３９）、ｈＩＦＮａ／ｂ Ｒ（Ｕｚｅ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｃｅｌｌ ６０，２２５－２３４、及びＮｏｖｉｃｋ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｃｅｌｌ ７７，３９１－４００）が挙げられる。

【０４０３】

ある特定の実施形態では、標的は、神経成長因子受容体ファミリー及び／または神経栄養因子受容体ファミリーのメンバーを含み得る。神経成長因子受容体及び神経栄養因子受容体の非限定的な例としては、ｐ７５（低親和性神経成長因子受容体（ＬＮＧＦＲ）とも称される）、ＴｒｋＡ、ＴｒｋＢ、及びＴｒｋＣが挙げられる。神経成長因子受容体及び神経栄養因子受容体の追加の非限定的な例は、Ｌｏｔｚ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．ｏｆ Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ６０（１）：１－７に開示されている。

【０４０４】

ある特定の実施形態では、標的は、成長因子受容体ファミリーのメンバーを含み得る。例えば、限定するものではないが、成長因子受容体は、ＪＡＫ／ＳＴＡＴ、ＭＡＰキナーゼ、及びＰＩ３キナーゼ経路を介してシグナル伝達する受容体であり得る。成長因子受容体の非限定的な例としては、線維芽細胞成長因子受容体（ＦＧＦＲ）、ＥｒｂＢファミリーの受容体（例えば、上皮細胞成長因子受容体（ＥＧＦＲ））、血管内皮細胞成長因子受容体（ＶＥＧＦＲ）及び血小板由来成長因子受容体（ＰＤＧＦＲ）が挙げられる。

【０４０５】

ある特定の実施形態では、標的は、細胞シグナルを誘導するためにヘテロ二量体またはヘテロ三量体を形成する受容体を含み得る。例えば、限定するものではないが、標的は、セリン／スレオニンキナーゼ受容体ファミリーのメンバーであり得る。セリン／スレオニンキナーゼ受容体の非限定的な例としては、アクチビンＡ受容体ＩＩ型様Ｉ（ＡＬＫ１）、アクチビンＡ受容体、Ｉ型（ＡＬＫ２）、骨形成タンパク質受容体、ＩＡ型（ＢＭＰＲ１Ａ）、アクチビンＡ受容体、ＩＢ型（ＡＬＫ４）、アクチビンＡ受容体、ＩＣ型（ＡＬＫ７）、トランスフォーミング成長因子、ベータ受容体１（ＴＧＦＢＲ１）、骨形成タンパク質受容体、ＩＢ型（ＢＭＰＲ１Ｂ）、トランスフォーミング成長因子、ベータ受容体ＩＩ（ＴＧＦＢＲ２）、骨形成タンパク質受容体、ＩＩ型（ＢＭＰＲ２）、抗ミュラー管ホルモン受容体、ＩＩ型（ＭＩＳＲ２）、アクチビンＡ受容体、ＩＩＡ型（ＡｃｔＲ２）、アクチビンＡ受容体、ＩＩＢ型（ＡｃｔＲ２Ｂ）、及びトランスフォーミング成長因子、ベータ受容体ＩＩＩ型（ＴＧＦＢＲ３）が挙げられる。

【０４０６】

ある特定の実施形態では、潜在的な標的は以下を除外する：５Ｔ４；ＡＤＡＭ－１０；ＡＤＡＭ－１２；ＡＤＡＭ １７；ＡＦＰ；ＡＸＬ；ＡＮＧＰＴ２炭疽菌抗原；ＢＳＧ；ＣＡＩＸ；ＣＡＸＩＩ；ＣＡ ７２－４；癌腫関連抗原ＣＴＡＡ１６．８８；ＣＣＬ１１；ＣＣＬ２；ＣＣＲ４；ＣＣＲ５；ＣＣＲ６；ＣＤ２；ＣＤ３Ｅ；ＣＤ４；ＣＤ５；ＣＤ６；ＣＤ１５；ＣＤ１８；ＣＤ１９；ＣＤ２０；ＣＤ２２；ＣＤ２４；ＣＤ２５；ＣＤ２９；ＣＤ３０；ＣＤ３２Ｂ；ＣＤ３３；ＣＤ３７；ＣＤ３８；ＣＤ４０；ＣＤ４０ＬＧ；ＣＤ４４；ＣＤ４７；ＣＤ５２；ＣＤ５６；ＣＤ６６Ｅ；ＣＤ７２；ＣＤ７４；ＣＤ７９ａ；ＣＤ７９ｂ；ＣＤ８０；ＣＤ８６；ＣＤ９８；ＣＤ１３７；ＣＤ１４７；ＣＤ１３８；ＣＤ１６８；ＣＤ２００；ＣＤ２４８；ＣＤ２５４；ＣＤ２５７；ＣＤＨ３；ＣＥＡ；ＣＥＡＣＡＭ５；ＣＥＡＣＡＭ６；ＣＥＡＣＡＭ８；クローディン４；ＣＳ－１；ＣＳＦ

２ＲＡ；ＣＳＰＧ－４；ＣＴＬＡ４；Ｃｒｉｐｔｏ；ＤＬＬ４；ＥＤ－Ｂ；ＥＦＮＡ２；ＥＧＦＲ；エンドセリンＢ受容体；ＥＮＰＰ３；ＥＰＣＡＭ；ＥＲＢＢ２；ＥＲＢＢ３；ＦＡＰアルファ；ＦｃガンマＲＩ；ＦＣＥＲ２；ＦＧＦＲ３；フィブリンＩＩベータ鎖；ＦＬＴ１；ＦＯＬＨ１；ＦＯＬＲ１；ＦＲＰ－１；ＧＤ３ガングリオシド；ＧＤＦ２；ＧＬＰ１Ｒ；グリピカン－３；ＧＰＮＭＢ；ＨＢＶ（肝炎Ｂウイルス）；ＨＣＭＶ（ヒトサイトメガロウイルス）；熱ショックタンパク質９０ホモログ［Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ］；単純ヘルペスウイルスｇＤ糖タンパク質；ＨＧＦ；ＨＩＶ－１；ＨＩＶ－１ ＩＩＩＢ ｇｐｌ２０ Ｖ３ループ；ＨＬＡ－ＤＲＢ（ＨＬＡ－ＤＲベータ）；ヒト呼吸器多核体ウイルス、糖タンパク質Ｆ；ＩＣＡＭ１；ＩＦＮＡ１；ＩＦＮＡ１；ＩＦＮＢ１二重特異性；ＩｇＥ Ｆｃ；ＩＧＦ１Ｒ；ＩＧＨＥ接続領域；ＩＬ１２Ｂ；ＩＬ１３；ＩＬ１５；ＩＬ１７Ａ；ＩＬＩＡ；ＩＬ１Ｂ；ＩＬ２ＲＡ；ＩＬ４；ＩＬ５；ＩＬ５ＲＡ；ＩＬ６；ＩＬ６Ｒ；ＩＬ９；インターロイキン－２受容体ベータサブユニット；ＩＴＧＡ２；ＩＴＧＡ２Ｂ ＩＴＧＢ３；ＩＴＧＡ４ ＩＴＧＢ７；ＩＴＧＡ５；ＩＴＧＡＬ；ＩＴＧＡＶ＿ＩＴＧＢ３；ＩＴＧＢ２；ＫＤＲ；Ｌ１ＣＡＭ；Ｌｅｗｉｓ－ｙ；リピドＡ、リポ多糖ＬＰＳのドメイン；ＬＴＡ；ＭＥＴ；ＭＭ Ｐ１４；ＭＭｐｌ５；ＭＳＴ１Ｒ；ＭＳＴＮ；ＭＵＣ１；ＭＵＣ４；ＭＵＣ１６；ＭＵＣ５ＡＣ；ＮＣＡ－９０顆粒球細胞抗原；ネクチン４；ＮＧＦ；ＮＲＰ；ＮＹ－ＥＳＯ－１；ＯＸ４０Ｌ；ＰＬＡＣ－１；ＰＬＧＦ；ＰＤＧＦＲＡ；ＰＤ１；ＰＤＬ１；ＰＳＣＡ；ホスファチジルセリン；ＰＴＫ－７；Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ血清型ＩＡＴＳ Ｏｉｌ；ＲＳＶ（ヒト呼吸器多核体ウイルス、糖タンパク質Ｆ）；ＲＯＲ１；ＲＴＮ４；ＳＥＬＬ；ＳＥＬＰ；ＳＴＥＡＰ１；志賀様毒素ＩＩ Ｂサブユニット［Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ］；ＳＬＡＭ７；ＳＬＣ４４Ａ４；ＳＯＳＴ；Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓリポテイコ酸；Ｔ細胞受容体アルファ＿ベータ；ＴＦ；ＴＧＦＢ１；ＴＧＦＢ２；ＴＭＥＦＦ２；ＴＮＣ；ＴＮＦ；ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ；ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ；ＴＮＦＲＳＦ１２Ａ；ＴＮＦＳＦ１３；ＴＮＦＳＦ１４；ＴＮＦＳＦ２；ＴＮＦＳＦ７；ＴＲＡＩＬＲ２；ＴＲＯＰ２；ＴＹＲＰ１；ＶＡＰ－１；及びビメンチン。

【０４０７】

例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＯＸ４０である。

【０４０８】

別の例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＤＲ５である。

【０４０９】

別の例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＧＩＴＲである。

【０４１０】

別の例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＣＤ２７である。

【０４１１】

別の例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、ＣＤ１３７である。

【０４１２】

別の例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、Ｔｉｅ２である。

【０４１３】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドまたは抗原結合複合体は、本明細書に記載の複合体または抗原結合ポリペプチドを対象に投与することを含む、対象における細胞表面受容体の作動のために使用され得る。

【０４１４】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）は、例えば、前がん性、非転移性、転移性、及びがん性腫瘍（例えば、早期がん）を含む腫瘍、がん、アレルギー性または炎症性障害、自己免疫疾患、ホルモン障害を含む、受容体アゴニズムから利益を得るであろう様々な疾患または障害の治療または予防のため、あるいは、がん（例えば、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、腎細胞癌、神経膠腫、または卵巣癌）、アレルギー性もしくは炎症性障害、または自己免疫疾患を発症する危険性のある対象の治療のため

に、使用され得る。いくつかの実施形態では、がんは、尿路上皮癌（ｕＢＣ）、黒色腫、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、腎癌、または膀胱癌である。

【０４１５】

ある特定の実施形態では、標的は、眼に発現された細胞表面受容体を含み得る。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の抗原結合複合体は、例えば、長時間作用する治療薬をもたらす、細胞表面受容体に対するそれらの強化されたアゴニズム及び／またはそれらの増加したサイズ（例えば、典型的なモノクローナル抗体と比較して）により、眼の療法に有益であり得ると考えられる。例示的な眼の標的は、限定されないが、上皮成長因子（ＥＧＦ）受容体、血管内皮細胞成長因子（ＶＥＧＦ）受容体、Ｔｉｅ２、及び線維芽細胞成長因子を含む。眼の標的は、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｓ，Ｅ．Ｂ．ｅｔａｌ．（２００９）Ｐｒｏｇ．Ｒｅｔｉｎ．Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．２８：１１７－４４においてより詳細に考察されている。

【０４１６】

ある特定の実施形態では、標的は、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を標的とするために使用されるがんまたは他の悪性細胞上に発現された細胞表面受容体を含み得る。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の抗原結合複合体は、受容体を標的とし、細胞の内部移行を促進し、それにより、目的の治療化合物を送達することにより、ＡＤＣとしての使用に有益であり得ると考えられる。一般に、ＡＤＣは、がん細胞またはがん治療薬の標的により発現される細胞表面抗体を標的とする。かかる抗原としては、例えば、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、細胞表面受容体タンパク質及び他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存制御因子、細胞増殖制御因子、組織の発達または分化と関連する（例えば、それに機能的に寄与することが知られているか、もしくは想定される）分子、リンフォカイン、サイトカイン、細胞周期制御に関与する分子、脈管形成に関与する分子、ならびに血管新生に関連する（例えば、それに機能的に寄与することが知られているか、もしくは想定される）分子が挙げられる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子（すなわち、ＣＤタンパク質）であり得る。抗原結合複合体が結合することができる抗原は、上述の分類のうちの１つのサブセットのメンバーであり得、該カテゴリーの他のサブセット（複数可）は、（目的の抗原に関して）異なる特徴を有する他の分子／抗原を含む。ＡＤＣの例示的な標的には、限定されないが、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１６、ＳＴＥＡＰ１、ＮＡＰＩ２Ｂ、ＬＹ６Ｅ、Ｂ７Ｈ４、ＣＤ７９Ｂ、及びＣＤ２２が含まれる。

【０４１７】

抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）化合物の例示的な実施形態は、抗原結合複合体（Ａｂ）及び薬物部分（Ｄ）を含み、複合体は、リンカー部分（Ｌ）によりＤに結合され、組成物は、次式Ｉを有し、

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

【０４１８】

式中、ｐは、１、２、３、または４である。薬物部分は、例えば、操作された遊離システインを有するシステイン操作された抗体を使用して、本開示の複合体に結合され得る。

【０４１９】

本発明のＡＤＣ化合物には、抗がん活性に関する有用性を有するものが含まれる。特に、本化合物は、リンカーによって薬物部分、すなわち毒素にコンジュゲート、すなわち共有結合した、複合体を含む。薬物が抗体にコンジュゲートされていないとき、その薬物は、細胞傷害性作用または細胞増殖抑制作用を有する。薬物部分の生物活性は、したがって、抗原結合複合体へのコンジュゲーションによって調節される。本発明の抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、有効容量の細胞傷害性剤を腫瘍組織に選択的に送達し、それにより、より高い選択性、すなわちより低い有効用量を達成することができる。

【０４２０】

抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の薬物部分（Ｄ）には、細胞傷害性作用または細

胞増殖抑制作用を有する任意の化合物、部分、または基が含まれる。薬物部分としては、（ｉ）化学療法剤（マイクロチューブリン阻害剤、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはＤＮＡインターカレーターとして機能し得る）、（ｉｉ）タンパク質毒素（酵素的に機能し得る）、及び（ｉｉｉ）放射性同位体が挙げられる。

【０４２１】

例示的な薬物部分としては、マイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、トリコテセン、ＣＣ１０６５、カリケアマイシン、及び他のエンジイン抗生物質、タキサン、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）、１－（クロロメチル）－２，３－ジヒドロ－１Ｈ－ベンゾ［ｅ］インドール（ＣＢＩ）二量体、ＣＢＩ－ＰＢＤヘテロ二量体、アントラサイクリン、ならびにそれらの立体異性体、同配体、類似体、または誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４２２】

マイタンシノイド薬物部分として使用するのに好適なマイタンシン化合物は、当該技術分野で周知であり、既知の方法に従って天然源から単離するか、遺伝子組換え技法を用いて産生するか（Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ（２００２）ＰＲＯＣ．ＮＡＴ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ．（ＵＳＡ）９９：７９６８－７９７３を参照されたい）、またはマイタンシノール及びマイタンシノール類似体を既知の方法に従って合成により調製してもよい。

【０４２３】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としては、Ｃ－１９－デクロロ（ＵＳ４２５６７４６）（アンサミトシン（ａｎｓａｍｙｔｏｃｉｎ）Ｐ２の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製される）、Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－デメチル）＋／－Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４３６１６５０号及び同第４３０７０１６号）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓもしくは Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓを使用する脱メチル化、またはＬＡＨを使用する脱塩素化によって調製される）、ならびにＣ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－デクロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（塩化アシルを使用するアシル化によって調製される）等の修飾された芳香族環を有するもの、ならびに他の位置に修飾を有するものが挙げられる。

【０４２４】

例示的なマイタンシノイド薬物部分には、Ｃ－９－ＳＨ（ＵＳ４４２４２１９）（マイタンシノールのH_2SまたはP_2S_5との反応によって調製される）、Ｃ－１４－アルコキシメチル（デメトキシ／CH_2OR）（ＵＳ４３３１５９８）、Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアルコキシメチル（CH_2OHまたはCH_2OAc）（ＵＳ４４５０２５４）（Ｎｏｃａｒｄｉａから調製される）、Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（ＵＳ４３６４８６６）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓによるマイタンシノールの転換によって調製される）、Ｃ－１５－メトキシ（米国特許第４３１３９４６号及び同第４３１５９２９号）（Ｔｒｅｗｉａ　ｎｕｄｌｆｌｏｒａから単離される）、Ｃ－１８－Ｎ－デメチル（米国特許第４３６２６６３号及び同第４３２２３４８号）（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓによるマイタンシノールの脱メチル化によって調製される）、ならびに４，５－デオキシ（ＵＳ４３７１５３３）（マイタンシノールの三塩化チタン／ＬＡＨ還元によって調製される）等の修飾を有するものも含まれる。マイタンシン化合物上の多数の位置が、連結の種類に応じて、連結位置として有用であることが知られている。例えば、エステル連結の形成には、ヒドロキシル基を有するＣ－３位、ヒドロキシメチルで修飾したＣ－１４位、ヒドロキシル基で修飾したＣ－１５位、及びヒドロキシル基を有するＣ－２０位は、全て好適である。

【０４２５】

薬物部分には、カリケアマイシン、ならびにその類似体及び誘導体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖ＤＮＡの切断をもたらすことができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、ＵＳ５７１２３７４、ＵＳ５７１４５８６、ＵＳ５７３９１１６、ＵＳ５７６７２８５、ＵＳ５７７０７０１、ＵＳ５７７０７１０、ＵＳ５７７３００１、ＵＳ５８７７２９６を参照

されたい。使用することができるカリケアマイシンの構造類似体としては、γ_1^I、α_2^I、α_3^I、Ｎ－アセチル－γ_1^I、ＰＳＡＧ、及びθ^I_1（Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：３３３６－３３４２（１９９３）、Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：２９２５－２９２８（１９９８））が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣは、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤＢ二量体は、特定のＤＮＡ配列を認識し、それに結合する。天然産物アントラマイシンであるＰＢＤは、１９６５年に最初に報告された（Ｌｅｉｍｇｒｕｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９６５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８７：５７９３－５７９５、Ｌｅｉｍｇｒｕｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９６５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８７：５７９１－５７９３）。それ以来、天然に存在する、及び類似体の両方のいくつかのＰＢＤが報告されている（Ｔｈｕｒｓｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．１９９４，４３３－４６５（三環系ＰＢＤ足場の二量体を含む）（ＵＳ６８８４７９９、ＵＳ７０４９３１１、ＵＳ７０６７５１１、ＵＳ７２６５１０５、ＵＳ７５１１０３２、ＵＳ７５２８１２６、ＵＳ７５５７０９９）。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、二量体構造が、Ｂ型ＤＮＡの副溝との等螺旋性（ｉｓｏｈｅｌｉｃｉｔｙ）に適切な三次元形状を付与し、それによって結合部位において滑合がもたらされると考えられている（Ｋｏｈｎ，Ｉｎ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ ＩＩＩ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３－１１（１９７５）、Ｈｕｒｌｅｙ ａｎｄ Ｎｅｅｄｈａｍ－ＶａｎＤｅｖａｎｔｅｒ，（１９８６）Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．，１９：２３０－２３７）。Ｃ２アリール置換基を有する二量体ＰＢＤ化合物は、細胞傷害性剤として有用であることが示された（Ｈａｒｔｌｅｙ ｅｔ ａｌ（２０１０）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．７０（１７）：６８４９－６８５８、Ａｎｔｏｎｏｗ（２０１０）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５３（７）：２９２７－２９４１、Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ａｎｄ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １９（２２）：６４６３－６４６６）。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、ＰＢＤ化合物は、それらをＮ１０位において、インビボで除去可能である窒素保護基で保護することによって、プロドラッグとして用いることができる（ＷＯ００／１２５０７、ＷＯ２００５／０２３８１４）。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、１つ以上のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされた抗原結合複合体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質、及びそれらの類似体は、ピコモル以下の濃度で二重鎖ＤＮＡ切断をもたらすことができる（Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：３３３６－３３４２、Ｌｏｄｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：２９２５－２９２８）。カリケアマイシンは、細胞内作用部位を有するが、ある特定の例において、血漿膜を容易には横断しない。したがって、いくつかの実施形態において、抗体媒介性内部移行を通したこれらの薬剤の細胞取り込みによって、それらの細胞傷害性作用を大いに強化することができる。カリケアマイシン薬物部分を有する抗体－薬物コンジュゲートを調製する方法の非限定的な例は、例えば、ＵＳ５７１２３７４、ＵＳ５７１４５８６、ＵＳ５７３９１１６、及びＵＳ５７６７２８５に記載されている。

【０４２９】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣは、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤＢ二量体は、特定のＤＮＡ配列を認識し、それに結合する。天然産物アントラマイシンであるＰＢＤは、１９６５年に最初に報告された（Ｌｅｉｍｇｒｕｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９６５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８７：５７９３－５７９５、Ｌｅｉｍｇｒｕｂｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（１９６５）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．

Ｓｏｃ．，８７：５７９１－５７９３）。それ以来、天然に存在する、及び類似体の両方のいくつかのＰＢＤが報告されている（Ｔｈｕｒｓｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．１９９４，４３３－４６５（三環系ＰＢＤ足場の二量体を含む）（ＵＳ６８８４７９９、ＵＳ７０４９３１１、ＵＳ７０６７５１１、ＵＳ７２６５１０５、ＵＳ７５１１０３２、ＵＳ７５２８１２６、ＵＳ７５５７０９９）。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、二量体構造が、Ｂ型ＤＮＡの副溝との等螺旋性（ｉｓｏｈｅｌｉｃｉｔｙ）に適切な三次元形状を付与し、それによって結合部位において滑合がもたらされると考えられている（Ｋｏｈｎ，Ｉｎ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ ＩＩＩ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３－１１（１９７５）、Ｈｕｒｌｅｙ ａｎｄ Ｎｅｅｄｈａｍ－ＶａｎＤｅｖａｎｔｅｒ，（１９８６）Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．，１９：２３０－２３７）。Ｃ２アリール置換基を有する二量体ＰＢＤ化合物は、細胞傷害性剤として有用であることが示された（Ｈａｒｔｌｅｙ ｅｔ ａｌ（２０１０）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．７０（１７）：６８４９－６８５８、Ａｎｔｏｎｏｗ（２０１０）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５３（７）：２９２７－２９４１、Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ（２００９）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ａｎｄ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １９（２２）：６４６３－６４６６）。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、ＡＤＣは、アントラサイクリンを含む。アントラサイクリンは、細胞傷害性活性を呈する抗生物質化合物である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、研究は、アントラサイクリンが、１）薬物分子の、細胞のＤＮＡへのインターカレーションによってＤＮＡ依存的核酸合成を阻害すること、２）次に細胞巨大分子と反応して細胞への損傷を引き起こすフリーラジカルの薬物による産生、及び／または３）薬物分子と細胞膜との相互作用を含む、いくつかの異なる機序によって、細胞を死滅させるように動作し得ることを示した（例えば、Ｃ．Ｐｅｔｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｒａｎｓｐｏｒｔ Ａｎｄ Ｓｔｏｒａｇｅ Ｏｆ Ａｎｔｈｒａｃｙｃｌｉｎｅ Ｉｎ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｌｅｕｋｅｍｉａ”ｉｎ Ａｎｔｈｒａｃｙｃｌｉｎｅ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｎ．Ｒ．Ｂａｃｈｕｒ，“Ｆｒｅｅ Ｒａｄｉｃａｌ Ｄａｍａｇｅ”（同上）ｐｐ．９７－１０２を参照されたい）。それらは潜在的に細胞傷害性であるため、アントラサイクリンは、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌、及び肉腫等の多数のがんの治療に使用されている（例えば、Ｐ．Ｈ－Ｗｉｅｒｎｉｋ，ｉｎ Ａｎｔｈｒａｃｙｃｌｉｎｅ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｓｔａｔｕｓ Ａｎｄ Ｎｅｗ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｐ１１を参照されたい）。

【０４３１】

アントラサイクリンの非限定的な例としては、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ネモルビシン、及びそれらの誘導体が挙げられる。ダウノルビシン及びドキソルビシンのイムノコンジュゲート及びプロドラッグが調製され、研究された（Ｋｒａｔｚ ｅｔ ａｌ（２００６）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．１３：４７７－５２３、Ｊｅｆｆｒｅｙ ｅｔ ａｌ（２００６）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ&Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １６：３５８－３６２、Ｔｏｒｇｏｖ ｅｔ ａｌ（２００５）Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１６：７１７－７２１、Ｎａｇｙ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：８２９－８３４、Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｂｉｏｏｒｇ．& Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔｅｒｓ １２：１５２９－１５３２、Ｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ（２００２）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４５：４３３６－４３４３、ＥＰ０３２８１４７、ＵＳ６６３０５７９）。抗体－薬物コンジュゲートＢＲ９６－ドキソルビシンは、腫瘍関連抗原Ｌｅｗｉｓ－Ｙと特異的に反応し、第Ｉ相及び第ＩＩ相試験において評価されている（Ｓａｌｅｈ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １８：２２８２－２２９２、Ａｊａｎｉ ｅｔ ａｌ（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｊｏｕｒ．６：７８－８１、Ｔｏｌｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ（１９９９）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １７：４７８－４８４）。

【０４３２】
いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、１つ以上のアマトキシン分子にコンジュゲートされた抗原結合複合体を含む。アマトキシンは、８個のアミノ酸で構成される環状ペプチドである。それらは、Ａｍａｎｉｔａ ｐｈａｌｌｏｉｄｅｓマッシュルームから単離され得るか、または合成的に調製され得る。アマトキシンは、哺乳類細胞のＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼＩＩを特異的に阻害し、それにより患部細胞の転写及びタンパク質生合成も阻害する。細胞内の転写の阻害により、成長及び増殖が停止する。例えば、Ｍｏｌｄｅｎｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．ＪＮＣＩ １０４：１－１３（２０１２）、ＷＯ２０１０１１５６２９、ＷＯ２０１２０４１５０４、ＷＯ２０１２１１９７８７、ＷＯ２０１４０４３４０３、ＷＯ２０１４１３５２８２、及びＷＯ２０１２１１９７８７（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。いくつかの実施形態では、１つ以上のアマトキシン分子は、１つ以上のα－アマニチン分子である。

【０４３３】
他の薬物分子としては、タンパク質毒素、例えば、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖（Ｖｉｔｅｔｔａ ｅｔ ａｌ（１９８７）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：１０９８）、アブリンＡ鎖、モデッシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）（ＷＯ９３／２１２３２）が挙げられる。

【０４３４】
ある特定の実施形態では、抗原結合複合体は二重特異性であり、標的は、がんまたは他の悪性細胞上に発現された細胞表面受容体、及びＴ細胞等の免疫細胞によって発現された細胞表面受容体（例えば、Ｔ細胞依存性二重特異性複合体またはＴＤＢ）を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の抗原結合複合体は、より大きな細胞選択性及び／または治療インデックスをもたらし得る、例えば、それらの改善された結合力により、ＴＤＢとしての使用に有益であり得る。

【０４３５】
例示的なＴ細胞発現標的には、限定されないが、ＣＤ３が含まれる。ＣＤ３（分化３のクラスター）Ｔ細胞共受容体は、タンパク質複合体であり、４つの異なる鎖で構成される。哺乳動物において、複合体は、ＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、及び２つのＣＤ３ε鎖を含有する。これらの鎖は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）及びζ鎖と会合して、Ｔリンパ球において活性化シグナルを生成する。ＴＣＲ、ζ鎖、及びＣＤ３分子は一緒にＴＣＲ複合体を形成する。本明細書で使用される場合、「ＣＤ３」という用語は、任意のヒト源由来の任意の天然ＣＤ３を指す。本用語は、「完全長」でプロセシングされていないタンパク質、ならびに細胞内のプロセシングから生じるタンパク質の任意の形態またはＣＤ３鎖（ポリペプチド）（例えば、成熟ポリペプチド）のうちの１つ以上を包含する。本用語には、ＣＤ３の天然に存在する変異型及びアイソフォーム、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含される。例えば、ＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、及びＣＤ３ε鎖、ならびに配列の説明は、ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０４２３４、ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０７７６６、及びｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０９６９３に提供されている。

【０４３６】
いくつかの実施形態では、二重特異性複合体は、ヒトＣＤ３イプシロン（ＣＤ３ε）ポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、二重特異性複合体は、他のＴＣＲサブユニットに関連して、天然Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）複合体のヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、二重特異性複合体は、ヒトＣＤ３ガンマ（

ＣＤ３γ）ポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、二重特異性複合体は、他のＴＣＲサブユニットに関連して、天然Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）複合体のヒトＣＤ３ガンマポリペプチドに結合する。

【０４３７】

生物活性を有するその抗ＣＤ３抗体を特定するためのアッセイが既知である。生物活性には、インビボ、インビトロ、またはエクスビボのいずれかで、例えば、ＣＤ３ポリペプチド（例えば、Ｔ細胞の表面上のＣＤ３）またはそのペプチド断片に結合することが含まれ得る。本発明の多重特異性（例えば、二重特異性）抗原結合複合体（例えば、１つの抗がん抗原アーム及びＣＤ３ポリペプチドを認識する別のアームを有するＴＤＢ抗体）の場合、生物活性は、例えば、エフェクター細胞活性化（例えば、ＣＤ８＋及び／またはＣＤ４＋Ｔ細胞）活性化）、エフェクター細胞集団の拡張（すなわち、Ｔ細胞計数の増加）、標的細胞集団の低減（すなわち、それらの細胞表面上にＨＥＲ２を発現する細胞集団の減少）、及び／または標的細胞死滅も含み得る。かかる生物活性をインビボ及び／またはインビトロで有する抗体が提供される。ある特定の実施形態では、本開示の複合体は、かかる生物活性について試験される。

【０４３８】

ある特定の実施形態では、標的は、血液－脳関門（ＢＢＢ）の細胞上に発現された細胞表面受容体を含み得る。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の抗原結合複合体は、例えば、受容体媒介性取り込みのそれらの可能性による脳の障害または疾患の治療のために、ＢＢＢを横断して治療薬（例えば、治療化合物、または目的の標的及びＢＢＢの構成成分に特異性を有する二重特異性抗原結合複合体）を輸送する際に使用するのに有益であり得ると考えられる。ＢＢＢの細胞により発現される例示的な標的には、限定されないが、トランスフェリン受容体、インスリン様成長因子受容体、インスリン受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１及び２、ならびにジフテリア毒素受容体が含まれる。治療薬のＢＢＢ標的のさらなる説明は、例えば、Ｊｏｎｅｓ，Ａ．Ｒ．ａｎｄ　Ｓｈｕｓｔａ，Ｅ．Ｖ．（２００７）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２４：１７５９－７１に見出すことができる。

【０４３９】

ＯＸ４０アゴニストの使用

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、対象における免疫応答の強化、がんの治療、がんの予防、他のがん療法の有効性の強化、ワクチン有効性の強化、ウイルスもしくは細菌疾患もしくは障害の治療、またはＴ細胞応答の調節のために使用され得る。

【０４４０】

一態様では、有効量の、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を個体に投与することを含む、がんを有する個体における免疫機能（例えば、細胞媒介性免疫応答を上方制御することによる）の強化方法が提供される。一態様では、有効量の、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を個体に投与することを含む、がんを有する個体におけるＴ細胞機能の強化方法が提供される。

【０４４１】

いくつかの実施形態では、「Ｔ細胞機能の強化」は、エフェクターまたはメモリーＴ細胞が再生、持続、または増幅された生物機能を有するように誘導する、引き起こさせる、または刺激することを含む。Ｔ細胞機能の強化の例としては、介入前のかかるレベルと比べた、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞からのγ－インターフェロンの分泌の増加、ＣＤ４＋メモリー及び／またはエフェクターＴ細胞からのγ－インターフェロンの分泌の増加、ＣＤ４＋エフェクター及び／またはメモリーＴ細胞の増殖の増加、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の増殖の増加、抗原応答性（例えば、クリアランス）の増加が挙げられる。一実施形態では、強化のレベルは、少なくとも５０％、代替的に６０％、７０％、８０％、９０％

、１００％、１２０％、１５０％、２００％である。この強化を測定する様式は、当業者に既知である。

【０４４２】

一態様では、有効量の、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を個体に投与することを含む、がんを有する個体における免疫機能（例えば、免疫機能不全及び／または機能不全の免疫応答もしくは免疫細胞を低減することにより）の強化方法が提供される。いくつかの実施形態では、免疫機能不全の関連における「機能不全」とは、抗原刺激への免疫応答性が低減した状態を指す。いくつかの実施形態では、「機能不全性」はまた、抗原認識に対する不応性または無応答性、特に、抗原認識を下流Ｔ細胞エフェクター機能、例えば増殖、サイトカイン産生（例えばガンマインターフェロン）、及び／または標的細胞死滅に変換する能力の障害を含む。

【０４４３】

一態様では、有効量の、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を個体に投与することを含む、がんを有する個体における腫瘍免疫の治療方法及び／または腫瘍免疫原性の強化方法が提供される。いくつかの実施形態では、「腫瘍免疫」とは、腫瘍が免疫認識及びクリアランスを回避するプロセスを指す。したがって、いくつかの実施形態では、治療的概念として、腫瘍免疫は、かかる回避が減衰し、腫瘍が免疫系によって認識及び攻撃されるときに「治療される」。腫瘍認識の例としては、腫瘍結合、腫瘍収縮、及び腫瘍クリアランスが挙げられる。いくつかの実施形態では、「免疫原性」とは、免疫応答を誘発する特定の物質の能力を指す。腫瘍は、免疫原性であり、腫瘍免疫原性の強化により、免疫応答による腫瘍細胞のクリアランスが補助される。

【０４４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはＣＤ４＋エフェクターＴ細胞によるガンマインターフェロン産生を増加させる（例えば、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体での治療前の増殖及び／またはサイトカイン産生と比較して）ことによって、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体での治療前の、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の総数、または、例えば、総ＣＤ４＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ４＋細胞の割合）を増加させる。

【０４４５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗体での治療前の腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔエフェクター細胞の数と比較して、腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の総数、または、例えば、ＣＤ４５＋細胞中のＣＤ８＋細胞の割合）を増加させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、ＯＸ４０に結合するアゴニス

ト抗原結合複合体での治療前の、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋Ｔ細胞の数と比較して、ガンマインターフェロンを発現する腫瘍内（浸潤性）ＣＤ８＋エフェクターＴ細胞の数（例えば、総ＣＤ８＋細胞中のガンマインターフェロンを発現するＣＤ８＋細胞の割合）を増加させる。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、メモリーＴ細胞増殖を増加させる、及び／またはメモリー細胞によるサイトカイン産生を増加させることによって、メモリーＴ細胞機能を強化する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ガンマインターフェロンである。

【０４４７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞増殖、及び／またはエフェクターＴ細胞サイトカイン分泌）のＴｒｅｇ抑制を減少させることによって、Ｔｒｅｇ機能を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクターＴ細胞は、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞である。いくつかの実施形態では、抗ヒトＯＸ４０アゴニスト抗原結合複合体は、腫瘍内（浸潤性）Ｔｒｅｇの数（例えば、Ｔｒｅｇの総数、または、例えば、ＣＤ４＋細胞中のＦｏｘ３ｐ＋細胞の割合）を低減させる。

【０４４８】

一実施形態では、本開示は、治療有効量の、ＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における免疫応答の強化方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、哺乳動物の免疫系の任意の応答を刺激、喚起、増加、改善、または増強することを伴う。免疫応答は、細胞応答（すなわち、細胞傷害性Ｔリンパ球媒介性等の、細胞媒介性）であるか、または体液性応答（すなわち、抗体媒介性応答）であってもよく、また、一次または二次免疫応答であってもよい。免疫応答の強化の例としては、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞活性の増加及び細胞溶解Ｔ細胞の生成が挙げられる。免疫応答の強化は、細胞傷害性Ｔリンパ球アッセイ、サイトカインの放出（例えばＩＬ－２産生）、腫瘍の退縮、腫瘍保有動物の生存、抗体産生、免疫細胞増殖、細胞表面マーカーの発現、及び細胞傷害活性を含むが、これらに限定されない、当業者に既知のいくつかのインビトロまたはインビボ測定を用いて評価することができる。典型的には、本開示の方法は、未治療の哺乳動物または特許請求される方法を用いて治療されていない動物による免疫応答と比較したときの、哺乳動物による免疫応答を強化する。一実施形態では、本方法は、細胞免疫応答、特に細胞傷害性Ｔ細胞応答を強化する。別の実施形態では、細胞免疫応答は、Ｔヘルパー細胞応答である。また別の実施形態では、免疫応答は、サイトカイン産生、特にＩＬ－２産生である。

【０４４９】

別の実施形態では、本開示は、治療有効量の、ＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるがんの治療方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、がんと診断された哺乳動物における望ましいまたは有益な作用を引き起こすことを伴う。望ましいまたは有益な作用には、がん細胞のさらなる成長もしくは広がりの阻害、がん細胞の死滅、がん再発の阻害、がんに関連する疼痛の低減、または動物の生存の改善が含まれ得る。がん再発の阻害は、放射線、化学療法、外科手術、または他の技法によって以前に治療されたことのあるがん部位及び周囲の組織を企図する。作用は、主観的または客観的のいずれかであり得る。例えば、動物がヒトである場合、ヒトは、改善または治療応答の客観的症状として、活力もしくは生命力の改善、または疼痛の減少を認め得る。代替的に、臨床医は、身体検査、臨床検査値、腫瘍マーカー、またはＸ線所見に基づく、腫瘍サイズまたは腫瘍負荷の減少を認め得る。治療応答に関して臨床医が観察し得るいくつかの臨

床徴候には、白血球数、赤血球数、血小板数、赤血球沈降速度、及び様々な酵素レベル等の検査の正常化が含まれる。追加的に、臨床医は、検出可能な腫瘍マーカーの減少を観察し得る。代替的に、超音波画像法、核磁気共鳴検査、及び陽電子放出検査等の、他の検査を用いて、客観的改善を評価することができる。

【０４５０】

一実施形態では、本開示は、治療有効量の、ＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるがんの予防方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、発がんまたは腫瘍発生の発現の証拠はないが、遺伝子スクリーニングによる決定または他の方法に関わらず、がんに対する素因が特定されている哺乳動物における、がんの遅延、阻害、または予防を伴う。本用語はまた、前悪性状態を有する哺乳動物の、前悪性状態の悪性腫瘍への進行を停止する、またはその退行を引き起こすための治療も包含する。前悪性状態の例としては、過形成、形成異常、及び異形成が挙げられる。

【０４５１】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＯＸ４０に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）による治療に適するがんには、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、膠芽腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、腎細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌、頭頸部癌、卵巣癌、中皮腫、及び多発性骨髄腫が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、膠芽腫、神経芽腫、黒色腫、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、及び肝細胞癌から選択される。さらにいくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、膠芽腫、及び乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）（これらのがんの転移形態を含む）から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、尿路上皮癌（ｕＢＣ）、黒色腫、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、腎癌、または膀胱癌である。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、がんの例としては、Ｂ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み型細胞ＮＨＬ、巨大腫瘤病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、及び移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、ならびに母斑症、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、Ｂ細胞増殖性障害、及びメーグス症候群に関連する異常血管増殖がさらに挙げられるが、これらに限定されない。より具体的な例としては、再発性または難治性ＮＨＬ、フロントライン低悪性度ＮＨＬ、第ＩＩＩ／ＩＶ病期ＮＨＬ、化学療法耐性ＮＨＬ、前駆Ｂリンパ芽球性白血病及び／またはリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病及び／または前リンパ球性白血病及び／または小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性リンパ腫、免疫細胞腫及び／またはリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、結節外辺縁帯－ＭＡＬＴリンパ腫、結節性辺縁帯リンパ腫、有毛細胞白血病、形質細胞腫及び／または形質細胞骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、濾胞中心リンパ腫（濾胞性）、中悪性度びまん性ＮＨＬ、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、侵襲性ＮＨＬ（侵襲性フロントラインＮＨＬ及び侵襲性再発性ＮＨＬを含む）、自家幹細胞移植後に再発するかまたはそれに対して不応性のＮＨＬ、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ、巨大腫瘤病変性ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、前駆体（末梢）大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／またはセザリー症候群、皮膚（ｓｋｉｎ）（皮膚（ｃｕｔａｎｅｏｕｓ））リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、血管中心性リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５３】
いくつかの実施形態では、がんの例としては、Ｂ細胞増殖性障害がさらに挙げられるがこれに限定されず、これにはリンパ腫（例えば、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ））及びリンパ球性白血病がさらに含まれるがこれらに限定されない。かかるリンパ腫及びリンパ球性白血病には、例えば、ａ）濾胞性リンパ腫、ｂ）小型非切れ込み型細胞性リンパ腫／バーキットリンパ腫（地域性バーキットリンパ腫、散発性バーキットリンパ腫、及び非バーキットリンパ腫を含む）、ｃ）辺縁帯リンパ腫（結節外辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（粘膜関連リンパ組織リンパ腫、ＭＡＬＴ）、結節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、及び脾臓辺縁帯リンパ腫を含む）、ｄ）マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、ｅ）大細胞型リンパ腫（Ｂ細胞びまん性大細胞型リンパ腫（ＤＬＣＬ）、びまん性混合細胞型リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞性リンパ腫、血管中心性リンパ腫－肺Ｂ細胞リンパ腫を含む）、ｆ）有毛細胞性リンパ腫、ｇ）リンパ球性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ｈ）急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、ｉ）形質細胞腫瘍、形質細胞骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫、及び／またはｊ）ホジキン病が含まれる。
【０４５４】
これらの方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、がんは、Ｂ細胞増殖性障害である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、侵襲性ＮＨＬ、再発性侵襲性ＮＨＬ、再発性緩慢性ＮＨＬ、難治性ＮＨＬ、難治性緩慢性ＮＨＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫、白血病、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、またはマントル細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は、緩慢性ＮＨＬ及び／または侵襲性ＮＨＬ等のＮＨＬである。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞増殖性障害は、緩慢性濾胞性リンパ腫またはびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫である。
【０４５５】
本発明の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、がんは、ヒトエフェクター細胞を呈する（例えば、ヒトエフェクター細胞によって浸潤される）。ヒトエフェクター細胞を検出するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、ＩＨＣによるものが含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、高レベルのヒトエフェクター細胞を呈する。いくつかの実施形態では、ヒトエフェクター細胞は、ＮＫ細胞、マクロファージ、単球のうちの１つ以上である。いくつかの実施形態では、がんは、本明細書に記載される任意のがんである。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、膠芽腫、神経芽腫、黒色腫、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、胃癌、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、または肝細胞癌である。
【０４５６】
本明細書に記載の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせのいずれかで使用することができる。例えば、本明細書に記載の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）は、少なくとも１つの追加の治療薬と併用投与されてもよい。
【０４５７】
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また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、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体の投与は、追加の治療薬（単数または複数）の投与の前に、それと同時に、及び／またはその後に行われ得る。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体の投与、及び追加の治療薬の投与は、互いの約１ヶ月以内、または約１、２、もしくは３週間以内、または約１、２、３、４、５、もしくは６日以内に生じる。本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。
【０４５８】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）ま

たは複合体は、化学療法または化学療法剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、放射線療法または放射線療法剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、標的療法または標的治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、免疫療法または免疫療法剤、例えばモノクローナル抗体と共に投与されてもよい。

【０４５９】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化学化合物を含む。化学療法剤の例としては、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／ＯＳＩ　Ｐｈａｒｍ．）、ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ（登録商標）、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍ．）、ジスルフィラム、没食子酸エピガロカテキン、サリノスポラミドＡ、カーフィルゾミブ、１７－ＡＡＧ（ゲルダナマイシン）、ラディシコール、乳酸デヒドロゲナーゼＡ（ＬＤＨ－Ａ）、フルベストラント（ＦＡＳＬＯＤＥＸ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、スニチブ（ＳＵＴＥＮＴ（登録商標）、Ｐｆｉｚｅｒ／Ｓｕｇｅｎ）、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、メシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、フィナスネート（ＶＡＴＡＬＡＮＩＢ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（登録商標）、Ｓａｎｏｆｉ）、５－ＦＵ（５－フルオロウラシル）、ロイコボリン、ラパマイシン（シロリムス、ＲＡＰＡＭＵＮＥ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）、ラパチニブ（ＴＹＫＥＲＢ（登録商標）、ＧＳＫ５７２０１６、Ｇｌａｘｏ　Ｓｍｉｔｈ　Ｋｌｉｎｅ）、ロナファミブ（ＳＣＨ６６３３６）、ソラフェニブ（ＮＥＸＡＶＡＲ（登録商標）、Ｂａｙｅｒ　Ｌａｂｓ）、ゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＧ１４７８、アルキル化剤（チオテパ及びＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロホスファミド等）；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン；アジリジン、例えばベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパ；エチレンイミン及びメチラメラミン（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチロメラミンを含む）；アセトゲニン（特に、ブラタシン及びブラタシノン）；カンプトテシン（トポテカン及びイリノテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアゾゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；副腎皮質ステロイド（プレドニゾン及びプレドニゾロンを含む）；酢酸シプロテロン；５α－還元酵素（フィナステリド及びデュタステリドを含む）；ボリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、モセチノスタットドラスタチン；アルデスロイキン、タルクデュオカルマイシン（合成類似体ＫＷ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロマファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチン等；エンジイン抗生物質等の抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンγ１Ｉ及びカリケアマイシンω１Ｉ（Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．１９９４　３３：１８３－１８６）；ダイネミシンＡを含むダイネミシン；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチン発光団及び関連色素タンパク質エネジイン抗生物質発光団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン（ｃａｍｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）（ドキソルビシン）、モルフ

ォリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシン）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンＣ、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキサート及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補給剤、例えばフロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォミチン（ｅｌｆｏｍｉｔｈｉｎｅ）；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）；マイタンシノイド、例えばマイタンシン及びアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダムノール（ｍｏｐｉｄａｍｎｏｌ）；ニトラエリン（ｎｉｔｒａｅｒｉｎｅ）；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖複合体（ＪＨＳ Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇ．）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン（ｓｉｚｏｆｕｒａｎ）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；２，２’，２’’－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、Ｔ－２毒素、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、ＴＡＸＯＬ（パクリタキセル；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（登録商標）（クレモフォールを含まない）、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐａｒｔｎｅｒｓ，Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ，Ｉｌｌ．）、及びＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）（ドセタキセル、ドキセタキセル；Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）；クロランムブシル；ＧＥＭＺＡＲ（登録商標）（ゲムシタビン）；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体（シスプラチン及びカルボプラチン等）；ビンブラスチン；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標）（ビノレルビン）；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））；イバンドロネート；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド、例えばレチノイン酸；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体が挙げられる。

【０４６０】

化学療法剤には、（ｉ）抗エストロゲン剤及び選択的エストロゲン受容体調節剤（ＳＥＲＭ）等の、腫瘍に対してホルモン作用を制御または阻害するように作用する抗ホルモン剤（例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）；クエン酸タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン（ｉｏｄｏｘｙｆｅｎｅ）、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、及びＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）（クエン酸トレミファイン（ｔｏｒｅｍｉｆｉｎｅ ｃｉｔｒａｔｅ）を含む）；（ｉｉ）副腎におけるエストロゲ

ン産生を制御するアロマターゼ酵素を阻害する、アロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）（酢酸メゲストロール）、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）（エキセメスタン、Ｐｆｉｚｅｒ）、フォルメスタニー（ｆｏｒｍｅｓｔａｎｉｅ）、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）（ボロゾール）、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）（レトロゾール；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、及びＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）（アナストロゾール；ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）等；（ｉｉｉ）抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；ブセレリン、トリプテレリン（ｔｒｉｐｔｅｒｅｌｉｎ）、酢酸メドロキシプロゲステロン、ジエチルスチルベストロール、プレマリン、フルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸（ｔｒａｎｓｒｅｔｉｏｎｉｃ ａｃｉｄ）、フェンレチニド、ならびにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；（ｉｖ）タンパク質キナーゼ阻害剤；（ｖ）脂質キナーゼ阻害剤；（ｖｉ）アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、ＰＫＣ－アルファ、Ｒａｌｆ、及びＨ－Ｒａｓ等；（ｖｉｉ）リボザイム、例えば、ＶＥＧＦ発現阻害剤（例えば、ＡＮＧＩＯＺＹＭＥ（登録商標））及びＨＥＲ２発現阻害剤；（ｖｉｉｉ）遺伝子療法ワクチン等のワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）、及びＶＡＸＩＤ（登録商標）；ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）、ｒＩＬ－２；トポイソメラーゼ１阻害剤、例えばＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；ならびに（ｉｘ）上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体も含まれる。

【０４６１】

化学療法剤にはまた、抗体、例えば、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ）、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ（登録商標）、Ｉｍｃｌｏｎｅ）、パニツムマブ（ＶＥＣＴＩＢＩＸ（登録商標）、Ａｍｇｅｎ）、リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｂｉｏｇｅｎ Ｉｄｅｃ）、ペルツズマブ（ＯＭＮＩＴＡＲＧ（登録商標）、２Ｃ４、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、トシツモマブ（Ｂｅｘｘａｒ、Ｃｏｒｉｘｉａ）、及び抗体薬物コンジュゲート、ゲムツズマブオゾガマイシン（ＭＹＬＯＴＡＲＧ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）も含まれる。本発明の化合物と組み合わせて薬剤として治療可能性を有するさらなるヒト化モノクローナル抗体には、アポリズマブ、アセリズマブ（ａｓｅｌｉｚｕｍａｂ）、アトリズマブ、バピネオズマブ、ビバツズマブメルタンシン（ｂｉｖａｔｕｚｕｍａｂ ｍｅｒｔａｎｓｉｎｅ）、カンツズマブメルタンシン、セデリズマブ（ｃｅｄｅｌｉｚｕｍａｂ）、セトリズマブペゴール、シドフシツズマブ（ｃｉｄｆｕｓｉｔｕｚｕｍａｂ）、シドツズマブ（ｃｉｄｔｕｚｕｍａｂ）、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エプラツズマブ、エルリズマブ（ｅｒｌｉｚｕｍａｂ）、フェルビズマブ（ｆｅｌｖｉｚｕｍａｂ）、フォントリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、マツズマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、モトビズマブ（ｍｏｔｏｖｉｚｕｍａｂ）、ナタリズマブ、ニモツズマブ（ｎｉｍｏｔｕｚｕｍａｂ）、ノロビズマブ（ｎｏｌｏｖｉｚｕｍａｂ）、ヌマビズマブ（ｎｕｍａｖｉｚｕｍａｂ）、オクレリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パスコリズマブ（ｐａｓｃｏｌｉｚｕｍａｂ）、ペクフシツズマブ（ｐｅｃｆｕｓｉｔｕｚｕｍａｂ）、ペクツズマブ（ｐｅｃｔｕｚｕｍａｂ）、ペキセリズマブ（ｐｅｘｅｌｉｚｕｍａｂ）、ラリビズマブ（ｒａｌｉｖｉｚｕｍａｂ）、ラニビズマブ、レスリビズマブ（ｒｅｓｌｉｖｉｚｕｍａｂ）、レスリズマブ、レシビズマブ（ｒｅｓｙｖｉｚｕｍａｂ）、ロベリズマブ（ｒｏｖｅｌｉｚｕｍａｂ）、ルプリズマブ（ｒｕｐｌｉｚｕｍａｂ）、シブロツズマブ（ｓｉｂｒｏｔｕｚｕｍａｂ）、シプリズマブ、ソンツズマブ（ｓｏｎｔｕｚｕｍａｂ）、タカツズマブテトラキセタン（ｔａｃａｔｕｚｕｍａｂ ｔｅｔｒａｘｅｔａｎ）、タドシズマブ（ｔａｄｏｃｉｚｕｍａｂ）、タリズマブ、テフィバズマブ（ｔｅｆｉｂａｚｕｍａ

ｂ）、トシリズマブ、トラリズマブ（ｔｏｒａｌｉｚｕｍａｂ）、ツコツズマブセルモロイキン（ｔｕｃｏｔｕｚｕｍａｂ ｃｅｌｍｏｌｅｕｋｉｎ）、ツクシツズマブ（ｔｕｃｕｓｉｔｕｚｕｍａｂ）、ウマビズマブ（ｕｍａｖｉｚｕｍａｂ）、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、ビジリズマブ、及びインターロイキン－１２ ｐ４０タンパク質を認識するように遺伝子修飾された組換えヒト配列専用完全長ＩｇＧ１λ抗体である、抗インターロイキン－１２（ＡＢＴ－８７４／Ｊ６９５、Ｗｙｅｔｈ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）が挙げられる。

【０４６２】

化学療法剤としては、ＥＧＦＲに結合するか、または他の様式でそれと直接相互作用し、そのシグナル伝達活性を阻止または低減する化合物を指し、代替的に「ＥＧＦＲアンタゴニスト」とも称される「ＥＧＦＲ阻害剤」も挙げられる。かかる薬剤の例としては、ＥＧＦＲに結合する抗体及び小分子が挙げられる。ＥＧＦＲに結合する抗体の例としては、ＭＡｂ５７９（ＡＴＣＣ ＣＲＬ ＨＢ８５０６）、ＭＡｂ４５５（ＡＴＣＣ ＣＲＬ ＨＢ８５０７）、ＭＡｂ２２５（ＡＴＣＣ ＣＲＬ８５０８）、ＭＡｂ５２８（ＡＴＣＣ ＣＲＬ８５０９）（Ｍｅｎｄｅｌｓｏｈｎらの米国特許第４，９４３，５３３号を参照されたい）、ならびにこれらの変異型（キメラ化２２５（Ｃ２２５またはセツキシマブ；ＥＲＢＵＴＩＸ（登録商標）及び再成形ヒト２２５（Ｈ２２５）（Ｉｍｃｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．のＷＯ９６／４０２１０を参照されたい））；ＩＭＣ－１１Ｆ８、完全ヒトＥＧＦＲ標的抗体（Ｉｍｃｌｏｎｅ）；ＩＩ型変異体ＥＧＦＲに結合する抗体（米国特許第５，２１２，２９０号）；米国特許第５，８９１，９９６号に記載のＥＧＦＲに結合するヒト化抗体及びキメラ抗体；ならびにＥＧＦＲに結合するヒト抗体、例えばＡＢＸ－ＥＧＦまたはパニツムマブ（ＷＯ９８／５０４３３、Ａｂｇｅｎｉｘ／Ａｍｇｅｎを参照されたい）；ＥＭＤ５５９００（Ｓｔｒａｇｌｉｏｔｔｏ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ３２Ａ：６３６－６４０（１９９６））；ＥＧＦＲ結合においてＥＧＦ及びＴＧＦ－アルファの両方と競合するＥＧＦＲに対して指向されたヒト化ＥＧＦＲ抗体ＥＭＤ７２００（マツズマブ）（ＥＭＤ／Ｍｅｒｃｋ）；ヒトＥＧＦＲ抗体ＨｕＭａｘ－ＥＧＦＲ（ＧｅｎＭａｂ）；Ｅ１．１、Ｅ２．４、Ｅ２．５、Ｅ６．２、Ｅ６．４、Ｅ２．１１、Ｅ６．３、及びＥ７．６．３として既知であり、かつＵＳ６，２３５，８８３に記載の完全ヒト抗体；ＭＤＸ－４４７（Ｍｅｄａｒｅｘ Ｉｎｃ）；ならびにｍＡｂ８０６またはヒト化ｍＡｂ８０６（Ｊｏｈｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９（２９）：３０３７５－３０３８４（２００４））が挙げられる。抗ＥＧＦＲ抗体は、細胞傷害性剤にコンジュゲートされ、したがって、イムノコンジュゲートを生成し得る（例えば、ＥＰ６５９，４３９Ａ２，Ｍｅｒｃｋ Ｐａｔｅｎｔ ＧｍｂＨを参照されたい）。ＥＧＦＲアンタゴニストとしては、米国特許第５，６１６，５８２号、同第５，４５７，１０５号、同第５，４７５，００１号、同第５，６５４，３０７号、同第５，６７９，６８３号、同第６，０８４，０９５号、同第６，２６５，４１０号、同第６，４５５，５３４号、同第６，５２１，６２０号、同第６，５９６，７２６号、同第６，７１３，４８４号、同第５，７７０，５９９号、同第６，１４０，３３２号、同第５，８６６，５７２号、同第６，３９９，６０２号、同第６，３４４，４５９号、同第６，６０２，８６３号、同第６，３９１，８７４号、同第６，３４４，４５５号、同第５，７６０，０４１号、同第６，００２，００８号、及び同第５，７４７，４９８号、ならびに以下のＰＣＴ公開：ＷＯ９８／１４４５１、ＷＯ９８／５００３８、ＷＯ９９／０９０１６、及びＷＯ９９／２４０３７に記載される化合物等の小分子が挙げられる。特定の小分子ＥＧＦＲアンタゴニストには、ＯＳＩ－７７４（ＣＰ－３５８７７４、エルロチニブ、ＴＡＲＣＥＶＡ（登録商標）Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／ＯＳＩ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）；ＰＤ１８３８０５（ＣＩ１０３３、２－プロペンアミド、Ｎ－［４－［（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ］－７－［３－（４－モルホリニル）プロポキシ］－６－キナゾリニル］－、二塩酸塩、Ｐｆｉｚｅｒ Ｉｎｃ．）；ＺＤ１８３９、ゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ（登録商標））４－（３’－クロロ－４’－フルオロアニリノ）－７－メトキシ－６－（３－モルフォリノプロポキシ）キナゾリン、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）；ＺＭ

１０５１８０（（６－アミノ－４－（３－メチルフェニル－アミノ）－キナゾリン、Ｚｅｎｅｃａ）；ＢＩＢＸ－１３８２（Ｎ８－（３－クロロ－４－フルオロ－フェニル）－Ｎ２－（１－メチル－ピペリジン－４－イル）－ピリミド［５，４－ｄ］ピリミジン－２，８－ジアミン、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ）；ＰＫＩ－１６６（（Ｒ）－４－［４－［（１－フェニルエチル）アミノ］－１Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－６－イル］－フェノール）；（Ｒ）－６－（４－ヒドロキシフェニル）－４－［（１－フェニルエチル）アミノ］－７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン）；ＣＬ－３８７７８５（Ｎ－［４－［（３－ブロモフェニル）アミノ］－６－キナゾリニル］－２－ブチンアミド）；ＥＫＢ－５６９（Ｎ－［４－［（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ］－３－シアノ－７－エトキシ－６－キノリニル］－４－（ジメチルアミノ）－２－ブテンアミド）（Ｗｙｅｔｈ）；ＡＧ１４７８（Ｐｆｉｚｅｒ）；ＡＧ１５７１（ＳＵ　５２７１；Ｐｆｉｚｅｒ）；二重ＥＧＦＲ／ＨＥＲ２チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、ラパチニブ（ＴＹＫＥＲＢ（登録商標）、ＧＳＫ５７２０１６またはＮ－［３－クロロ－４－［（３－フルオロフェニル）メトキシ］フェニル］－６［５［［［２－メチルスルホニル）エチル］アミノ］メチル］－２－フラニル］－４－キナゾリンアミン）が挙げられる。

【０４６３】

化学療法剤には、「チロシンキナーゼ阻害剤」も含み、前段落に記載のＥＧＦＲ標的薬物；小分子ＨＥＲ２チロシンキナーゼ阻害剤、例えばＴａｋｅｄａから入手可能なＴＡＫ１６５；ＥｒｂＢ２受容体チロシンキナーゼの経口選択的阻害剤であるＣＰ－７２４，７１４（Ｐｆｉｚｅｒ及びＯＳＩ）；二重ＨＥＲ阻害剤、例えばＥＧＦＲに優先的に結合するが、ＨＥＲ２及びＥＧＦＲ過剰発現細胞の両方を阻害するＥＫＢ－５６９（Ｗｙｅｔｈから入手可能）；ラパチニブ（ＧＳＫ５７２０１６；ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅから入手可能）；経口ＨＥＲ２及びＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤；ＰＫＩ－１６６（Ｎｏｖａｒｔｉｓから入手可能）；ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えばカネルチニブ（ＣＩ－１０３３；Ｐｈａｒｍａｃｉａ）；Ｒａｆ－１阻害剤、例えばＲａｆ－１シグナル伝達を阻害するＩＳＩＳ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓから入手可能なアンチセンス薬剤ＩＳＩＳ－５１３２；非ＨＥＲ標的ＴＫ阻害剤、例えばメシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ（登録商標）、Ｇｌａｘｏ　ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅから入手可能）；多標的チロシンキナーゼ阻害剤、例えばスニチニブ（ＳＵＴＥＮＴ（登録商標）、Ｐｆｉｚｅｒから入手可能）；ＶＥＧＦ受容体チロシンキナーゼ阻害剤、例えばバタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４、Ｎｏｖａｒｔｉｓ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　ＡＧから入手可能）；ＭＡＰＫ細胞外制御キナーゼＩ阻害剤ＣＩ－１０４０（Ｐｈａｒｍａｃｉａから入手可能）；キナゾリン、例えばＰＤ　１５３０３５，４－（３－クロロアニリノ）キナゾリン；ピリドピリミジン；ピリミドピリミジン；ピロロピリミジン、例えばＣＧＰ　５９３２６、ＣＧＰ　６０２６１、及びＣＧＰ　６２７０６；ピラゾロピリミジン、４－（フェニルアミノ）－７Ｈ－ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン；クルクミン（ジフェルロイルメタン、４，５－ビス（４－フルオロアニリノ）フタルイミド）；ニトロチオフェン部分を含有するチルホスチン；ＰＤ－０１８３８０５（Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒ）；アンチセンス分子（例えば、ＨＥＲコード核酸に結合するもの）、キノキサリン（米国特許第５，８０４，３９６号）；トリホスチン（ｔｒｙｐｈｏｓｔｉｎ）（米国特許第５，８０４，３９６号）；ＺＤ６４７４（Ａｓｔｒａ　Ｚｅｎｅｃａ）；ＰＴＫ－７８７（Ｎｏｖａｒｔｉｓ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　ＡＧ）；ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えばＣＩ－１０３３（Ｐｆｉｚｅｒ）；Ａｆｆｉｎｉｔａｃ（ＩＳＩＳ　３５２１、Ｉｓｉｓ／Ｌｉｌｌｙ）；メシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ（登録商標））；ＰＫＩ　１６６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）；ＧＷ２０１６（Ｇｌａｘｏ　ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）；ＣＩ－１０３３（Ｐｆｉｚｅｒ）；ＥＫＢ－５６９（Ｗｙｅｔｈ）；セマキシニブ（Ｐｆｉｚｅｒ）；ＺＤ６４７４（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）；ＰＴＫ－７８７（Ｎｏｖａｒｔｉｓ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　ＡＧ）；ＩＮＣ－１Ｃ１１（Ｉｍｃｌｏｎｅ）、ラパマイシン（シロリムス、ＲＡＰＡＭＵＮＥ（登録商標）；または以下の特許公開：米国特許第５，８０４，３９６号、ＷＯ１９９９／０９０

１６（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄ）；ＷＯ１９９８／４３９６０（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｙａｎａｍｉｄ）；ＷＯ１９９７／３８９８３（Ｗａｒｎｅｒ Ｌａｍｂｅｒｔ）；ＷＯ１９９９／０６３７８（Ｗａｒｎｅｒ Ｌａｍｂｅｒｔ）；ＷＯ１９９９／０６３９６（Ｗａｒｎｅｒ Ｌａｍｂｅｒｔ）；ＷＯ１９９６／３０３４７（Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ）；ＷＯ１９９６／３３９７８（Ｚｅｎｅｃａ）；ＷＯ１９９６／３３９７（Ｚｅｎｅｃａ）、及びＷＯ１９９６／３３９８０（Ｚｅｎｅｃａ）のいずれかに記載されるものを含む。

【０４６４】

化学療法剤には、デキサメタゾン、インターフェロン、コルヒチン、メトプリン、シクロスポリン、アンホテリシン、メトロニダゾール、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アミホスチン、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、ＢＣＧ生、ベバクジマブ、ベキサロテン、クラドリビン、クロファラビン、ダルベポエチンアルファ、デニロイキン、デクスラゾキサン、エポエチンアルファ、エロチニブ、フィルグラスチム、酢酸ヒストレリン、イブリツモマブ、インターフェロンアルファ－２ａ、インターフェロンアルファ－２ｂ、レナリドミド、レバミゾール、メスナ、メトキサレン、ナンドロロン、ネララビン、ノフェツモマブ、オプレルベキン、パリフェルミン、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペグアスパラガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペメトレキセド二ナトリウム、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、キナクリン、ラスブリカーゼ、サルグラモスチム、テモゾロミド、ＶＭ－２６、６－ＴＧ、トレミフェン、トレチノイン、ＡＴＲＡ、バルルビシン、ゾレドロネート、及びゾレドロン酸、ならびにそれらの薬学的に許容される塩も含まれる。

【０４６５】

化学療法剤には、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チクソコルトール、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ベタメタゾン、ベタメタゾンリン酸ナトリウム、デキサメサゾン、デキサメサゾンリン酸ナトリウム、フルオコルトロン、ヒドロコルチゾン－１７－ブチレート、ヒドロコルチゾン－１７－バレレート、ジプロピオン酸アクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン－１７－ブチレート、クロベタゾール－１７－プロピオネート、カプロン酸フルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロン、及び酢酸フルプレドニデン；フェニルアラニン－グルタミン－グリシン（ＦＥＧ）及びそのＤ異性体型（ｆｅＧ）等の免疫選択的抗炎症ペプチド（ＩｍＳＡＩＤ）（ＩＭＵＬＡＮ ＢｉｏＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，ＬＬＣ）；抗リウマチ薬、例えばアザチオプリン、シクロスポリン（ｃｉｃｌｏｓｐｏｒｉｎ）（シクロスポリンＡ）、Ｄ－ペニシラミン、金塩、ヒドロキシクロロキン、レフルノミドミノサイクリン（ｌｅｆｌｕｎｏｍｉｄｅｍｉｎｏｃｙｃｌｉｎｅ）、スルファサラジン、腫瘍壊死因子αアルファ（ＴＮＦα）ブロッカー、例えば、エタネルセプト（エンブレル）、インフリキシマブ（レミケード）、アダリムマブ（ヒュミラ）、セルトリズマブペゴル（シムジア）、ゴリムマブ（シンポニー）、インターロイキン１（ＩＬ－１）ブロッカー（例えば、アナキンラ（キネレット））、Ｔ細胞共刺激ブロッカー（例えば、アバタセプト（オレンシア））、インターロイキン６（ＩＬ－６）ブロッカー（例えば、トシリズマブ（ＡＣＴＥＭＥＲＡ）（登録商標））；インターロイキン１３（ＩＬ－１３）ブロッカー（例えば、レブリキズマブ）；インターフェロンアルファ（ＩＦＮ）ブロッカー（例えば、ロンタリズマブ（Ｒｏｎｔａｌｉｚｕｍａｂ））；ベータ７インテグリンブロッカー（例えば、ｒｈｕＭＡｂ Ｂｅｔａ７）；ＩｇＥ経路ブロッカー（例えば、抗Ｍ１プライム）；分泌型ホモ三量体ＬＴａ３及び膜結合型ヘテロ三量体ＬＴａ１／β２ブロッカー（例えば、抗リンホトキシンアルファ（ＬＴａ））；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）；その他の研究薬剤、例えば、チオプラチン（ｔｈｉｏｐｌａｔｉｎ）、ＰＳ－３４１、フェニルブチレート、ＥＴ－１８－ＯＣＨ３、もしくはファルネシルトラ

ンスフェラーゼ阻害剤（Ｌ－７３９７４９、Ｌ－７４４８３２）；ポリフェノール（例えば、ケルセチン、レスベラトロール、ピセアタンノール、没食子酸エピガロカテキン、テアフラビン、フラバノール、プロシアニジン、ベツリン酸、及びその誘導体）；オートファジー阻害剤（例えば、クロロキン）；デルタ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標））；ベーター－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；アセチルカンプトテシン、スコポレチン（ｓｃｏｐｏｌｅｃｔｉｎ）、及び９－アミノカンプトテシン；ポドフィロトキシン；テガフール（ＵＦＴＯＲＡＬ（登録商標））；ベキサロテン（ＴＡＲＧＲＥＴＩＮ（登録商標））；ビスホスホネート（例えば、クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）もしくはＯＳＴＡＣ（登録商標））、エチドロネート（ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標））、ＮＥ－５８０９５、ゾレドロン酸／ゾレドロネート（ＺＯＭＥＴＡ（登録商標））、アレンドロネート（ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標））、パミドロネート（ＡＲＥＤＩＡ（登録商標））、チルドロネート（ＳＫＥＬＩＤ（登録商標））、もしくはリセドロネート（ＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標））；ならびに表皮成長因子受容体（ＥＧＦ－Ｒ）；ワクチン、例えば、ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチン；ペリホシン、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、セレコキシブもしくはエトリコキシブ）、プロテオソーム阻害剤（例えば、ＰＳ３４１）；ＣＣＩ－７７９；ティピファルニブ（Ｒ１１５７７）；オラフェニブ（ｏｒａｆｅｎｉｂ）、ＡＢＴ５１０；Ｂｃｌ－２阻害剤（例えば、オブリメルセンナトリウム（ＧＥＮＡＳＥＮＳＥ（登録商標））；ピキサントロン；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、ロナファルニブ（ＳＣＨ　６６３６、ＳＡＲＡＳＡＲＴＭ）；及び上記のうちのいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸もしくは誘導体；ならびにＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法の略語）；及びＦＯＬＦＯＸ（５－ＦＵとロイコボリンと併用したオキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮＴＭ）での処置レジメンの略語）等の上記のうちの２つ以上の組み合わせも含まれる。

【０４６６】

化学療法剤としてはまた、鎮痛作用、解熱作用、及び抗炎症作用を有する非ステロイド抗炎症薬が挙げられ得る。ＮＳＡＩＤには、酵素シクロオキシゲナーゼの非選択的阻害剤が含まれる。ＮＳＡＩＤの具体的な例としては、アスピリン、プロピオン酸誘導体、例えば、イブプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、及びナプロキセン、酢酸誘導体、例えば、インドメタシン、スリンダク、エトドラク、ジクロフェナク、エノール酸誘導体、例えば、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、及びイソキシカム、フェナム酸誘導体、例えば、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸、ならびにＣＯＸ－２阻害剤、例えば、セレコキシブ、エトリコキシブ、ルミラコキシブ、パレコキシブ、ロフェコキシブ、ロフェコキシブ、及びバルデコキシブが挙げられる。ＮＳＡＩＤの適応は、リウマチ性関節炎、変形性関節炎、炎症性関節症、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、ライター症候群、急性痛風、月経困難症、転移性骨痛、頭痛及び片頭痛、術後疼痛、炎症及び組織損傷に起因する軽度～中程度の疼痛、発熱、腸閉塞症、ならびに腎疝痛等の状態の症状軽減であり得る。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＰＡＲＰ阻害剤（例えば、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、セディラニブ、ＢＭＮ６７３、ベリパリブ）、トラベクテジン、ｎａｂ－パクリタキセル（卵白結合パクリタキセル、ＡＢＲＡＸＡＮＥ）、トレバナニブ、パゾパニブ、セディラニブ、パルボシクリブ、エベロリムス、フルオロピリミジン（例えば、ＦＯＬＦＯＸ、ＦＯＬＦＩＲＩ）、ＩＦＬ、レゴラフェニブ、レオリジン（Ｒｅｏｌｙｓｉｎ）、アリムタ、ジカディア、スーテント、トーリセル（テムシロリムス）、インライタ（アキシチニブ、Ｐｆｉｚｅｒ）、アフィニトール（エベロリムス、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ネクサバール（ソラフェニブ、Ｏｎｙｘ／Ｂａｙｅｒ）、ヴォトリエント、パゾパニブ、アキシチニブ、ＩＭＡ－９０１、ＡＧＳ－００３、カボザンチニブ、ビンフルニン、Ｈｓｐ９０阻害剤（例え

ば、アパトルシン（ａｐａｔｏｒｓｉｎ）、Ａｄ－ＧＭ－ＣＳＦ（ＣＴ－００７０）、テマゾロミド（Ｔｅｍａｚｏｌｏｍｉｄｅ）、ＩＬ－２、ＩＦＮａ、ビンブラスチン、サロミド、ダカルバジン、シクロホスファミド、レナリドマイド、アザシチジン、レナリドマイド、ボルテゾミド（ｂｏｒｔｅｚｏｍｉｄ）（ＶＥＬＣＡＤＥ）、アムルビシン、カーフィルゾミブ、プララトレキサート、及び／またはエンザスタウリンと共に投与され得る。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＰＤ－１軸結合アンタゴニストと共に投与されてもよい。ＰＤ－１軸結合アンタゴニストには、ＰＤ－１結合アンタゴニスト、ＰＤ－Ｌ１結合アンタゴニスト、及びＰＤ－Ｌ２結合アンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。「ＰＤ－１」の代替名には、ＣＤ２７９及びＳＬＥＢ２が含まれる。「ＰＤ－Ｌ１」の代替名には、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－４、ＣＤ２７４、及びＢ７－Ｈが含まれる。「ＰＤ－Ｌ２」の代替名には、Ｂ７－ＤＣ、Ｂｔｄｃ、及びＣＤ２７３が含まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌｌ、及びＰＤ－Ｌ２は、ヒトＰＤ－１、ＰＤ－Ｌｌ、及びＰＤ－Ｌ２である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、ＰＤ－１の、そのリガンド結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、ＰＤ－１リガンド結合パートナーは、ＰＤ－Ｌｌ及び／またはＰＤ－Ｌ２である。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌｌ結合アンタゴニストは、ＰＤ－Ｌｌの、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、ＰＤ－Ｌｌ結合パートナーは、ＰＤ－１及び／またはＢ７－１である。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌ２結合アンタゴニストは、ＰＤ－Ｌ２の、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、ＰＤ－Ｌ２の結合パートナーは、ＰＤ－１である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、抗ＰＤ－１抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体）である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ＭＤＸ－１１０６（ニボルマブ、ＯＰＤＩＶＯ）、Ｍｅｒｃｋ　３４７５（ＭＫ－３４７５、ペムブロリズマブ、ＫＥＹＴＲＵＤＡ）、ＣＴ－０１１（ピジリズマブ）、ＭＥＤＩ－０６８０（ＡＭＰ－５１４）、ＰＤＲ００１、ＲＥＧＮ２８１０、ＢＧＢ－１０８、及びＢＧＢ－Ａ３１７からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のＦｃ領域）に融合したＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２の細胞外またはＰＤ－１結合部分を含むイムノアドヘシン）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１結合アンタゴニストはＡＭＰ－２２４である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌｌ結合アンタゴニストは、抗ＰＤ－Ｌｌ抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌｌ結合アンタゴニストは、ＹＷ２４３．５５．Ｓ７０、ＭＰＤＬ３２８０Ａ（アテゾリズマブ）、ＭＥＤＩ４７３６（デュルバルマブ）、ＭＤＸ－１１０５、及びＭＳＢ００１０７１８Ｃ（アベルマブ）（ａｖｅｌｕｍａｂ）からなる群から選択される。ＭＤＸ－１１０５、別名、ＢＭＳ－９３６５５９は、ＷＯ２００７／００５８７４に記載される抗ＰＤ－Ｌｌ抗体である。抗体ＹＷ２４３．５５．Ｓ７０（重鎖及び軽鎖可変領域はそれぞれ配列番号２０及び２１に示される）は、ＷＯ２０１０／０７７６３４Ａｌに記載される抗ＰＤ－Ｌｌである。ＭＤＸ－１１０６、別名、ＭＤＸ－１１０６－０４、ＯＮＯ－４５３８、ＢＭＳ－９３６５５８、またはニボルマブは、ＷＯ２００６／１２１１６８に記載される抗ＰＤ－１抗体である。Ｍｅｒｃｋ　３４７５、別名、ＭＫ－３４７５、ＳＣＨ－９００４７５、またはペンブロリズマブは、ＷＯ２００９／１１４３３５に記載される抗ＰＤ－１抗体である。ＣＴ－０１１、別名、ｈＢＡＴ、ｈＢＡＴ－１、またはピジリズマブは、ＷＯ２００９／１０１６１１に記載される抗ＰＤ－１抗体である。ＡＭＰ－２２４、別名、Ｂ７－ＤＣＩｇは、ＷＯ２０１０／０２７８２７及びＷＯ２０１１／０６６３４２に記載されるＰＤ－Ｌ２－Ｆｃ融合可溶性受容体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ＭＤＸ－１１０６である。「ＭＤＸ－１１０６」の代替名には、ＭＤＸ－１　１０６－０４、ＯＮＯ－４５３８、ＢＭＳ－９

３６５５８、またはニボルマブが含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、ニボルマブ（ＣＡＳ登録番号：９４６４１４－９４－４）である。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、活性化共刺激分子に対して指向されるアゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、活性化共刺激分子は、ＣＤ４０、ＣＤ２２６、ＣＤ２８、ＧＩＴＲ、ＣＤ１３７、ＣＤ２７、ＨＶＥＭ、またはＣＤ１２７が含まれ得る。いくつかの実施形態では、活性化共刺激分子に対して指向されるアゴニストは、ＣＤ４０、ＣＤ２２６、ＣＤ２８、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ１３７、ＣＤ２７、ＨＶＥＭ、またはＣＤ１２７に結合するアゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、阻害性共刺激分子に対して指向されるアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、阻害性共刺激分子には、ＣＴＬＡ－４（別名、ＣＤ１５２）、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＩＤＯ、ＴＩＧＩＴ、ＭＩＣＡ／Ｂ、またはアルギナーゼが含まれ得る。いくつかの実施形態では、阻害性共刺激分子に対して指向されるアンタゴニストは、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３（例えば、ＬＡＧ－３－ＩｇＧ融合タンパク質（ＩＭＰ３２１））、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＩＤＯ、ＴＩＧＩＴ、ＭＩＣＡ／Ｂ、またはアルギナーゼに結合するアンタゴニスト抗体である。

【０４７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＴＬＡ－４（別名ＣＤ１５２）に対して指向されるアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イピリムマブ（別名ＭＤＸ－０１０、ＭＤＸ－１０１、またはＹｅｒｖｏｙ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、トレメリムマブ（別名チシリムマブまたはＣＰ－６７５，２０６）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｂ７－Ｈ３（別名ＣＤ２７６）に対して指向されるアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＧＡ２７１と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＴＧＦベータに対して指向されるアンタゴニスト、例えば、メテリムマブ（ｍｅｔｅｌｉｍｕｍａｂ）（別名ＣＡＴ－１９２）、フレソリムマブ（ｆｒｅｓｏｌｉｍｕｍａｂ）（別名ＧＣ１００８）、またはＬＹ２１５７２９９と共に投与されてもよい。

【０４７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するＴ細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞またはＣＴＬ）の養子移入を含む治療と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＵＣＡＲＴ１９と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＷＴ１２８ｚと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＫＴＥ－Ｃ１９（Ｋｉｔｅ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＴＬ０１９（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ドミナントネガティブＴＧＦベータ受容体、例えばドミナントネガティブＴＧＦベータＩＩ型受容体を含むＴ細胞の養子移入を含む治療と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に

記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＨＥＲＣＲＥＥＭプロトコルを含む治療と共に投与されてもよい（例えば、ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒ　ＮＣＴ００８８９９５４を参照されたい）。

【０４７２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ１９に対して指向されるアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＯＲ００２０８と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ３８に対して指向されるアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ダラツムマブと共に投与されてもよい。

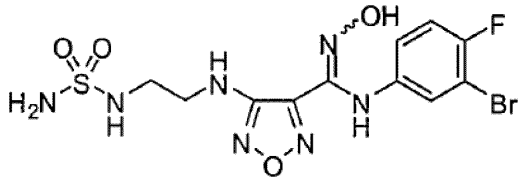
【０４７３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ１３７（別名ＴＮＦＲＳＦ９、４－１ＢＢ、またはＩＬＡ）に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ウレルマブ（ｕｒｅｌｕｍａｂ）（別名ＢＭＳ－６６３５１３）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ４０に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＰ－８７０８９３と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＯＸ４０（別名ＣＤ１３４）に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、異なる抗ＯＸ４０抗体（例えば、ＡｇｏｎＯＸ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ２７に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤＸ－１１２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、インドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）に対して指向されるアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストと共にあるのは、１－メチル－Ｄ－トリプトファン（別名、１－Ｄ－ＭＴ）である。

【０４７４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ１３７（別名ＴＮＦＲＳＦ９、４－１ＢＢ、またはＩＬＡ）に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ウレルマブ（ｕｒｅｌｕｍａｂ）（別名ＢＭＳ－６６３５１３）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ４０に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＰ－８７０８９３またはＲＯ７００９７８９と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＯＸ４０（別名ＣＤ１３４）に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ２７に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤＸ－１１２７（

別名バルリルマブ（ｖａｒｌｉｌｕｍａｂ））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、インドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）に対して指向されるアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストと共にあるのは、１－メチル－Ｄ－トリプトファン（別名、１－Ｄ－ＭＴ）である。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストは、ＷＯ２０１０／００５９５８（その内容は、本明細書に記録によって明確に組み込まれる）に示されるＩＤＯアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストは、４－（｛２－［（アミノスフホニル）アミノ］エチル｝アミノ）－Ｎ－（３－ブロモ－４－フルオロフェニル）－Ｎ’－ヒドロキシ－１，２，５－オキサジアゾール－３－カルボキシイミドアミド（例えば、ＷＯ２０１０／００５９５８の実施例２３に記載されるように）である。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストは、以下である：



。

いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストは、ＩＮＣＢ２４３６０である。いくつかの実施形態では、ＩＤＯアンタゴニストは、インドキシモド（１－メチル－トリプトファンのＤ異性体）である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗体－薬物コンジュゲートと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、メルタンシンまたはモノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗ＮａＰｉ２ｂ抗体－ＭＭＡＥコンジュゲート（別名ＤＮＩＢ０６００Ａ、ＲＧ７５９９、またはリファスツズマブベドチン（ｌｉｆａｓｔｕｚｕｍａｂ　ｖｅｄｏｔｉｎ））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、トラスツズマブエムタンシン（別名Ｔ－ＤＭ１、アドトラスツズマブエムタンシン、またはＫＡＤＣＹＬＡ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗ＭＵＣ１６抗体－ＭＭＡＥコンジュゲート、ＤＭＵＣ５７５４Ａと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗ＭＵＣ１６抗体－ＭＭＡＥコンジュゲート、ＤＭＵＣ４０６４Ａと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、エンドセリンＢ受容体（ＥＤＮＢＲ）を標的とする抗体－薬物コンジュゲート、例えばＭＭＡＥとコンジュゲートされたＥＤＮＢＲに対して指向される抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、リンパ球抗原６複合体、Ｅ遺伝子座（Ｌｙ６Ｅ）を標的とする抗体－薬物コンジュゲート、例えばＭＭＡＥとコンジュゲートされたＬｙ６Ｅに対して指向される抗体（別名ＤＬＹＥ５９５３Ａ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ポラツズマブベドチンと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ３０を標的とする抗体－薬物コンジュゲートと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＤＣＥＴＲＩＳ（別名ブレンツキシマブベドチン（ｂｒｅｎｔｕｘｉｍａｂ　ｖｅｄｏｔｉｎ））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ポラツズマブベドチンと共に投与

されてもよい。

【０４７５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、血管新生阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＶＥＧＦ、例えば、ＶＥＧＦ－Ａに対して指向される抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ（別名ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、アンジオポエチン２（別名Ａｎｇ２）に対して指向される抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＥＤＩ３６１７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＶＥＧＦＲ２に対して指向される抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ラムシルマブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＶＥＧＦ受容体融合タンパク質と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、アフリベルセプトと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ｚｉｖ－アフリベルセプト（別名ＶＥＧＦ　ＴｒａｐまたはＺａｌｔｒａｐ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＶＥＧＦ及びＡｎｇ２に対して指向される二重特異性抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＲＧ７２２１（別名バヌシズマブ（ｖａｎｕｃｉｚｕｍａｂ））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、血管新生阻害剤と共に、及びＰＤ－１軸結合アンタゴニスト（例えば、抗ＰＤ－１抗体等のＰＤ－１結合アンタゴニスト、抗ＰＤ－Ｌ１抗体等のＰＤ－Ｌ１結合アンタゴニスト、及び抗ＰＤ－Ｌ２抗体等のＰＤ－Ｌ２結合アンタゴニスト）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＰＤ－１軸結合アンタゴニスト（例えば、抗ＰＤ－１抗体等のＰＤ－１結合アンタゴニスト、抗ＰＤ－Ｌ１抗体等のＰＤ－Ｌ１結合アンタゴニスト、及び抗ＰＤ－Ｌ２抗体等のＰＤ－Ｌ２結合アンタゴニスト）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＤＸ－１１０６（ニボルマブ、ＯＰＤＩＶＯ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭｅｒｃｋ　３４７５（ＭＫ－３４７５、ペンブロリズマブ、ＫＥＹＴＲＵＤＡ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＣＴ－０１１（ピジリズマブ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＥＤＩ－０６８０（ＡＭＰ－５１４）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＰＤＲ００１と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＲＥＧＮ２８１０と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＢＧＢ－１０８と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＢＧＢ－Ａ３１７と共に投与されてもよい。いくつかの実施

形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＹＷ２４３．５５．Ｓ７０と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＰＤＬ３２８０Ａと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＥＤＩ４７３６と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＤＸ－１１０５と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベバシズマブ及びＭＳＢ００１０７１８Ｃ（アベルマブ（ａｖｅｌｕｍａｂ））と共に投与されてもよい。

【０４７６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗新生物薬剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＳＦ－１Ｒ（別名Ｍ－ＣＳＦＲまたはＣＤ１１５）を標的とする薬剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗ＣＳＦ－１Ｒ抗体（別名ＩＭＣ－ＣＳ４またはＬＹ３０２２８５５）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、抗ＣＳＦ－１Ｒ抗体、ＲＧ７１５５（別名ＲＯ５５０９５５４またはエマクツズマブ（ｅｍａｃｔｕｚｕｍａｂ））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、インターフェロン、例えばインターフェロンアルファまたはインターフェロンガンマと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｒｏｆｅｒｏｎ－Ａ（別名、組換えインターフェロンアルファ－２ａ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＭ－ＣＳＦ（別名、組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ｒｈｕ　ＧＭ－ＣＳＦ、サルグラモスチム、またはＬｅｕｋｉｎｅ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－２（別名アルデスロイキンまたはＰｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１２と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１５と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＬＴ－８０３と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ２０を標的とする抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ２０を標的とする抗体は、オビヌツズマブ（別名、ＧＡ１０１もしくはＧａｚｙｖａ（登録商標））またはリツキシマブである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＩＴＲを標的とする抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、ＧＩＴＲを標的とする抗体は、ＴＲＸ５１８である。いくつかの実施形態では、ＧＩＴＲを標的とする抗体は、ＭＫ０４１６６（Ｍｅｒｃｋ）である。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ブルトン型チロシンキナーゼ（ＢＴＫ）の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イブルチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イソクエン酸デヒド

ロゲナーゼ１（ＩＤＨ１）及び／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ２（ＩＤＨ２）の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＧ－１２０（Ａｇｉｏｓ）と共に投与されてもよい。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、オビヌツズマブ及びＰＤ－１軸結合アンタゴニスト（例えば、抗ＰＤ－１抗体等のＰＤ－１結合アンタゴニスト、抗ＰＤ－Ｌ１抗体等のＰＤ－Ｌ１結合アンタゴニスト、及び抗ＰＤ－Ｌ２抗体等のＰＤ－Ｌ２結合アンタゴニスト）と共に投与されてもよい。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、がんワクチンと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、ペプチドがんワクチンであり、これは、いくつかの実施形態では、個人化されたペプチドワクチンである。いくつかの実施形態では、ペプチドがんワクチンは、多価長ペプチド、多ペプチド、ペプチドカクテル、ハイブリッドペプチド、またはペプチドパルス樹状細胞ワクチンである（例えば、Ｙａｍａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ，１０４：１４－２１，２０１３を参照されたい）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、アジュバントと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＴＬＲアゴニスト、例えば、Ｐｏｌｙ－ＩＣＬＣ（別名Ｈｉｌｔｏｎｏｌ（登録商標））、ＬＰＳ、ＭＰＬ、またはＣｐＧ ＯＤＮを含む治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＨＭＧＢ１と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１０アンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－４アンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１３アンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ－１７アンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＨＶＥＭアンタゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、例えばＩＣＯＳ－Ｌの投与によってＩＣＯＳアゴニストと、またはＩＣＯＳに対して指向されるアゴニスト性の抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＸ３ＣＬ１を標的とする治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＸＣＬ９を標的とする治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＸＣＬ１０を標的とする治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＣＬ５を標的とする治療薬と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＬＦＡ－１またはＩＣＡＭ１アゴニストと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、セレクチンアゴニストと共に投与されてもよい。

【０４８０】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｂ－Ｒａｆの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベムラフェニブ（別名Ｚｅｌｂｏｒａｆ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ダブラフェニブ（ｄａｂｒａｆｅｎｉｂ）（別名Ｔａｆｉｎｌａｒ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、エンコラフェニブ（ＬＧＸ８１８）と共に投与されてもよい。

【０４８１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＥＧＦＲ阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、エルロチニブ（別名Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＥＧＦＲ－Ｔ７９０Ｍの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ゲフィチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、アファチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、セツキシマブ（別名Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、パニツムマブ（別名Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ロシレチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＺＤ９２９１と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＥＫ１（別名ＭＡＰ２Ｋ１）及び／またはＭＥＫ２（別名ＭＡＰ２Ｋ２）等のＭＥＫの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、コビメチニブ（別名ＧＤＣ－０９７３またはＸＬ－５１８）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、トラメチニブ（別名Ｍｅｋｉｎｉｓｔ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ビニメチニブと共に投与されてもよい。

【０４８２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｂ－Ｒａｆの阻害剤（例えば、ベムラフェニブまたはダブラフェニブ）及びＭＥＫ（例えば、ＭＥＫ１及び／またはＭＥＫ２）の阻害剤（例えば、コビメチニブまたはトラメチニブ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＥＲＫ（例えば、ＥＲＫ１／２）の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＤＣ－０９９４と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｂ－Ｒａｆの阻害剤、ＭＥＫの阻害剤、及びＥＲＫ１／２の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＥＧＦＲの阻害剤、ＭＥＫの阻害剤、及びＥＲＫ１／２の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、１つ以上のＭＡＰキナーゼ経路阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリ

ペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＫ１２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｋ－Ｒａｓの阻害剤と共に投与されてもよい。

【０４８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ｃ－Ｍｅｔの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、オナルツズマブ（ｏｎａｒｔｕｚｕｍａｂ）（別名ＭｅｔＭＡｂ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、未分化（ａｎａｐｌａｔｉｃ）リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＦ８０２（別名ＣＨ５４２４８０２またはアレクチニブ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、クリゾチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、セリチニブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ブパルリシブ（ｂｕｐａｒｌｉｓｉｂ）（ＢＫＭ－１２０）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ピクチリシブ（ｐｉｃｔｉｌｉｓｉｂ）（別名ＧＤＣ－０９４１）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ブパルリシブ（ｂｕｐａｒｌｉｓｉｂ）（別名ＢＫＭ－１２０）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ペリフォシン（別名ＫＲＸ－０４０１）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）のデルタ選択的阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イデラリシブ（ｉｄｅｌａｌｉｓｉｂ）（別名ＧＳ－１１０１またはＣＡＬ－１０１）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、タセリシブ（ｔａｓｅｌｉｓｉｂ）（別名ＧＤＣ－００３２）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＢＹＬ－７１９と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ａｋｔの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＫ２２０６と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＳＫ６９０６９３と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イパタセルチブ（ｉｐａｔａｓｅｒｔｉｂ）（別名ＧＤＣ－００６８）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ｍＴＯＲの阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、シロリムス（別名ラパマイシン）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、テムシロリムス（別名ＣＣＩ－７７９またはＴｏｒｉｓｅｌ（登録商標））と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、エベロリムス（別名ＲＡＤ００１）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプ

チド（例えば、抗体）または複合体は、リダホロリムス（ｒｉｄａｆｏｒｏｌｉｍｕｓ）（別名ＡＰ－２３５７３、ＭＫ－８６６９、またはデホロリムス（ｄｅｆｏｒｏｌｉｍｕｓ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＯＳＩ－０２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＡＺＤ８０５５と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＮＫ１２８と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、二重ＰＩ３Ｋ／ｍＴＯＲ阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＸＬ７６５と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＤＣ－０９８０と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＢＥＺ２３５（別名ＮＶＰ－ＢＥＺ２３５）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＢＧＴ２２６と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＳＫ２１２６４５８と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＰＦ－０４６９１５０２と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＰＦ－０５２１２３８４（別名ＰＫＩ－５８７）と共に投与されてもよい。

【０４８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、エストロゲン受容体を選択的に分解する薬剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＤＣ－０９２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＨＥＲ３の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、デュリゴツズマブ（ｄｕｌｉｇｏｔｕｚｕｍａｂ）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＬＳＤ１の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＭＤＭ２の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＢＣＬ２の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ベネトクラックスと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＨＫ１の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＧＤＣ－０５７５と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、活性化ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＥＲＩＶＥＤＧＥと共に投与されてもよい。

【０４８５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、放射線療法と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ゲムシタビンと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ｎａｂ－パクリタキセル（ＡＢＲＡＸＡＮＥ）と共に投与

されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、トラスツズマブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＴＶＥＣと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＩＬ２７と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、シクロホスファミドと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、Ｔ細胞を腫瘍に動員する薬剤と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、リリルマブ（ｌｉｒｉｌｕｍａｂ）（ＩＰＨ２１０２／ＢＭＳ－９８６０１５）と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、イデラリシブと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ３及びＣＤ２０を標的とする抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＲＥＧＮ１９７９と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＣＤ３及びＣＤ１９を標的とする抗体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ブリナツモマブと共に投与されてもよい。

【０４８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、腫瘍溶解性ウイルスと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、カルボプラチン及びｎａｂ－パクリタキセルと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、カルボプラチン及びパクリタキセルと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、シスプラチン及びペメトレキセドと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、シスプラチン及びゲムシタビンと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＦＯＬＦＯＸと共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体は、ＦＯＬＦＩＲＩと共に投与されてもよい。

【０４８７】

上述のかかる併用療法は、併用投与（２つ以上の治療薬が同じまた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、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド（例えば、抗体）または複合体の投与は、追加の治療薬及び／またはアジュバントの投与の前に、それと同時に、及び／またはその後に行われ得る。本発明の抗体または複合体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

【０４８８】

本発明の抗体または複合体（及び任意の追加の治療薬）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、ならびに局所治療のために所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。投薬は、部分的には、投与が短時間であるか、または長期的であるかに応じて、任意の好適な経路によるもの、例えば、静脈内注射または皮下注射等の注射によるものであり得る。単回または様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及び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本明細書で企図される。

【０４８９】

本発明の抗体または複合体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬さ

れ、投与されるであろう。この文脈で検討する要因には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、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含まれる。抗体または複合体は、必要ではないが、任意選択で、問題の障害を予防また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の量、障害または治療の種類、及び上で考察される他の要因に依存する。これらは、一般に、本明細書に記載のものと同じ投薬量で、本明細書に記載の投与経路によって、または本明細書に記載の投薬量の約１～９９％、または適切であると経験的／臨床的に決定される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【０４９０】

疾患の予防または治療に関して、本発明の抗体または複合体の適切な投薬量は（単独で、または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、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的でまたは治療目的で投与されるか、以前の療法、患者の病歴、及び抗体への応答、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体または複合体は、患者に、１回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、１回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、約１μｇ／ｋｇ～４０ｍｇ／ｋｇの抗体または複合体が、患者への投与のための初期候補投薬量であり得る。１つの典型的な１日用量は、上で言及した要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であり得る。数日間以上にわたって繰り返される投与に関して、状態に応じて、治療は、疾患の症状の所望される抑制が生じるまで、一般に持続される。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または３週間毎（例えば、患者が約２～約２０回、または例えば、約６回の用量の抗体を受けるように）投与されてもよい。最初のより高い負荷用量が投与され、続いて１回以上のより低い用量が投与され得る。しかしながら、他の投与量レジメンが有用であり得る。この療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【０４９１】

Ｔｉｅ２アゴニストの使用

ある特定の実施形態では、本開示は、治療有効量の、Ｔｉｅ２に結合する抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における疾患または障害の治療方法または予防方法を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＴｉｅ２アゴニストは、血管新生を刺激するために使用されてもよく、また、血管新生の促進が望ましい様々な臨床状況において使用することができる。かかる適応症の非限定的な例としては、再生組織の血管新生、虚血肢疾患、脳虚血、アテローム性動脈硬化症を含む血管炎症の状態、無血管性壊死、毛髪成長の刺激、及び勃起不全が挙げられる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＴｉｅ２アゴニストは、例えば漏出血管部位における、血管透過性を減少させるために使用されてもよい。かかる方法は、様々な臨床状況において使用することができ、その非限定的な例としては、脳卒中、黄斑変性、黄斑浮腫、リンパ浮腫、血液網膜関門の崩壊、血液脳関門の崩壊（例えば、化学療法による治療の間）、及び薬物送達を促進し、放射線感受性を高めるための腫瘍血管系の正常化が挙げられる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のＴｉｅ２アゴニストは、内皮細胞のアポトーシスを阻害するために使用されてもよい。かかる方法は、様々な臨床状況において使用することができ、その非限定的な例としては、腎線維症、脳卒中、黄斑変性、及び糖尿病合併症（例えば、腎臓、眼、皮膚、及び／または肢における）が挙げられる。他の実施形態では、本明細書に記載のＴｉｅ２アゴニストは、創傷治癒を刺激するのに使用されてもよい。

【０４９２】

スクリーニングアッセイ

また、アゴニスト活性を有するポリペプチドの特定方法が本明細書で提供される。具体的には、抗原結合ポリペプチドは、個々のポリペプチド（例えば、個々の抗体、抗体断片、リガンド等）として発現されるときにアゴニスト活性を有しない場合があるが、同じポ

リペプチドが本明細書に記載される四価の複合体の関連において提示されるとき、複合体は、アゴニスト活性を呈し得る。したがって、個々のポリペプチドのアゴニスト活性についてスクリーニングすることによって、偽陰性として破棄されるいくつかの候補、例えば、複合体に含有されるときにアゴニストとして作用する能力を有するが、単離形態で提示されるときにはかかる活性を呈しない、ポリペプチドが存在し得る。したがって、本明細書に記載の抗原結合複合体を候補ポリペプチドの最初のスクリーニングにおいて使用して、アゴニスト活性を有するポリペプチドを特定し得る。

【０４９３】

したがって、ある特定の実施形態では、本開示は、アゴニスト活性を有する抗原結合複合体（例えば、四価の抗原結合複合体）の新規の特定方法を提供する。本方法は、本明細書に記載の複数の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）を提供することと、抗原結合複合体を細胞表面受容体に対してスクリーニングすることと、細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する抗原結合複合体を選択することとを含む。ある特定の実施形態では、抗原結合複合体は、アミノ酸配列が互いに異なる、抗原結合複合体のライブラリとして提供されてもよい。かかるライブラリは、細胞表面受容体に結合し、細胞表面受容体に対するアゴニスト活性を有する抗原結合複合体を特定するのに非常に有用なリソースを提供する。

【０４９４】

ある特定の実施形態では、かかるスクリーニングアッセイに有用な抗原結合複合体は、各抗原結合複合体が四価であるライブラリであり得る。いくつかの実施形態では、複合体は、所与の複合体における各抗原結合ポリペプチドが同じエピトープに結合する単一特異性または単一エピトープ性であり、各四価の複合体は同じ標的に結合する異なる抗体、例えば、本質的に、所与の細胞表面標的に対して産生された単一特異性抗体の複合体のライブラリを含有する。いくつかの実施形態では、複合体は、各複合体が異なるエピトープ（例えば、同じ標的の）に結合する２つ以上の抗原結合ポリペプチドを含む二重特異性であり、各四価の複合体は、異なる組み合わせのエピトープ、例えば、本質的に、所与の細胞表面標的に対して産生された単一特異性抗体の複合体のライブラリを標的とする。かかるライブラリは、例えば、細胞表面受容体に結合し、受容体を作動する抗体（または抗原結合複合体）を特定するのに有用であろう。

【０４９５】

本明細書に記載の抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドは、それらの物理／化学特性及び生物機能について、当該技術分野で既知の様々なアッセイによって特徴付けることができる。例えば、本明細書で例示されるように、複合体の形成は、例えば、複合体の形成及び／または純度を監視するためにサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を用いてアッセイされ得る。

【０４９６】

ある特定の実施形態では、抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドは、Ｎ末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、質量分析法、イオン交換クロマトグラフィー、及びパパイン消化を含むが、これらに限定されない一連のアッセイによって、特徴付けることができる。

【０４９７】

ある特定の実施形態では、抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドは、例えば、抗原結合活性等の、生物活性について分析されてもよい。例えば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインＡイムノアッセイ等の技法を用いた任意の直接または競合結合アッセイを含む、抗原結合アッセイが当該技術分野で知られており、本明細書で使用することができる。

【０４９８】

別の態様では、競合アッセイを使用して、標的への結合について参照抗体と競合する抗体を特定することができる。ある特定の実施形態では、かかる競合抗体は、参照抗体によ

り結合されるのと同じエピトープ（例えば、直鎖状または立体構造エピトープ）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の方法が、Ｍｏｒｒｉｓ（１９９６）“Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，”ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．６６（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）に提供されている。

【０４９９】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化された標的ポリペプチドを、標的ポリペプチドに結合する第１の標識抗体（例えば、ＯＸ４０）、及び標的ポリペプチドへの結合について第１の抗体と競合するその能力について試験されている第２の未標識抗体を含む溶液中で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、固定化された標的ポリペプチドを、第１の標識抗体を含むが第２の未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。第１の抗体の標的ポリペプチドへの結合を許容する条件下でのインキュベーションの後、過剰な未結合抗体を除去し、固定化された標的ポリペプチドに関連する標識の量を測定する。固定化された標的ポリペプチドに関連する標識の量が、対照試料と比べて試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第２の抗体が標的ポリペプチドへの結合について第１の抗体と競合していることを示す。Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ｃｈ．１４（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ）を参照されたい。

【０５００】

他の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドは、アゴニスト活性について分析されてもよい。いくつかの実施形態では、アゴニスト活性は、インビトロで（例えば、インタクトな哺乳動物におけるインビボアッセイとは対照的に、細胞不含または細胞に基づくアッセイにおいて）試験される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドのアゴニスト活性は、成長に関してリガンドに依存する細胞が、細胞培養中に抗原結合複合体またはポリペプチドが添加されたときに、リガンドが添加されたときと比較して同じように成長するか否かを分析することによって、決定することができる。細胞が同じまたは同様の様態で成長する場合、抗原結合複合体またはポリペプチドは、アゴニスト活性を有すると決定される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドのアゴニスト活性は、固有のリガンド依存性活性（成長に限定されない）を有する細胞株が、細胞培養中に抗原結合複合体またはポリペプチドが添加されたときに、リガンドが添加されたときと比較して同じ反応を示すか否かを分析することによって、決定することができる。細胞株がリガンドに対するものと同じまたは同様の反応を示す場合、抗原結合複合体またはポリペプチドは、アゴニスト活性を有すると決定される。

【０５０１】

ある特定の実施形態では、上述の細胞成長シグナルを伝達することが可能な細胞は、リガンドに対して反応性の受容体を細胞表面上に発現する。これらの細胞は、リガンド（またはアゴニスト抗原結合複合体またはポリペプチド）が受容体に結合すると、細胞成長シグナルを伝達する。ある特定の実施形態では、アゴニスト活性についてのスクリーニングに有用な細胞は、細胞上の細胞表面受容体へのリガンドの結合に際して、増殖するかまたはシグナルを伝達する。他の実施形態では、細胞表面受容体が、細胞内にシグナルを伝達しない受容体である場合、非伝達受容体の細胞外ドメイン（例えば、リガンド結合ドメイン）を、細胞内にシグナルを伝達する受容体の細胞内ドメインに融合することによって、キメラ受容体を作製。リガンド結合受容体との融合によってキメラ受容体を構築するのに好適な受容体には、例えば、Ｇ－ＣＳＦ受容体、ｍｐｌ、ｎｅｕ、ＧＭ－ＣＳＦ受容体、ＥＰＯ受容体、ｃ－Ｋｉｔ、及びＦＬＴ－３受容体を含む、シグナルを伝達する任意の受容体が含まれる。かかる受容体を発現させるのに使用される細胞には、例えば、ＢａＦ３、ＮＦＳ６０、ＦＤＣＰ－１、ＦＤＣＰ－２、ＣＴＬＬ－２、ＤＡ－１、及びＫＴ－３が含まれる。

【０５０２】
ある特定の実施形態では、アゴニスト活性は、例えば、細胞内にシグナルを伝達することによってある特定の生理学的活性の変化を誘導するといった、細胞における特定の反応を誘導する、リガンド（または抗原結合複合体またはポリペプチド）結合によって引き起こされる任意の活性を指す。かかる生理学的活性には、例えば、成長活性、成長誘導活性、生存活性、分化活性、分化誘導活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化－還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、及びアポトーシス誘導活性が含まれる。
【０５０３】
本明細書に記載のアゴニスト活性は、当業者に既知の方法によって決定することができる。例えば、細胞成長を指標として用いる方法によって、アゴニスト活性を評価することができる。より具体的には、アゴニスト活性を決定しようとしている抗原結合複合体またはポリペプチドを、アゴニスト依存性成長を示す細胞に添加し、その細胞を培養する。次に、ＷＳＴ－８等の、生細胞数に応じて特定の波長で呈色反応を示す試薬を添加し、吸光度を測定する。測定された吸光度を指標として用いて、アゴニスト活性を決定することができる。
【０５０４】
ある特定の実施形態では、アゴニスト活性は、リガンド（または抗原結合複合体またはポリペプチド）への曝露に際しての細胞における定量的及び／または定性的変化を監視することができる指標を用いて、決定される。例えば、細胞不含アッセイ指標、細胞に基づくアッセイ指標、組織に基づくアッセイ指標、及びインビボアッセイ指標を用いることが可能である。細胞不含アッセイにおいて使用され得る指標には、酵素反応、タンパク質、ＤＮＡ、またはＲＮＡにおける定量的及び／または定性的変化が含まれる。かかる酵素反応には、例えば、アミノ酸転移反応、糖転移反応、脱水反応、脱水素反応、及び基質切断反応が含まれる。代替的に、タンパク質リン酸化、脱リン酸化、二量体化、多量体化、加水分解、及び解離；ＤＮＡまたはＲＮＡ増幅、切断、及び伸長が、細胞不含アッセイにおける指標として使用され得る。例えば、シグナル伝達経路の下流のタンパク質リン酸化が、検出指標として使用されてもよい。細胞表現型の改変、例えば、産物における定量的及び／または定性的改変、成長活性の改変、細胞数の改変、形態改変、または細胞特性の改変が、細胞に基づくアッセイにおける指標として使用され得る。産物には、例えば、分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、及びｍＲＮＡが含まれる。形態改変には、例えば、樹状突起形成及び／または樹状突起数の改変、細胞偏平度の改変、細胞伸長／軸方向比の改変、細胞サイズの改変、細胞内構造の改変、細胞集団の不均一性／均一性、ならびに細胞密度の改変が含まれる。かかる形態改変は、顕微鏡下で観察することができる。指標として使用される細胞特性には、アンカー依存性、サイトカイン依存性反応、ホルモン依存性、薬物耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、脈動活性、及び細胞内物質の改変が含まれる。細胞運動性には、細胞浸潤活性及び細胞遊走活性が含まれる。細胞内物質の改変には、例えば、酵素活性、ｍＲＮＡレベル、Ca^{2+}及びｃＡＭＰ等の細胞内シグナル伝達分子のレベル、ならびに細胞内タンパク質レベルの改変が含まれる。細胞膜受容体が使用される場合、受容体刺激によって誘導される細胞増殖活性の改変が、指標として使用され得る。組織に基づくアッセイにおいて使用される指標には、対象組織について十分な機能的改変が含まれる。インビボアッセイにおいては、組織重量の改変、血液系における改変（例えば、血球数、タンパク質含量、または酵素活性の改変）、電解質レベルの改変、及び循環系における改変（例えば、血圧または心拍数の改変）。
【０５０５】
かかる検出指標を測定するための任意の好適な方法が、本明細書に記載の方法に関連して使用され得る。例えば、吸光度、発光光度、発色現像、蛍光光度、放射能、蛍光偏光、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、及び蛍光共鳴エネルギー移動が使用され得る。これらの測定法は、当業者に既知であり、目的に応じて適切に選択され得る。例えば、吸収スペクトルは、従来の光度計、プレートリー

ダー等を使用して得ることができ、発光光度は、発光光度計等により測定することができ、蛍光光度は、蛍光光度計等により測定することができる。質量は、質量分析計により決定することができる。放射能は、放射の種類に応じてガンマカウンター等のデバイスにより決定することができる。蛍光偏光は、ＢＥＡＣＯＮ（ＴａＫａＲａ）により測定することができる。表面プラズモン共鳴シグナルは、ＢＩＡＣＯＲＥにより得ることができる。時間分解蛍光光度、蛍光共鳴エネルギー移動等は、ＡＲＶＯ等により測定することができる。さらに、フローサイトメーターも測定に使用することができる。上記の方法のうちの１つを用いて、２つ以上の異なる種類の検出指標を測定することが可能である。２つ以上の測定法を同時に及び／または逐次的に用いることによって、より多くの数の検出指標を検査することもできる。例えば、蛍光光度及び蛍光共鳴エネルギー移動は、蛍光光度計により同時に測定することができる。

【０５０６】

ＯＸ４０アッセイ

上述のように、本開示のある特定の態様は、細胞表面受容体に対するアゴニスト活性に関する。当業者であれば認識するであろうが、細胞表面受容体に対するアゴニスト活性を決定するために使用される特定のアッセイ（複数可）は、特定の細胞表面受容体に依存し得る。ＯＸ４０活性の決定に関連する例示的なアッセイが、下記に提供される。この手引き及び当該技術分野における共通知識基づいて、当業者は、本明細書に記載の他の細胞表面受容体についてのアッセイを好適に特定することができる。

【０５０７】

一態様では、生物活性を有する、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体を特定するためのアッセイが提供される。生物活性は、例えば、ＯＸ４０への結合（例えば、ヒト及び／またはカニクイザルへの結合）、ＯＸ４０媒介シグナル伝達の増加（例えば、ＮＦｋＢ媒介転写の増加）、ヒトＯＸ４０を発現する細胞（例えば、Ｔ細胞）の枯渇、ＡＤＣＣ及び／または食作用によるヒトＯＸ４０を発現する細胞の枯渇、例えばエフェクターＴ細胞増殖の増加及び／またはエフェクターＴ細胞によるサイトカイン産生（例えば、ガンマインターフェロン）の増加によるＴエフェクター細胞機能（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞）の強化、例えばメモリーＴ細胞増殖の増加及び／またはメモリーＴ細胞によるサイトカイン産生（例えば、ガンマインターフェロン）の増加によるメモリーＴ細胞機能（例えば、ＣＤ４＋メモリーＴ細胞）の強化、または調節性Ｔ細胞機能（例えば、エフェクターＴ細胞機能（例えば、ＣＤ４＋エフェクターＴ細胞機能のＴｒｅｇ抑制を減少させることにより）の阻害を含む。ある特定の実施形態では、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体は、ヒトエフェクター細胞への結合の不在下で、列記された生物活性のうちの１つ以上を有する。ある特定の実施形態では、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体は、列記された生物活性のうちの１つ以上を有し、かつヒトエフェクター細胞に結合する。かかる生物活性をインビボ及び／またはインビトロで有する抗体も提供される。

【０５０８】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、かかる生物活性について試験される。

【０５０９】

Ｔ細胞共刺激は、当該技術分野で既知の方法を使用してアッセイされ得、例示的な方法が本明細書に開示される。例えば、Ｔ細胞（例えば、メモリーＴ細胞またはエフェクターＴ細胞）は、末梢白血球（例えば、Ｆｉｃｏｌｌ勾配遠心分離を使用してヒト全血から単離される）から得ることができる。メモリーＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋メモリーＴ細胞）またはエフェクターＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋Ｔｅｆｆ細胞）は、当該技術分野で既知の方法を用いてＰＢＭＣから単離することができる。例えば、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＣＤ４＋メモリーＴ細胞単離キットまたはＭｉｌｔｅｎｙｉナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞単離キットが使用され得る。単離されたＴ細胞は、抗原提示細胞（例えば、ＣＤ３２及びＣＤ８０を発現する照射Ｌ細胞）の存在下で培養され、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体の存在下または不在下で抗ＣＤ３抗体の添加によって活性化される。ＯＸ４０抗体に結合

するアゴニスト抗原結合複合体の、Ｔ細胞増殖に対する作用は、当該技術分野で周知の方法を用いて測定され得る。例えば、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用するができ、結果をＭｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で読み取る。ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体の、Ｔ細胞機能に対する作用も、Ｔ細胞によって産生されたサイトカインの分析によって決定され得る。一実施形態では、ＣＤ４＋Ｔ細胞によるインターフェロンガンマの産生は、例えば、細胞培養上清中のインターフェロンガンマの測定によって決定される。インターフェロンガンマを測定する方法は、当該技術分野で周知である。

【０５１０】

Ｔｒｅｇ細胞機能は、当該技術分野で既知の方法を使用してアッセイされ得、例示的な方法が本明細書に開示される。一例において、エフェクターＴ細胞増殖を抑制するＴｒｅｇの能力がアッセイされる。Ｔ細胞は、当該技術分野で既知の方法（例えば、メモリーＴ細胞またはナイーブＴ細胞を単離する）を使用してヒト全血から単離される。精製されたＣＤ４＋ナイーブＴ細胞を標識し（例えば、ＣＦＳＥを用いて）、精製されたＴｒｅｇ細胞を異なる試薬で標識する。照射抗原提示細胞（例えば、ＣＤ３２及びＣＤ８０を発現するＬ細胞）を、標識され精製されたナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞及び精製されたＴｒｅｇと共培養する。共培養物は、抗ＣＤ３抗体を使用して活性化され、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体の存在下または不在下で試験される。好適な時間（例えば、６日間の共培養）後、ＣＤ４＋ナイーブＴ細胞増殖のレベルが、ＦＡＣＳ分析を用いて、低減された標識染色（例えば、低減されたＣＦＳＥ標識染色）における色素希釈によって追跡される。

【０５１１】

ＯＸ４０シグナル伝達は、当該技術分野で周知の方法を使用してアッセイされ得、例示的な方法が本明細書に開示される。一実施形態では、ヒトＯＸ４０及びレポーター遺伝子（例えば、ベータルシフェラーゼ）に融合したＮＦｋＢプロモーターを含むレポーター遺伝子を発現するトランスジェニック細胞が生成される。ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体の、それらの細胞への添加により、ＮＦｋＢ転写の増加がもたらされ、これが、レポーター遺伝子についてのアッセイを使用して検出される。

【０５１２】

食作用は、例えば、単球由来のマクロファージ、またはＵ９３７細胞（成熟マクロファージの形態及び特性を有するヒト組織球性リンパ腫細胞株）を使用してアッセイされ得る。ＯＸ４０発現細胞が、ＯＸ４０に結合するアゴニスト抗原結合複合体の存在下または不在下で、単球由来のマクロファージまたはＵ９３７細胞に添加される。これらの細胞を好適な期間培養した後、１）マクロファージまたはＵ９３７細胞及び２）ＯＸ４０発現細胞のマーカーを二重染色する細胞の割合を試験し、これをＯＸ４０発現細胞のマーカー（例えば、ＧＦＰ）を示す細胞の総数で割ることで、食作用の割合が決定される。分析は、フローサイトメトリーによって行われ得る。別の実施形態では、分析は、蛍光顕微鏡分析によって行われ得る。

【０５１３】

上述のインビトロアッセイのうちのいずれかで使用するための細胞としては、ＯＸ４０を天然に発現するか、またはＯＸ４０を発現するように操作された細胞または細胞株が挙げられる。かかる細胞としては、ＯＸ４０を天然に発現する活性化Ｔ細胞、Ｔｒｅｇ細胞、及び活性化メモリーＴ細胞が挙げられる。かかる細胞としては、ＯＸ４０を発現する細胞株、及びＯＸ４０を通常発現しないがＯＸ４０をコードする核酸でトランスフェクトされた細胞株も挙げられる。上述のインビトロアッセイのうちのいずれかで使用するための本明細書で提供される例示的な細胞株には、ヒトＯＸ４０を発現するトランスジェニックＢＴ４７４細胞（ヒト乳癌細胞株）が含まれる。

【０５１４】

ＩＶ．薬学的組成物

本明細書に記載される、本開示の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四

価の抗原結合複合体）またはそのサブユニット（複数可）は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、投与され得る。この文脈における考慮の要因には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の対象の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医療従事者に既知の他の要因が含まれる。投与される複合体またはタンパク質の「治療有効量」は、かかる考慮によって管理され、特定の障害（例えば、がん、アレルギー性もしくは炎症性障害、または自己免疫障害）を予防、改善、または治療するために必要な最小の量である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の複合体及びタンパク質は、任意選択で、障害を予防また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得る。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する複合体またはタンパク質の量、障害または治療の種類、及び上記で考察された他の要因に依存する。

【０５１５】

治療用製剤は、当該技術分野で既知の標準の方法を用いて、所望の純度を有する活性成分を任意の生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって調製される（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（２０ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ），ｅｄ．Ａ．Ｇｅｎｎａｒｏ，２０００，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ）。許容される担体には、食塩水、またはリン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、も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、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；マンニトールもしくはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、もしくはＰＥＧ等の非イオン性界面活性剤が含まれる。

【０５１６】

ある特定の実施形態では、製剤は、薬学的に許容される塩、好ましくは塩化ナトリウムを含有し、好ましくは、およそ生理学的濃度である。任意選択で、本発明の製剤は、薬学的に許容される防腐剤を含有することができる。いくつかの実施形態では、防腐剤濃度は、０．１～２．０（典型的にはｖ／ｖ）％の範囲である。好適な防腐剤には、薬学分野で既知のものが含まれる。ベンジルアルコール、フェノール、ｍ－クレゾール、メチルパラベン、及びプロピルパラベンが、好ましい防腐剤である。任意選択で、本発明の製剤は、薬学的に許容される界面活性剤を０．００５～０．０２％の濃度で含むことができる。

【０５１７】

本明細書における製剤は、治療される特定の適応症に対する必要に応じて、２つ以上の活性化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する化合物も含有し得る。かかる分子は、意図される目的に有効な量で、組み合わせで好適に存在する。

【０５１８】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、もしく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もしくはゼラチン－マイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、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）中に、またはマクロエマルジョン中に、封入されてもよい。かかる技術は、上記のＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓに開示されている。

【０５１９】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の好適な例としては、抗原結合複合体または抗原結合ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性基質が挙げられ、その基質は、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性基質の例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレ

ート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタミン酸エチルとのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（商標）等の分解性の乳酸－グリコール酸コポリマー（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドで構成される注射用ミクロスフェア）、ならびにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニル及び乳酸－グリコール酸等のポリマーが１００日間にわたる分子の放出を可能にする一方で、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。カプセル化された抗原結合複合体（複数可）または抗原結合ポリペプチド（複数可）が長期間体内に残存するとき、それらは、３７℃の水分への曝露の結果として変性または凝集し、生物活性の喪失、及び免疫原性の可能な変化をもたらし得る。関与する機構に応じて、安定化のための合理的な戦略が講じられ得る。例えば、凝集機構がチオ－ジスルフィド交換による分子間Ｓ－Ｓ結合の形成であると見出される場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含量を制御し、適当な添加剤を使用し、特定のポリマー基質組成物を開発することにより達成され得る。

【０５２０】

本明細書に記載の複合体は、ボーラスとしての静脈内投与または一定期間にわたる連続注入による、筋内、腹腔内、脳髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路による等の既知の方法に従い、ヒト対象に投与され得る。広範囲の副作用または毒性が、タンパク質によって認識される標的分子に対するアンタゴニズムに関連付けられる場合には、局所投与が特に所望され得る。エクスビボ戦略を治療用途に使用することもできる。エクスビボ戦略は、対象から得られた細胞に、本発明のタンパク質または複合体をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトまたは形質導入することを伴う。次いで、トランスフェクトまたは形質導入された細胞を対象に戻す。これらの細胞は、限定されないが、造血細胞（例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、Ｔ細胞、またはＢ細胞）、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、または筋細胞を含む多種多様な種類のうちのいずれかであり得る。

【０５２１】

Ｖ．製品

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の１つ以上の抗原結合複合体（例えば、アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体）と、障害（例えば、自己免疫疾患またはがん）の治療または診断に有用な材料とを含有する、製品である。製品は、容器と、容器上にまたは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、状態を治療するのに有効である組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、静注溶液バッグ、または皮下注射針によって穿刺可能な栓を有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも１つの活性剤は、本明細書に記載の抗原結合複合体またはポリペプチドである。ラベルまたは添付文書は、組成物が特定の状態を治療するために使用されることを指示する。ラベルまたは添付文書は、抗原結合複合体またはポリペプチド組成物を対象に投与するための説明書をさらに含む。本明細書に記載の併用治療薬を含む製品及びキットもまた企図される。

【０５２２】

添付文書とは、かかる治療薬の適応症、使用、投薬量、投与、禁忌、及び／またはその使用に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業用パッケージに通例含まれる指示を指す。

【０５２３】

加えて、製品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液を含む第２の容器をさらに含み得る。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、及びシリンジを含む、商業的観点及びユーザの観点から考慮される他の材料をさらに含んでもよい。

【０５２４】

例示的な複合体、方法、核酸、ベクター、宿主細胞、及び組成物が以下の項目に記載される。

【０５２５】

項目１：アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体であって、前記複合体は、

第１及び第２のサブユニットを含み、前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、

（ｉ）第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む第１のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合する、第１のハーフ抗体と、

（ｉｉ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含む第２のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、第２のハーフ抗体と、を含み、

前記第１及び第２のサブユニットは結合され、前記複合体は、前記複合体が結合した細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する、前記抗原結合複合体。

【０５２６】

項目２：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、

（ｉ）前記第１のハーフ抗体であって、

（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第１の抗体重鎖と、

（ｂ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第１の抗体軽鎖と、を含む、前記第１のハーフ抗体と、

（ｉ）前記第２のハーフ抗体であって、

（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第２の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む、第２の抗体重鎖と、

（ｂ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む、第２の抗体軽鎖と、を含む、前記第２のハーフ抗体と、を含む、項目１に記載の複合体。

【０５２７】

項目３：前記第１及び第２のサブユニットが、化学的に結合される、項目２に記載の複合体。

【０５２８】

項目４：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、同じである、項目１～３のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５２９】

項目５：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、異なる、項目１～３のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５３０】

項目６：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、二重特異性抗体を含み、前記二重特異性抗体が、２つのＣＨ３ドメインを有する２つの抗体Ｆｃ領域を含み、前記２つのＣＨ３ドメインのそれぞれが、突起または空隙のいずれかを含み、前記２つのＣＨ３ドメインの第１における前記突起または空隙が、それぞれ、前記２つのＣＨ３ドメインの第２における前記空隙または突起内に配置可能である、項目５に記載の複合体。

【０５３１】

項目７：前記２つのサブユニットが、リンカーを介して化学的に結合される、項目１～６のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５３２】

項目８：前記リンカーが、前記第１のサブユニットの第１の操作された遊離システインと、前記第２のサブユニットの第２の操作された遊離システインとを接合する、項目７に

記載の複合体。
【０５３３】
項目９：前記２つのサブユニットのそれぞれが、２つの重鎖と、２つの軽鎖とを含み、各サブユニットの前記重鎖のうちの１つが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から選択される、前記重鎖中のシステインアミノ酸を含む、項目８に記載の複合体。
【０５３４】
項目１０：前記２つのサブユニットのそれぞれが、２つの重鎖と、２つの軽鎖とを含み、各サブユニットの前記軽鎖のうちの１つが、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から選択される、前記軽鎖中のシステインアミノ酸を含む、項目８に記載の複合体。
【０５３５】
項目１１：前記２つのサブユニットが、クリックケミストリーを介して化学的に結合される、項目７に記載の複合体。
【０５３６】
項目１２：前記２つのサブユニットが、テトラジン－トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）クリック反応を介して結合される、項目１１に記載の複合体。
【０５３７】
項目１３：前記リンカーが、約１０Å～約１００Å長である、項目１１または項目１２に記載の複合体。
【０５３８】
項目１４：前記リンカーが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、項目７に記載の複合体。
【０５３９】
項目１５：前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、項目１３に記載の複合体。
【０５４０】
項目１６：前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、項目１５に記載の複合体。
【０５４１】
項目１７：前記サブユニットのそれぞれが、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含むＦｃ領域を含む、項目２～１６のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５４２】
項目１８：前記サブユニットのそれぞれが、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む、

項目１７に記載の複合体。
【０５４３】
項目１９：前記サブユニットのそれぞれが、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１７または１８に記載の複合体。
【０５４４】
項目２０：前記サブユニットのそれぞれが、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１７～１９のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５４５】
項目２１：前記サブユニットのそれぞれが、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１７～１９のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５４６】
項目２２：前記細胞表面受容体が、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである、項目１～２１のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５４７】
項目２３：前記細胞表面受容体が、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２からなる群から選択される、項目１～２２のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５４８】
項目２４：前記$ＶＨ_1$が、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記$ＶＬ_1$が、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目２３に記載の複合体。
【０５４９】

項目２５：前記VH_2が、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、前記VL_2が、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目２３または項目２４に記載の複合体。

【０５５０】

項目２６：アゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体であって、前記複合体は、
（ａ）２つの抗体重鎖であって、各抗体重鎖が第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）を含む、２つの抗体重鎖と、２つの抗体軽鎖であって、各抗体軽鎖が第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む、２つの抗体軽鎖とを含む抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合する抗体と、
（ｂ）前記抗体と結合される２つの抗体Ｆａｂ断片であって、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）を含み、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、前記細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、２つの抗体Ｆａｂ断片と、を含み、
前記複合体は、前記複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する、前記抗原結合複合体。

【０５５１】

項目２７：各抗体重鎖が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第１の抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び第１の抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、各抗体軽鎖が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含み、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体重鎖可変ドメイン（VH_2）及び第２の抗体重鎖ＣＨ１ドメインを含む重鎖Ｆａｂ断片を含み、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む軽鎖Ｆａｂ断片を含む、項目２６に記載の複合体。

【０５５２】

項目２８：前記２つの抗体Ｆａｂ断片の第１が、前記２つの抗体軽鎖の第１または前記２つの抗体重鎖の第１に化学的に結合され、前記２つの抗体Ｆａｂ断片の第２は、前記２つの抗体軽鎖の第２または前記２つの抗体重鎖の第２に化学的に結合される、項目２７に記載の複合体。

【０５５３】

項目２９：前記２つのＦａｂ断片のそれぞれが、リンカーを介して前記抗体に化学的に結合される、項目２６～２８のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５５４】

項目３０：
（ｉ）前記抗体の第１の操作された遊離システイン及び前記２つのＦａｂ断片の第１の操作された遊離システインを接合する第１のリンカーと、
（ｉｉ）前記抗体の第２の操作された遊離システイン及び前記２つのＦａｂ断片の第２の操作された遊離システインを接合する第２のリンカーと、を含む、項目２９に記載の複合体。

【０５５５】

項目３１：前記抗体の前記２つの抗体重鎖がそれぞれ、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択されるシステインアミノ酸を含む、項目３０に記載の複合体。

【０５５６】

項目３２：前記抗体の前記２つの抗体軽鎖がそれぞれ、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付け）からなる群から独立して選択されるシステインアミノ酸を含む、項目３０に記載の複合体。

【０５５７】

項目３３：前記２つの抗体Ｆａｂ断片がそれぞれ、Ｃ末端システインアミノ酸を含む、項目３０～３２のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５５８】

項目３４：前記抗体が、クリックケミストリーを介して前記２つの抗体Ｆａｂ断片の両方に結合される、項目２９に記載の複合体。

【０５５９】

項目３５：前記抗体が、テトラジン－トランスシクロオクテン（ＴＣＯ）クリック反応を介して前記２つの抗体Ｆａｂ断片の両方に結合される、項目３４に記載の複合体。

【０５６０】

項目３６：前記リンカーが、約１０Å～約１００Å長である、項目３４または項目３５に記載の複合体。

【０５６１】

項目３７：前記リンカーが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、項目２９に記載の複合体。

【０５６２】

項目３８：前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、項目３７に記載の複合体。

【０５６３】

項目３９：前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、項目３８に記載の複合体。

【０５６４】

項目４０：前記２つの抗体Ｆａｂ断片が、前記抗体と遺伝的に結合され、各抗体重鎖が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、前記複合体が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む第１の抗体軽鎖と、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_2）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む第２の抗体軽鎖と、を含む、項目２６に記載の複合体。

【０５６５】

項目４１：前記第１の抗体軽鎖が、前記抗体重鎖の前記第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）及び／または前記第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメインの修飾との垂直対合のための修飾を含み、前記第２の抗体軽鎖が、前記抗体重鎖の前記第２の重鎖可変ドメイン（VH_2）及び／または前記第２の重鎖ＣＨ１ドメインの修飾との垂直対合のための修飾を含む、項目４０に記載の複合体。

【０５６６】

項目４２：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、同じである、項目２６～４１のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５６７】

項目４３：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、異なる、項目２６～４１のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５６８】

項目４４：前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含むＦｃ領域を含む、項目２６～４３のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５６９】

項目４５：前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、

（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、項目４４に記載の複合体。

【０５７０】

項目４６：前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）に１つ以上のアミノ酸置換を含む、項目４４または項目４５に記載の複合体。

【０５７１】

項目４７：前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目４４～４６のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５７２】

項目４８：前記抗体の前記抗体重鎖のそれぞれが、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、項目４４～４６のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５７３】

項目４９：前記細胞表面受容体が、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである、項目２６～４８のいずれか１項目に記載の複合体。

【０５７４】
項目５０：前記細胞表面受容体が、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２からなる群から選択される、項目２６～４９のいずれか１項目に記載の複合体。
【０５７５】
項目５１：前記$ＶＨ_1$が、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記$ＶＬ_1$が、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目５０に記載の複合体。
【０５７６】
項目５２：前記$ＶＨ_2$が、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記$ＶＬ_2$が、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目５０または項目５１に記載の複合体。
【０５７７】
項目５３：前記$ＶＨ_2$が、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記$ＶＬ_2$が、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目５０に記載の複合体。
【０５７８】
項目５４：前記$ＶＨ_1$が、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記$ＶＬ_1$が、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目５０または項目５３に記載の複合体。
【０５７９】
項目５５：項目１～２５のいずれか１項目に記載の複合体をコードする、核酸。
【０５８０】
項目５６：前記核酸が、前記第１の抗体重鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、前記第１の抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、前記第２の抗体重鎖をコードする第３のポリヌクレオチドと、前記第２の抗体軽鎖をコードする第４のポリヌクレオチドと、を含む、項目５５に記載の核酸。
【０５８１】
項目５７：項目２６～５４のいずれか１項目に記載の複合体をコードする、核酸。
【０５８２】
項目５８：前記核酸が、前記抗体重鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、前記抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、前記重鎖Ｆａｂ断片をコードする第３のポリヌクレオチドと、前記軽鎖Ｆａｂ断片をコードする第４のポリヌクレオチドと、を含む、項目５７に記載の核酸。
【０５８３】
項目５９：前記核酸が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含む抗体重

鎖をコードする第１のポリヌクレオチドと、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む抗体軽鎖をコードする第２のポリヌクレオチドと、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含む抗体軽鎖をコードする第３のポリヌクレオチドと、を含む、項目５７に記載の核酸。

【０５８４】

項目６０：項目５５～５９のいずれか１項目に記載の核酸を含む、ベクター。

【０５８５】

項目６１：前記ベクターが、発現ベクターである、項目６０に記載のベクター。

【０５８６】

項目６２：項目６０または項目６１に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【０５８７】

項目６３：前記宿主細胞が原核性である、項目６２に記載の宿主細胞。

【０５８８】

項目６４：前記宿主細胞が真核性である、項目６２に記載の宿主細胞。

【０５８９】

項目６５：四価の抗原結合複合体の産生方法であって、前記複合体が産生されるように、項目６２に記載の宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

【０５９０】

項目６６：前記複合体を前記宿主細胞から回収することをさらに含む、項目６５に記載の方法。

【０５９１】

項目６７：項目１～５４のいずれか１項目に記載の複合体と、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【０５９２】

項目６８：前記複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法であって、

（ａ）

（ｉ）第１の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_1$）及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）を含む第１のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、かつ第１の操作された遊離システインを含む、第１のハーフ抗体と、

（ｉｉ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）を含む第２のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、第２のハーフ抗体と、を提供することであって、前記第１及び第２のハーフ抗体のそれぞれが、ＣＨ３ドメインを有する抗体Ｆｃ領域を含み、前記２つのＣＨ３ドメインのそれぞれが、突起または空隙のいずれかを含み、前記２つのＣＨ３ドメインの第１の前記突起または空隙が、それぞれ、前記２つのＣＨ３ドメインの第２の前記空隙または突起に配置可能である、提供することと、

（ｂ）インビトロで前記第１及び第２のハーフ抗体を構築して第１のサブユニットを形成することと、

（ｃ）

（ｉｉｉ）前記第１の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_1$）及び前記第１の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_1$）を含む第３のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、かつ第２の操作された遊離システインを含む、第３のハーフ抗体と、

（ｉｖ）第２の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）を含む第４のハーフ抗体であって、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合する、第４のハーフ抗体と、を提供することであって、前記第３及び第４のハーフ抗体のそれぞれが、ＣＨ３ドメインを有する抗体Ｆｃ領域を含み、前記２つのＣＨ３ドメインのそれぞれが、突起または空隙のいずれかを含み、前記２つのＣＨ３ドメインの第１

の前記突起または空隙が、それぞれ、前記２つのＣＨ３ドメインの第２の前記空隙または突起に配置可能である、提供することと、
（ｄ）インビトロで前記第３及び第４のハーフ抗体を構築して第２のサブユニットを形成することと、
（ｅ）前記第１及び第２の操作された遊離システインを使用するリンカーを介して前記第１及び第２のサブユニットを結合し、それにより、前記複合体を産生することと、を含む、前記方法。
【０５９３】
項目６９：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、同じである、項目６８に記載の方法。
【０５９４】
項目７０：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、異なる、項目６８に記載の方法。
【０５９５】
項目７１：前記第１及び第２の操作された遊離システインがそれぞれ、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記重鎖中のシステインアミノ酸である、項目６８～７１のいずれか１項目に記載の方法。
【０５９６】
項目７２：前記第１及び第２の操作された遊離システインがそれぞれ、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記軽鎖中のシステインアミノ酸である、項目６８～７１のいずれか１項目に記載の方法。
【０５９７】
項目７３：前記リンカーが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、項目６８～７２のいずれか１項目に記載の方法。
【０５９８】
項目７４：ステップ（ｅ）が、
（１）前記２つのサブユニットを前記ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させることと、
（２）前記複合体を精製することと、を含む、項目７３に記載の方法。
【０５９９】
項目７５：前記複合体の精製には、前記複合体をサイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーにかけることを含む、項目７４に記載の方法。
【０６００】
項目７６：前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、項目７３～７５のいずれか１項目に記載の方法。
【０６０１】
項目７７：前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、項目７３～７６のいずれか１項目に記載の方法。
【０６０２】
項目７８：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含むＦｃ領域を含む、項目６８～７７のいずれか１項目に記載の方法。
【０６０３】
項目７９：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、

（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む、項目７８に記載の方法。

【０６０４】

項目８０：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む、項目７８または項目７９に記載の方法。

【０６０５】

項目８１：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目７８～８０のいずれか１項目に記載の方法。

【０６０６】

項目８２：前記第１及び第２のサブユニットのそれぞれが、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目７８～８０のいずれか１項目に記載の方法。

【０６０７】

項目８３：前記複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法であって、
（ａ）２つのハーフ抗体を含む抗体を提供することであって、各ハーフ抗体が、第１の抗体重鎖可変ドメイン（VH_1）を含む抗体重鎖及び第１の抗体軽鎖可変ドメイン（VL_1）を含む抗体軽鎖を含み、前記抗体が、細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、前記２つのハーフ抗体のそれぞれが、第１の操作された遊離システインを含む、提供することと、
（ｂ）２つの抗体Ｆａｂ断片を提供することであって、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそ

れぞれが、第２の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ$_2$）及び第２の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ$_2$）を含み、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合し、前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれが、第２の操作された遊離システインを含む、提供することと、

（ｃ）前記抗体Ｆａｂ断片のうちの１つを、リンカーを介して前記２つのハーフ抗体のそれぞれに結合し、それにより、前記複合体を形成することと、を含む、前記方法。

【０６０８】

項目８４：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、同じである、項目８３に記載の方法。

【０６０９】

項目８５：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、異なる、項目８３に記載の方法。

【０６１０】

項目８６：前記第１の操作された遊離システインが、Ｔ１１４Ｃ、Ａ１１８Ｃ、Ａ１４０Ｃ、Ｌ１７４Ｃ、Ｌ１７９Ｃ、Ｔ１８７Ｃ、Ｔ２０９Ｃ、Ｖ２６２Ｃ、Ｇ３７１Ｃ、Ｙ３７３Ｃ、Ｅ３８２Ｃ、Ｓ４００Ｃ、Ｓ４２４Ｃ、Ｎ４３４Ｃ、及びＱ４３８Ｃ（ＥＵ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記重鎖中のシステインアミノ酸である、項目８３～８５のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１１】

項目８７：前記第１の操作された遊離システインが、Ｉ１０６Ｃ、Ｒ１０８Ｃ、Ｒ１４２Ｃ、Ｋ１４９Ｃ、及びＶ２０５Ｃ（Ｋａｂａｔ番号付けに従う）からなる群から独立して選択される、前記軽鎖中のシステインアミノ酸である、項目８３～８５のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１２】

項目８８：前記第２の操作された遊離システインが、Ｃ末端システインアミノ酸である、項目８３～８７のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１３】

項目８９：前記リンカーが、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである、項目８３～８８のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１４】

項目９０：ステップ（ｃ）が、

（ｉ）前記２つの抗体Ｆａｂ断片のそれぞれをビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーと反応させて、２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片を形成することと、

（ｉｉ）過剰のビス－マレイミドＰＥＧリンカーを除去することと、

（ｉｉｉ）前記２つのビスマルコンジュゲート抗体Ｆａｂ断片のそれぞれを前記抗体と反応させて、前記複合体を形成することと、

（ｉｖ）前記複合体を精製することと、を含む、項目８９に記載の方法。

【０６１５】

項目９１：前記複合体の精製には、前記複合体をサイズ排除クロマトグラフィー及び／またはアニオン交換クロマトグラフィーにかけることを含む、項目９０に記載の方法。

【０６１６】

項目９２：前記ＰＥＧリンカーが、１～１１個のＰＥＧサブユニットを含む、項目８９～９１のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１７】

項目９３：前記ＰＥＧリンカーが、１、２、または３個のＰＥＧサブユニットを含む、項目８９～９２のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１８】

項目９４：前記抗体が、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含むＦｃ領域を含む、項目８３～９３のいずれか１項目に記載の方法。

【０６１９】
項目９５：前記抗体が、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、
（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む、項目９４に記載の方法。
【０６２０】
項目９６：前記抗体が、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む、項目９４または項目９５に記載の方法。
【０６２１】
項目９７：前記抗体が、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目９４～９６のいずれか１項目に記載の方法。
【０６２２】
項目９８：前記抗体が、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目９４～９６のいずれか１項目に記載の方法。
【０６２３】
項目９９：前記複合体によって結合された細胞表面受容体に対してアゴニスト活性を有する四価の抗原結合複合体の産生方法であって、

（ａ）宿主細胞において、２つの抗体重鎖を発現させることであって、各抗体重鎖が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_1$）、第１の抗体重鎖ＣＨ１ドメイン（$ＣＨ１_1$）、第２の重鎖可変ドメイン（$ＶＨ_2$）、第２の重鎖ＣＨ１ドメイン（$ＣＨ１_2$）、抗体重鎖ＣＨ２ドメイン、及び抗体重鎖ＣＨ３ドメインを含み、各$ＶＨ_1$及び／または各$ＣＨ１_1$が、垂直対合のための第１の修飾を含み、各$ＶＨ_2$及び／または各$ＣＨ１_2$が、垂直対合のための第２の修飾を含み、前記第１及び第２の修飾が異なる、発現させることと、

（ｂ）前記宿主細胞において、２つの第１の抗体軽鎖を発現させることであって、前記２つの第１の抗体軽鎖のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_1$）及び第１の抗体軽鎖定常ドメイン（$ＣＬ_1$）を含み、前記$ＶＬ_1$及び／または前記$ＣＬ_1$が、前記抗体重鎖の前記第１の修飾との垂直対合のための修飾を含む、発現させることと、

（ｃ）前記宿主細胞において、２つの第２の抗体軽鎖を発現させることであって、前記２つの第２の抗体軽鎖のそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第２の抗体軽鎖可変ドメイン（$ＶＬ_2$）及び第２の抗体軽鎖定常ドメイン（$ＣＬ_2$）を含み、前記$ＶＬ_2$及び／または前記$ＣＬ_2$が、前記抗体重鎖の第２の修飾との垂直対合のための修飾を含む、発現させることと、を含み、

前記$ＶＨ_1$及び$ＶＬ_1$は、前記細胞表面受容体の第１のエピトープに特異的に結合し、

前記$ＶＨ_2$及び$ＶＬ_2$は、前記細胞表面受容体の第２のエピトープに特異的に結合し、

前記宿主細胞における発現の際に前記２つの抗体重鎖は会合し、前記２つの重鎖のそれぞれは、垂直対合を介して第１の抗体軽鎖と結合し、前記２つの重鎖のそれぞれは、垂直対合を介して第２の抗体軽鎖と結合し、それにより、前記複合体を産生する、前記方法。

【０６２４】

項目１００：前記抗体重鎖の前記第１及び第２の修飾のそれぞれが、ＶＨ－Ｑ３９Ｋ、ＶＨ－Ｑ３９Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ、ＣＨ１－Ａ１４１Ｉ、ＣＨ１－Ｆ１７０Ｓ、ＣＨ１－Ｓ１８１Ｍ、ＣＨ１－Ｓ１８３Ａ、及びＣＨ１－Ｖ１８５Ａ（ＥＵ番号付け）なる群から独立して選択される、項目９９に記載の方法。

【０６２５】

項目１０１：前記第１及び第２の抗体軽鎖の前記修飾のそれぞれが、ＶＬ－Ｑ３８Ｅ、ＶＬ－Ｑ３８Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｋ、ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ、ＣＬ－Ｆ１１６Ａ、ＣＬ－Ｌ１３５Ｖ、ＣＬ－Ｓ１７４Ａ、ＣＬ－Ｓ１７６Ｆ、及びＣＬ－Ｔ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）からなる群から独立して選択される、項目９９または項目１００に記載の方法。

【０６２６】

項目１０２：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、同じである、項目９９～１０１のいずれか１項目に記載の方法。

【０６２７】

項目１０３：前記細胞表面受容体の前記第１及び第２のエピトープが、異なる、項目９９～１０１のいずれか１項目に記載の方法。

【０６２８】

項目１０４：各抗体重鎖が、エフェクター機能を減衰させるための修飾を含むＦｃ領域を含む、項目９９～１０３のいずれか１項目に記載の方法。

【０６２９】

項目１０５：各抗体重鎖が、

（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２９７、

（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３５、

（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３２９、

（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２３４及び２３７、

（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２３５、２３７、及び３１８、

（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域における２２８及び２３６、

（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域における２６８、３０９、３３０、及び３３１、

（ｈ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２０、２２６、２２９、及び２３８、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６、２２９、２３３、２３４、及び２３５、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２３４、２３５、及び３３１、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２２６及び２３０、ならびに
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域における２６７及び３２８、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸残基（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１０４に記載の方法。

【０６３０】

項目１０６：各抗体重鎖が、
（ａ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＮ２９７Ａ、
（ｂ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、
（ｃ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、
（ｄ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、
（ｅ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、
（ｆ）ヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅ、
（ｇ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基１１８～２６０に及ぶ領域、またはヒトＩｇＧ４の前記Ｆｃ領域におけるアミノ酸残基２６１～４４７に及ぶ領域における１つ以上の置換、
（ｈ）ヒトＩｇＧ２の前記Ｆｃ領域におけるＨ２６８Ｑ、Ｖ３０９Ｌ、Ａ３３０Ｓ、及びＡ３３１Ｓ、
（ｉ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２０Ｓ、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、及びＰ２３８Ｓ、
（ｊ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、及びＬ２３５Ａ、
（ｋ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＬ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ、及びＰ３３１Ｓ、
（ｌ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＣ２２６Ｓ及びＰ２３０Ｓ、ならびに
（ｍ）ヒトＩｇＧ１の前記Ｆｃ領域におけるＳ２６７Ｅ及びＬ３２８Ｆ、からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸置換（ＥＵ番号付け）を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１０４または項目１０５に記載の方法。

【０６３１】

項目１０７：各抗体重鎖が、非グリコシル化Ｆｃ領域をもたらすエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１０４～１０６のいずれか１項目に記載の方法。

【０６３２】

項目１０８：各抗体重鎖が、Ｆｃ領域のグリコシル化パターンの修飾をもたらさないエフェクター機能を減衰させるための修飾を含む、Ｆｃ領域を含む、項目１０４～１０６のいずれか１項目に記載の方法。

【０６３３】

項目１０９：前記細胞表面受容体が、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリー及びＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーからなる群から選択される受容体ファミリーのメンバーである、項目６８～１０８のいずれか１項目に記載の方法。

【０６３４】

項目１１０：前記細胞表面受容体が、ＯＸ４０、ＤＲ５、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、及びＴｉｅ２からなる群から選択される、項目６８～１０９のいずれか１項目に記載の方法。

【０６３５】

項目１１１：前記$ＶＨ_1$が、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸

配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記ＶＬ$_1$が、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目１１０に記載の方法。

【０６３６】

項目１１２：前記ＶＨ$_2$が、（ａ）（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨドメインを含み、前記ＶＬ$_2$が、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目１１０または項目１１１に記載の方法。

【０６３７】

項目１１３：前記ＶＨ$_2$が、（ｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、（ｉｉｉ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記ＶＬ$_2$が、（ｉ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号７から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目１１０に記載の方法。

【０６３８】

項目１１４：前記ＶＨ$_1$が、（ｉ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含み、前記ＶＬ$_1$が、（ｉ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｉｉｉ）配列番号４２から選択されるアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、項目１１０または項目１１３に記載の方法。

【０６３９】

前述の記述は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに十分であると見なされる。以下の実施例は、例示目的で提示されるにすぎず、決して本発明の範囲を限定するようには意図されていない。実際、本明細書に示され、記載される修正に加えて、本発明の様々な修正が前述の説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲の範疇内にある。

【実施例】

【０６４０】

実施例１．アゴニスト活性を強化するための二重エピトープ抗体の探求

標的受容体に対するアゴニスト活性を媒介する抗体を発見することの関心が高まっている。アゴニスト抗体は、シグナル伝達に生産的な様式で受容体に係合し、実質的に代替リガンドとして作用する。いくつかの標的に関しては、抗体媒介性アゴニズムは、ＩｇＧのホモ二量体性質を利用した、受容体への二価係合を介して可能であり得る。しかしながら、いくつかの受容体系は、活性を引き出すのに多価架橋結合を必要とし、それにより、受容体はクラスターへとまとめられて最適なシグナル伝達を引き出す。これらの受容体に関して、インビボでの抗体架橋は典型的に、抗体ＦｃのＦｃ受容体との係合によって有効にされる（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １９：１０１－１３、Ｋｉｍ&Ａｓｈｋｅｎａｚｉ，２０１３，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ ２１０：１６４７－５１、Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，２０１４ Ｊｏｕｒｎａｌ ｆｏｒ ＩｍｍｕｎｏＴｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ２：１－１０）。

【０６４１】

抗体媒介性受容体アゴニズムを強化するためのＯＸ４０の二重エピトープ係合の可能性が探求された。ＯＸ４０は、マウス及びヒト腫瘍における浸潤細胞を含む、抗原を経験したエフェクターＴ（Ｔｅｆｆ）及び調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞上で発現されるＴＮＦＲＳＦメンバーの共刺激分子である。アゴニスト抗体によるＯＸ４０の活性化は、Ｔｅｆｆ活

性化を強化し、Ｔｒｅｇ媒介性抑制を阻害することによって抗腫瘍免疫を促進することが示されている（Ｖｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１９１：３６４１－５０）。抗ＯＸ４０抗体によるアゴニズムは、インビトロで架橋を必要とする様式で、またはインビボでのＦｃ／ＦｃγＲ媒介性架橋を介してであるが、天然リガンドＯＸ４０Ｌと同様の共刺激活性を提供することが示されている（Ｖｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１９１：３６４１－５０）。

【０６４２】

材料及び方法

二重エピトープ抗ＯＸ４０抗体は、２つの別個の可変領域で構成される二重特異性抗体を構築することによって生成された。一方の可変領域は、それぞれ、配列番号５６及び５７に記載されるＶＨ及びＶＬ配列を有する抗ＯＸ４０ヒト化抗体を含む。これらのドメインを含む可変領域は、より完全には１Ａ７．ｇｒ．１と記載されるが、本明細書において、この可変領域は、１Ａ７と省略される。言い換えれば、本明細書において、１Ａ７は、配列番号５６及び５７に定義されるように、ヒト化１Ａ７．ｇｒ．１可変領域を指す。もう一方の可変領域は、それぞれ、配列番号１２６及び１２９に記載されるＶＨ及びＶＬ配列を有する抗ＯＸ４０ヒト化抗体を含む。これらのドメインを含む可変領域は、より完全には３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧと記載されるが、本明細書において、この可変領域は、３Ｃ８と省略される。言い換えれば、本明細書において、３Ｃ８は、配列番号１２６及び１２９に定義されるように、ヒト化３Ｃ８．ｇｒ．５．ＳＧ可変領域を指す。

【０６４３】

二重特異性抗体は、ノブ－イントゥ－ホール変異型及び別個のハーフ抗体のインビトロ構築を用いて生成された（Ｓｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３１（８）：７５３－８）。抗体重鎖及び軽鎖をコードするＤＮＡを、標準の分子生物学技法を用いて、ｐＲＫ哺乳類発現ベクター（Ｅａｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２５：８３４３－８３４７）において構築した。ｅｘｐｉ２９３またはＣＨＯ細胞発現について変異を有する抗体の重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドを、遺伝子合成（Ｇｅｎｅｗｉｚ）により、またはＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ　Ｍｕｌｔｉ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ａｇｉｌｅｎｔカタログ番号２１０５１４）及びＱ５　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂカタログ番号Ｅ０５５４Ｓ）を使用する変異生成により構築した。１Ａ７　ＶＨ領域をコードするＤＮＡは、「ノブ」変異Ｔ３６６Ｗ（ＥＵ番号付け）、Ｃ末端６Ｈｉｓタグを含み、かつＮ２９７Ｇ（ＥＵ番号付け）変異を有する、または有しない変異型ヒトＩｇＧ１（ｈＩｇＧ１）内にサブクローニングされた。３Ｃ８　ＶＨ領域をコードするＤＮＡは、「ホール」変異Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ（ＥＵ番号付け）、Ｃ末端Ｆｌａｇタグを含み、かつＮ２９７Ｇ変異を有する、または有しない変異型ヒトＩｇＧ１（ｈＩｇＧ１）内にサブクローニングされた。

【０６４４】

モノクローナル抗体のエフェクター機能特性を低減するための様々な変異戦略が記載されている（Ｓｔｒｏｈｌ，２００９，Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　２０：６８５－６９１）。２つのアプローチを用いて、本開示の抗体のエフェクター減衰バージョンを設計した。第１に、抗体を、Ｆｃ領域の２９７位における保存されたＮ連結型グリコシル化部位を除去する置換Ｎ２９７Ｇと組み合わせることによって、非グリコシル化Ｆｃ領域の関連において抗体を構築した。第２のアプローチでは、Ｆｃ受容体及び補体への結合を低減することが以前に示された置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ（ＥＵ番号付け）（Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３２９Ｇ三重変異型はＬＡＬＡＰＧと称される）（例えば、米国特許公開第２０１２／０２５１５３１号を参照されたい）を利用した。両抗体のＶＬ領域をコードするＤＮＡを、ヒトＣｋａｐｐａ（ｈＣｋ）定常鎖で構築した。

【０６４５】

１Ａ７及び３Ｃ８軽及び重（天然及びハーフ抗体）をコードするｐＲＫベクターＤＮＡを、発現のためにＨＥＫ２９３細胞内に共トランスフェクトし、結果として得られるタンパク質を精製した。発現後、Ｅｘｐｉ２９３細胞を重力により沈降させた。Ｆｒｅｅｄｏｍ　ＥＶＯ　２００リキッドハンドリング用ワークステーション（Ｔｅｃａｎ，Ｍｏｒｒｉｓｖｉｌｌｅ，ＮＣ）を使用して、上清を、０．２ｍＬ（５０％スラリー）のＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ）を含有する５０ｍＬのＦａｌｃｏｎチューブ（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）に移した。上清／樹脂混合物を、Ｉｎｎｏｖａ　２０００プラットフォームシェーカー（Ｎｅｗ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｅｎｆｉｅｌｄ，ＣＴ）で、２７０ＲＰＭで一晩インキュベートした。沈降後、樹脂を、２５μｍ膜（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｏｃｅａｎｓｉｄｅ，ＣＡ）を有する９６ウェルの２ｍｌフィルタプレートに移し、１ｍＬのＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）で２回洗浄し、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＨＴ６　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して、２，０００ｒｐｍで５分間遠心分離することにより、任意の未結合タンパク質及び培地構成成分を除去した。樹脂を含有するプレートを、０．２μｍの９６ウェルプレート（Ｏｒｏｃｈｅｍ，Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ，ＩＬ，ＵＳＡ）及び９６ウェル溶出液捕捉プレート（Ｏｒｏｃｈｅｍ，Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ，ＩＬ）の上部に重ねた。結合ハーフ抗体を、２，０００ｒｐｍで５分間遠心分離することにより２つの連続溶出ステップ（溶出の総容積－０．６６８ｍＬ）において、溶出緩衝液（５０ｍＭリン酸、ｐＨ２．９）で樹脂から溶出し、溶出物のｐＨを、中和緩衝液（１Ｍアルギニン、０．６８５Ｍスクシネート、ｐＨ５．０）の１／１２の容積を添加することにより上げた。ハーフ抗体調製物の濃度は、ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）を用いて、２８０ｎｍにおける吸光度を測定した後に計算された。

【０６４６】

ハーフ抗体を、二重エピトープ抗体内に構築した。上述のように精製されたハーフ抗体を同じ濃度に正規化し、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｓｔａｒリキッドハンドリング用ワークステーション（Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｒｏｂｏｔｉｃｓ，Ｒｅｎｏ，ＮＶ）を使用して１：１の比率に混合した。ハーフ抗体の混合物のｐＨを、１Ｍアルギニン（ｐＨ９．５）溶液の添加により８．０に上げた。１Ｍアルギニン（ｐＨ９．５）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）中０．５Ｍストック中の還元Ｌ－グルタチオンを、最終Ｌ－グルタチオン濃度が溶液中のタンパク質の量よりも２００倍過剰となるように添加した。この混合物を３２℃で２４時間インキュベートして、ハーフ抗体を二重エピトープ抗体に構築した。

【０６４７】

最初のステップにＨｉｓタグ精製、続いて第２のステップにＦｌａｇタグ精製を伴う２段階プロセスにより、構築中に生成された所望の二重エピトープ抗体（ノブ及びホールハーフ抗体で構成されたヘテロ二量体）を他の種（未構築のハーフ抗体及びノブ－ノブまたはホール－ホールホモ二量体）から精製した。最初のステップは、０．１ｍＬのＮｉ－ＮＴＡアガロース樹脂（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）でカスタムパックされた（Ｇｌｙｇｅｎ　Ｃｏｒｐ，Ｃｏｌｕｍｂｉａ，ＭＤ）１．２ｍＬのリキッドハンドリング用チップ（Ｄｙｎａｍｉｃ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＬＬＣ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）の使用を伴った。Ｌｙｎｘ　ＬＭ１２００リキッドハンドリング用ワークステーションを使用して、１５サイクルにわたってピペット操作することにより、全てのＨｉｓタグ種（未構築ノブ　ハーフ抗体、ノブ－ノブホモ二量体、及びノブ－ホールヘテロ二量体）を樹脂チップ上に捕捉した。樹脂チップを１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）で洗浄し、溶出緩衝液（５０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウム、３００ｍＭイミダゾール（ｐＨ７．５））を用いて、２つの連続溶出ステップ（溶出の総容積＝０．６ｍＬ）において、Ｈｉｓタグ種をチップから溶出した。溶出した試料を、試薬グレードの水と１：１希釈して、試料を次のステップのために調製した。

【０６４８】
最初の構築後ステップ精製後に得た溶液に、０．４ｍＬの５０％抗ＦＬＡＧ抗体樹脂スラリーを、Ｆｒｅｅｄｏｍ ＥＶＯ ２００リキッドハンドリング用ワークステーションを使用して添加し、結果として得られる混合物を、Ｆｏｒｍａ Ｏｒｂｉｔａｌ ｓｈａｋｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｅｌｅｃｔｒｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で、２５０ＲＰＭで、４℃で３時間インキュベートした。２，０００ＲＰＭで５分間遠心分離することにより、樹脂を上清から分離し、フィルタプレートに移して１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）で洗浄し、あらゆる未結合タンパク質を除去した。プレートを、０．２μｍの９６ウェルフィルタプレート及び９６ウェル溶出液捕捉プレートの上部に重ねた。２，０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、０．１１ｍＬの２０ｘＰＢＳ（ｐＨ１１．０）で中和して、精製した二重エピトープ抗体溶液のｐＨを６．０に調整することにより、合計１．５７ｍＬの溶出緩衝液（５０ｍＭリン酸、ｐＨ２．９）を使用する３つの連続溶出において、結合二重エピトープ抗体（ヘテロ二量体）を樹脂から溶出した。二重エピトープ抗体の濃度は、ＮａｎｏＤｒｏｐ ２０００分光光度計を用いて、２８０ｎｍにおける吸光度を測定した後に計算された。

【０６４９】
最終精製二重エピトープ抗体の質は、分析用ＳＥＣ ＨＰＬＣ及び質量分析法を用いて評価した。ＳＥＣは、０．０３ｍＬを、Ｄｉｏｎｅｘ ＵｌｔｉＭａｔｅ ３０００ ＨＰＬＣ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）に結合されたＴＳＫＧｅｌ ＳｕｐｅｒＳＷ３０００カラム（Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｋｉｎｇ ｏｆ Ｐｒｕｓｓｉａ，ＰＡ）上に注入することによって行われた。分析は、アイソクラチック勾配（２００ｍＭリン酸カリウム、２５０ｍＭ塩化カリウム、ｐＨ７．２）で行われた。ＵＶ検出は２８０ｎＭに設定された。Ａｇｉｌｅｎｔ ６２２４ ＴＯＦ ＬＣ－ＭＳシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して、質量分析データを取得した。二重エピトープ抗体の試料を、３７℃で２０分間、１００ｍＭジチオトレイトール（Ｇ－Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）で還元した。ポリペプチド鎖をＰＬＲＰ－Ｓ逆相カラム（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて分離した。還元した軽鎖及び重鎖のインタクト質量を、ＭａｓｓＨｕｎｔｅｒソフトウェア（Ｑｕａｌｉｔａｔｉｖｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｂ．０３．０１）を使用して、Ｍａｘｉｍｕｎ Ｅｎｔｒｏｐｙ Ｄｅｃｏｎｖｏｌｕｔｉｏｎにより得た。

【０６５０】
結果
ＯＸ４０の存在下で二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８抗体が高次複合体を形成する能力はＳＥＣを使用して調査された。２：１の比率で１Ａ７または１Ａ７／３Ｃ８二重エピトープ抗体をヒトＯＸ４０（Ｇ＆Ｐ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ＦＣＬ２４７９）と混合し、室温で２時間インキュベートし、混合物をＴＳＫＧｅｌ ＳｕｐｅｒＳＷ３０００カラムにかけた。データを図１に示す。２：１の抗体：ＯＸ４０比で、単一エピトープ１Ａ７ ＩｇＧ１抗体は、３つの種：遊離抗体、１つのアームが結合した抗体、及び２つのアームが結合した抗体を形成する。対照的に、１Ａ７／３Ｃ８は、１：２よりも大きい抗体：ＯＸ４０化学量論を形成する。結果は、二重エピトープ抗ＯＸ４０抗体が、単一エピトープ抗体と比べて、標的抗原の存在下で高次複合体を促進することができることを示す。

【０６５１】
実施例２．多価単一エピトープ及び二重エピトープ抗体形式の設計
多価及び多重エピトープ標的の組み合わせは、強化されたアゴニスト活性を有する抗体形式を操作する試みで探求された。図２は、新規の多価及び多重エピトープ抗体形式を操作する際に使用された要素を図示するＩｇＧ抗体の構造を示す。ＩｇＧは、重鎖及び軽鎖を含む。重鎖は、可変重ドメイン（ＶＨ）、定常重ドメイン１（ＣＨ１）、ヒンジ、定常重ドメイン２（ＣＨ２）、及び定常重ドメイン３（ＣＨ３）を含む。軽鎖は、可変軽ドメ

イン（ＶＬ）及び定常軽ドメイン（ＣＬ）を含む。ＣＬは、定常カッパ（Ｃｋ）または定常ラムダ（Ｃｌ）であり得る。標的に特異性を有するＦｖ領域は、可変重（ＶＨ）及び可変軽（ＶＬ）ドメインを含む。標的に特異性を有するＦａｂ領域は、可変重（ＶＨ）及び可変軽（ＶＬ）ドメイン、ならびに定常重ドメイン１（ＣＨ１）及び定常軽（ＣＬ）を含む。Ｆａｂ領域により除外されるＩｇＧ領域は、重鎖ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３である。図３Ａと３Ｂは、操作され、特徴付けられた一連の多価及び多重エピトープ抗体形式を示す。二価の天然ＩｇＧを越えて、４つの四価（力価＝４）形式が操作された：結合ＩｇＧ－ＩｇＧ（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）（２つの完全長ＩｇＧが化学的に結合される）、結合Ｆａｂ－ＩｇＧ（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）（２つのＦａｂが完全長ＩｇＧに化学的に結合される）、組換えＦａｂ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）（２つの追加のＦａｂアームがＩｇＧに遺伝的に結合される）、及び組換えＦｖ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ）（２つの追加のＦｖ領域がＩｇＧに遺伝的に結合される）。これらの形式のそれぞれに関して、４つ全ての可変領域が標的抗原上の同じエピトープに結合する（本明細書において単一エピトープと称される）か、または２つの可変領域が１つのエピトープに結合し、他の可変領域が標的抗原上の異なるエピトープに結合する（本明細書において二重エピトープと称される）、構築物が探求された。

【０６５２】

４つ全ての可変領域は、標的抗原上の同じエピトープに結合し得る（本明細書において単一エピトープと称される）。例えば、４つ全ての可変領域は抗ＯＸ４０　１Ａ７可変領域であり得るか、または４つ全ての可変領域は抗ＯＸ４０　３Ｃ８可変領域であり得る。代替的に、２つの可変領域は１つのエピトープに結合し得、他の２つの可変領域は標的抗原上の異なるエピトープに結合し得る（本明細書において二重エピトープと称される）。例えば、可変領域のうちの２つが１Ａ７可変領域であり得、他の２つの可変領域が３Ｃ８可変領域であり得る。

【０６５３】

２つの完全長ＩｇＧが化学的に結合される、結合ＩｇＧ－ＩｇＧ（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）形式が本明細書において記載される。図４は、二重エピトープｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧの１つのバージョンの構成成分を図示する。このバージョンにおいて、ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧは、エピトープ２に特異性を有するIgG^{Ep2}に化学的に結合された、エピトープ１に特異性を有するIgG^{Ep1}を含む。IgG^{Ep2}は、化学リンカーＬを通してIgG^{Ep1}に連結される。様々なリンカーを用いて、IgG^{Ep1}及びIgG^{Ep2}を接続することができる。IgG^{Ep1}及びIgG^{Ep2}の結合部位は様々であり得る。記載のｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式は４つの別個のタンパク質鎖を含む：VH_1－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３で構成されるIgG^{Ep1}重鎖（ＨＣ）、VL_1－ＣＬで構成されるIgG^{Ep1}軽鎖（ＬＣ）、VH_2－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３で構成されるIgG^{Ep2}ＨＣ、及びVL_2－ＣＬで構成されるIgG^{Ep2}ＬＣ。図５は、二重エピトープｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧの別のバージョンの構成成分を図示する。このバージョンにおいて、ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧは、それ自体に化学的に結合されたエピトープ１及び２の両方に特異性を有する二重エピトープ$IgG^{Ep1\&2}$を含む。$IgG^{Ep1\&2}$は、化学リンカーＬを通して結合される。様々なリンカーを用いて、$IgG^{Ep1\&2}$を結合することができる。$IgG^{Ep1\&2}$の結合部位は様々であり得る。記載のｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式は４つの別個のタンパク質鎖を含む：VH_1－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３で構成されるIgG^{Ep1}重鎖（ＨＣ）、VL_1－ＣＬで構成されるIgG^{Ep1}軽鎖（ＬＣ）、VH_2－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３で構成されるIgG^{Ep2}ＨＣ、及びVL_2－ＣＬで構成されるIgG^{Ep2}ＬＣ。本明細書に記載の実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８抗体の可変領域を含むｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧが構築され、試験される。好ましい実施形態では、$IgG^{Ep1\&2}$は、１Ａ７可変領域及び３Ｃ８可変領域を含む（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ　１Ａ７／３Ｃ８－１Ａ７／３Ｃ８と称される）。

【０６５４】

２つのＦａｂが完全長ＩｇＧに化学的に結合される、結合Ｆａｂ－ＩｇＧ（ｃ：Ｆａｂ

－ＩｇＧ）形式が本明細書において記載される。図６は、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式の構成成分を図示する。ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、エピトープ２に特異性を有するＦａｂ^{Ｅｐ２}に化学的に結合された、エピトープ１に特異性を有するＩｇＧ^{Ｅｐ１}を含む。Ｆａｂ^{Ｅｐ２}は、化学リンカーＬを通してＩｇＧ^{Ｅｐ１}に連結される。様々なリンカーを用いて、ＩｇＧ^{Ｅｐ１}及びＦａｂ^{Ｅｐ２}を接続することができる。ＩｇＧ^{Ｅｐ１}及びＦａｂ^{Ｅｐ２}の結合部位は様々であり得る。ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式は４つの別個のタンパク質鎖を含む：$ＶＨ_{1}$－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３で構成されるＩｇＧ^{Ｅｐ１}重鎖（ＨＣ）、$ＶＬ_{1}$－ＣＬで構成されるＩｇＧ^{Ｅｐ１}軽鎖（ＬＣ）、$ＶＨ_{2}$－ＣＨ１で構成されるＦａｂ^{Ｅｐ２}ＨＣ、及び$ＶＬ_{2}$－ＣＬで構成されるＦａｂ^{Ｅｐ２}ＬＣ。

【０６５５】

本明細書に記載の実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８抗体の可変領域を含むｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧが構築され、試験された。いくつかの実施形態では、ＩｇＧ^{Ｅｐ１}は１Ａ７可変領域を含み、Ｆａｂ^{Ｅｐ２}は３Ｃ８可変領域を含む（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７と称される）。いくつかの実施形態では、ＩｇＧ^{Ｅｐ１}は３Ｃ８可変領域を含み、Ｆａｂ^{Ｅｐ２}は１Ａ７可変領域を含む（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８と称される）。

【０６５６】

２つの追加の可変領域がＩｇＧに遺伝的に連結される組換えＦｖ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ）が、本明細書において記載される。図７は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式の構成成分を図示する。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、単一の重鎖及び単一の軽鎖を含む。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、エピトープ１に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ１}にＮ末端により連結された、エピトープ２に特異性を有するＩｇＧ^{Ｅｐ２}を含む。Ｆｖ^{Ｅｐ１}は、重鎖リンカーＬＨ及び軽鎖リンカーＬＬを通してＩｇＧ^{Ｅｐ２}に連結される。様々なリンカーを用いて、Ｆｖ^{Ｅｐ２}をＦｖ^{Ｅｐ１}に接続することができる。重鎖は、領域$ＶＨ_{1}$－ＬＨ－$ＶＨ_{2}$－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。軽鎖は、領域$ＶＬ_{1}$－ＬＬ－$ＶＬ_{2}$－ＣＬを含む。この形式において、エピトープ２に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ２}は、$ＶＨ_{2}$及び$ＶＬ_{2}$ドメインを含み、エピトープ１に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ１}は、$ＶＨ_{1}$及び$ＶＬ_{1}$ドメインを含む。

【０６５７】

本明細書に記載の実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８抗体の可変領域を含むｒ：Ｆｖ－ＩｇＧが構築され、試験された。いくつかの実施形態では、Ｆｖ^{Ｅｐ１}は３Ｃ８可変領域を含み、Ｆｖ^{Ｅｐ２}は１Ａ７可変領域を含む（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７と称される）。いくつかの実施形態では、Ｆｖ^{Ｅｐ１}は１Ａ７可変領域を含み、Ｆｖ^{Ｅｐ２}は３Ｃ８可変領域を含む（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８と称される）。例示的なｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの重鎖及び軽鎖の配列は、配列番２４０～２４３に列記される。例示的なリンカーＬＨ及びＬＬは配列番号２７０～２７８に提供され、以下の実施例１６に記載される。以下の実施例１６に記載される、異なるリンカーＬＨ及びＬＬを有する代替えの例示的なｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、配列番号２５０～２５７に列記される。以下の実施例１７に記載される、異なるＯＸ４０親和性を有するＦｖを含む代替えの例示的なｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、配列番号２５８～２６７に列記される。

【０６５８】

２つの追加のＦａｂアームがＩｇＧに遺伝的に連結される組換えＦａｂ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）が本明細書において記載される。図８は、１つのホモ二量体ＨＣ及び２つのＬＣを含むｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式の１つのバージョンの構成成分を図示する。このｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョン（本明細書においてｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｖ１と称される）は、エピトープ１に特異性を有するＦａｂ^{Ｅｐ１}にＮ末端により連結された、エピトープ２に特異性を有するＩｇＧ^{Ｅｐ２}を含む。Ｆａｂ^{Ｅｐ１}は、重鎖リンカーＬＨを通してＩｇＧ^{Ｅｐ２}に連結される。様々なリンカーを用いて、Ｆａｂ^{Ｅｐ１}をＩｇＧ^{Ｅｐ２}に接続することができる。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｖ１のＨＣは、$ＶＨ_{1}$－ＣＨ１－ＬＨ－$ＶＨ_{2}$－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。一方のＬＣは$ＶＬ_{1}$－ＣＬを含み、他方のＬＣは$ＶＨ_{2}$－ＣＬを含む。重鎖と軽鎖との間の正しい対合は、本明細書の実施例に記載される、ＶＨ、ＣＨ１、ＶＬ、及び／またはＣＬドメインの操作された変異型を使用して

制御され得る。この形式において、エピトープ２に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ２}は、ＶＨ$_{2}$及びＶＬ$_{2}$ドメインを含み、エピトープ１に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ１}は、ＶＨ$_{1}$及びＶＬ$_{1}$ドメインを含む。

【０６５９】

本明細書に記載の実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８抗体の可変領域を含むｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｖ１が構築され、試験された。いくつかの実施形態では、Ｆｖ^{Ｅｐ１}は３Ｃ８可変領域を含み、Ｆｖ^{Ｅｐ２}は１Ａ７可変領域を含む（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７と称される）。いくつかの実施形態では、Ｆｖ^{Ｅｐ１}は１Ａ７可変領域を含み、Ｆｖ^{Ｅｐ２}は３Ｃ８可変領域を含む（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８と称される）。例示的な抗ＯＸ４０ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの重鎖及び軽鎖の配列は、配列番２４４～２４９に列記される。

【０６６０】

図９は、ヘテロ二量体ＨＣ及び２つのＬＣを含むｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式の別のバージョンの構成成分を図示する。このｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョン（本明細書においてｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　Ｖ２と称される）は、重鎖リンカーＬＨを通してＩｇＧ$^{Ｅｐ１＆２}$の一方のアームに連結されたＦａｂ^{Ｅｐ２}を含み、Ｆａｂ^{Ｅｐ１}は、重鎖リンカーＬＨを通してＩｇＧ$^{Ｅｐ１＆２}$の他方のアームに連結される。様々なリンカーを用いて、Ｆａｂ^{Ｅｐ１}をＩｇＧ$^{Ｅｐ１＆２}$に、そしてＦａｂ^{Ｅｐ２}をＩｇＧ$^{Ｅｐ１＆２}$に接続することができる。この形式の一方のＨＣは、ＶＨ$_{2}$－ＣＨ１－ＬＨ－ＶＨ$_{2}$－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含み、この形式の他方のＨＣは、ＶＨ$_{1}$－ＣＨ１－ＬＨ－ＶＨ$_{1}$－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３を含む。この形式の一方のＬＣはＶＬ$_{2}$－ＣＬを含み、他方のＬＣはＶＨ$_{1}$－ＣＬを含む。エピトープ２に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ２}は、ＶＨ$_{2}$及びＶＬ$_{2}$ドメインを含む。エピトープ１に特異性を有するＦｖ^{Ｅｐ１}は、ＶＨ$_{1}$及びＶＬ$_{1}$ドメインを含む。操作された変異型を用いて、重鎖のヘテロ二量体形成を促進することができる。

【０６６１】

様々なリンカーを用いて、Ｆａｂ^{Ｅｐ１}をＩｇＧ^{Ｅｐ２}に接続することができる。リンカーは、セリン、グリシン、またはセリン及びグリシンを実質的に含む配列を含み得る。かかるＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーは、５０％を超えるグリシン及び／またはセリン、７０％を超えるグリシン及び／またはセリン、９０％を超えるグリシン及び／またはセリン、または１００％のグリシン及び／またはセリンを含み得る。セリン及びグリシンは、それらの柔軟性及び好ましい溶液特性により、通常リンカーとして使用される。リンカーは、天然の抗体配列を実質的に含む配列をさもなければ含むか、またはそれも含み得る。これらのリンカーにおいて、抗体配列を構成する天然の配列は、リンカーとして使用される。特に有用なｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの天然の抗体配列は、重鎖定常領域のＣＨ１とＣＨ２との間の天然抗体のヒンジ領域に存在する重鎖配列である。天然抗体配列リンカーの有用性は、それらが四価の抗体形式内のある非天然配列を低減するために使用され得ることである。所与のリンカーの長さは、１つの残基～２０以上の残基まで様々であり得る。典型的には、長さがより長ければ、連結された免疫グロブリンドメイン間により大きな柔軟性が提供される。本開示のｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧにおける使用のための例示的な組換えリンカーは、配列番号２６８及び２６９に記載される。

【０６６２】

配列番号２６８。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧのＬＨリンカー：ＤＫＴＨＴ

【０６６３】

配列番号２６９。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧのＬＨリンカー：ＤＫＴＨＴＧＧＧＧＳＧＧ

【０６６４】

Ｆａｂが単一の重鎖リンカー（ＬＨ）を通してＩｇＧに連結されるｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式が本明細書に記載されるが、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧが軽鎖間にもリンカーを含み得ることが企図される。実際、連結された軽鎖の構築物が、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式について探求されたが、発現及び精製（データ示さず）の際により多くの凝集した種の高集団をもた

らしたため、さらに特徴付けされなかった。

【０６６５】

本明細書に記載される、抗ＯＸ４０　ＩｇＧの重鎖及び軽鎖、ならびに四価の形式の例示的な配列を以下に提供する。リンカーは、適切な場合、下線が引かれている。

【０６６６】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式

配列番号２４０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８重鎖。
配列番号２４１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖。
配列番号２４２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７重鎖。
配列番号２４３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖
配列番号２５０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ短いリンカー重鎖。
配列番号２５１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ短いリンカー軽鎖。
配列番号２５２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ長いリンカー重鎖。
配列番号２５３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ長いリンカー軽鎖。
配列番号２５４。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＳ短い肘リンカー重鎖。
配列番号２５５。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＳ短い肘リンカー軽鎖。
配列番号２５６。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＬ長い肘リンカー重鎖。
配列番号２５７。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＬ長い肘リンカー軽鎖。
配列番号２５８。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（高）重鎖。
配列番号２５９。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（高）軽鎖。
配列番号２６０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７重鎖。
配列番号２６１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７軽鎖
配列番号２６２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（高）重鎖
配列番号２６３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（高）軽鎖
配列番号２６４。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）重鎖
配列番号２６５。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）軽鎖
配列番号２６６。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（低）重鎖
配列番号２６７。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（低）軽鎖

【０６６７】

ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式

配列番号２４４。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８重鎖。
配列番号２４５。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖１。
配列番号２４６。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖２。
配列番号２４７。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７重鎖。
配列番号２４８。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖１。
配列番号２４９。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖２。

【０６６８】

ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式

配列番号２３２。３Ｃ８＿ＩｇＧ１（完全長重鎖）。
配列番号２３７。３Ｃ８＿Ｃｋａｐｐａ（Ｋ１４９Ｃ）（軽鎖）。
配列番号２３９。１Ａ７＿ＣＨ１－ＳＰＰＣ（Ｆａｂ重鎖）。
配列番号２３１。１Ａ７＿Ｃｋａｐｐａ（軽鎖）。
配列番号２３０。１Ａ７＿ＩｇＧ１（完全長重鎖）。
配列番号２３６。１Ａ７＿Ｃｋａｐｐａ（Ｋ１４９Ｃ）（軽鎖）。
配列番号２３８。３Ｃ８＿ＣＨ１－ＳＰＰＣ（Ｆａｂ重鎖）。
配列番号２３３。３Ｃ８＿Ｃｋａｐｐａ（軽鎖）。

【０６６９】

配列

【０６７０】

配列番号２３０。１Ａ７＿ＩｇＧ１（完全長重鎖）。

【０６７１】
ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＲＱ
ＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＤＭＹＰＤＮＧＤＳＳＹＮＱＫＦＲＥＲＶＴＩＴＲＤＴＳＴＳＴＡ
ＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＶＬＡＰＲＷＹＦＳＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳ
ＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮ
ＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩ
ＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶ
ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹ
ＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤ
ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０６７２】
配列番号２３１。１Ａ７＿Ｃｋａｐｐａ（軽鎖）。

【０６７３】
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＱＫ
ＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＲＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＨＴＬＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

【０６７４】
配列番号２３２。３Ｃ８＿ＩｇＧ１（完全長重鎖）。

【０６７５】
ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＡＦＴＮＹＬＩＥＷＶＲＱ
ＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＶＩＮＰＧＳＧＤＴＹＹＳＥＫＦＫＧＲＶＴＬＴＡＤＴＳＴＳＴＡ
ＹＬＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＤＲＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧ
ＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡ
ＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ
ＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬ
ＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶ
ＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫ
ＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱ
ＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧ
ＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳ
ＬＳＰＧＫ

【０６７６】
配列番号２３３。３Ｃ８＿Ｃｋａｐｐａ（軽鎖）。

【０６７７】
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＨＡＳＱＤＩＳＳＹＩＶＷＹＱＱＫ
ＰＧＫＳＦＫＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＶＨＹＡＱＦＰＹＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

【０６７８】
配列番号２３４。１Ａ７＿ＣＨ１（Ｆａｂ重鎖）。

【０６７９】
ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＳＹＭＳＷＶＲＱ

APGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTA
YLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
【０６８０】
配列番号２３５。３Ｃ８＿ＣＨ１（Ｆａｂ重鎖）。
【０６８１】
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQ
APGQGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTA
YLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSC
【０６８２】
配列番号２３６。１Ａ７＿Ｃｋａｐｐａ（Ｋ１４９Ｃ）（軽鎖）。
【０６８３】
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQK
PGKAPKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
【０６８４】
配列番号２３７。３Ｃ８＿Ｃｋａｐｐａ（Ｋ１４９Ｃ）（軽鎖）。
【０６８５】
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQK
PGKSFKGLIYHGTNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
【０６８６】
配列番号２３８。３Ｃ８＿ＣＨ１－ＳＰＰＣ（Ｆａｂ重鎖）。
【０６８７】
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQ
APGQGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTA
YLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPC
【０６８８】
配列番号２３９。１Ａ７＿ＣＨ１－ＳＰＰＣ（Ｆａｂ重鎖）。
【０６８９】
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQ
APGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTA
YLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPC

【０６９０】
配列番号２４０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８重鎖。
【０６９１】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAPGQGLEWIG

DMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSV

WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIE

WVRQAPGQGLEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTA

VYYCARDRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT

KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

YTQKSLSLSPGK

【０６９２】
配列番号２４１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖。
【０６９３】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS

RLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKGGG

GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHG

TNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKRT

VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０６９４】
配列番号２４２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７重鎖。
【０６９５】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV

INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVR
QAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYY
CVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０６９６】

配列番号２４３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖。

【０６９７】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０６９８】

配列番号２４４。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８重鎖。

【０６９９】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRKAPGQGLEWIG
DMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSV
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTGGGGSGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVREAPGQG
LEWIGVINPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRL
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

【０７００】

配列番号２４５。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖１。

【０７０１】

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＥＫ
ＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＲＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＨＴＬＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＫＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

【０７０２】

配列番号２４６。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８軽鎖２。

【０７０３】

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＨＡＳＱＤＩＳＳＹＩＶＷＹＱＫＫ
ＰＧＫＳＦＫＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＶＨＹＡＱＦＰＹＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＥＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

【０７０４】

配列番号２４７。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７重鎖。

【０７０５】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRKAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TGGGGSGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVREAPGQGLEW
IGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAPRWYF
SVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

【０７０６】
配列番号２４８。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖１。
【０７０７】
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＨＡＳＱＤＩＳＳＹＩＶＷＹＱＥＫ
ＰＧＫＳＦＫＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＶＨＹＡＱＦＰＹＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＫＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
【０７０８】
配列番号２４９。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７軽鎖２。
【０７０９】
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＩＳＮＹＬＮＷＹＱＫＫ
ＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＲＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱ
ＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＨＴＬＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰ
ＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＥＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳ
ＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱ
ＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
【０７１０】
配列番号２５０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ短いリンカー重鎖（実施例１６に記載される）。
【０７１１】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV

INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAPG
QGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLA
PRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

【０７１２】

配列番号２５１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ短いリンカー軽鎖（実施例１６に記載される）。

【０７１３】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT

NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGS
GGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLRS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７１４】

配列番号２５２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ長いリンカー重鎖（実施例１６に記載される）。

【０７１５】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYM
SWVRQAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDT
AVYYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

【０７１６】

配列番号２５３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＧＳ長いリンカー軽鎖（実施例１６に記載される）。

【０７１７】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGS
GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL
IYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７１８】

配列番号２５４。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＳ短い肘リンカー重鎖（実施例１６に記載される）。

【０７１９】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAPGQ
GLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAP
RWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

【０７２０】

配列番号２５５。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＳ短い肘リンカー軽鎖（実施例１６に記載される）。

【０７２１】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKRTV
AAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLR
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７２２】

配列番号２５６。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＬ長い肘リンカー重鎖（実施例１６に記載される）。

【０７２３】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSW
VRQAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAV
YYCVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

【０７２４】

配列番号２５７。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７　ＥＬ長い肘リンカー軽鎖（実施例１６に記載される）

【０７２５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY
YTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７２６】

配列番号２５８及び２５９は、実施例１７に記載される１Ａ７　ＶＨ変異Ｍ３４Ｉ及びＶＬ変異Ｒ５３Ｙを含む、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（高）の重鎖及び軽鎖の配列を記載する。

【０７２７】

配列番号２５８。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（高）重鎖。

【０７２８】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYISWVRQ
APGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYC
VLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０７２９】
配列番号２５９。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（高）軽鎖。
【０７３０】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSYLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７３１】
配列番号２６０及び２６１は、実施例１７に記載される３Ｃ８　ＶＨ変異Ｍ３１Ｉ及びＫ６４Ｌを含む、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）の重鎖及び軽鎖の配列を記載する。
【０７３２】
配列番号２６０。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７重鎖。
【０７３３】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTIYLIEWVRQAPGQGLEWIGVI
NPGSGDTYYSEKFLGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVR
QAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYY
CVLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０７３４】
配列番号２６１。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７軽鎖
【０７３５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７３６】
配列番号２６２及び２６３は、実施例１７に記載される３Ｃ８　ＶＨ変異Ｍ３１Ｉ及びＫ６４Ｌ、１Ａ７　ＶＨ変異Ｍ３４Ｉ、ならびに１Ａ７　ＶＬ変異Ｒ５３Ｙを含む、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（高）の重鎖及び軽鎖の配列を記載する。
【０７３７】
配列番号２６２。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（高）重鎖
【０７３８】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTIYLIEWVRQAPGQGLEWIGVI
NPGSGDTYYSEKFLGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYISWVRQ
APGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYC
VLAPRWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０７３９】
配列番号２６３。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（高）軽鎖
【０７４０】
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSYLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
【０７４１】
配列番号２６４及び２６５は、実施例１７に記載される３Ｃ８　ＶＨ変異Ｍ３１Ｉ及びＫ６４Ｌ、ならびに１Ａ７　ＶＨ変異Ｐ９６Ａを含む、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）の重鎖及び軽鎖の配列を記載する。
【０７４２】
配列番号２６４。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）重鎖
【０７４３】
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTIYLIEWVRQAPGQGLEWIGVI
NPGSGDTYYSEKFLGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVR
QAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYY
CVLAARWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０７４４】
配列番号２６５。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８（高）－１Ａ７（低）軽鎖
【０７４５】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７４６】

配列番号２６６及び２６７は、実施例１７に記載される１Ａ７　ＶＨ変異Ｐ９６Ａを含む、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（低）の重鎖及び軽鎖の配列を記載する。

【０７４７】

配列番号２６６。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（低）重鎖

【０７４８】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGV
INPGSGDTYYSEKFKGRVTLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDRLDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVR
QAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYY
CVLAARWYFSVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【０７４９】

配列番号２６７。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７（低）軽鎖

【０７５０】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISSYIVWYQQKPGKSFKGLIYHGT
NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVHYAQFPYTFGQGTKVEIKGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０７５１】

本開示に用途を見出し得る例示的な重鎖定常領域（ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）及び軽鎖定常領域（ＣＬ）は、配列番号２７９～２８８に提供される。当該技術分野で周知であるように、ヒト定常鎖の多型、アロタイプ、及びハプロタイプ変異型が存在し、これらの変異型は本開示に用途を見出し得る。

【０７５２】

配列番号２７９。ヒトＩｇＧ１重定常領域（ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）

【０７５３】

ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ

ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ
ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ
ＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥ
ＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹ
ＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０７５４】

配列番号２９５。ヒトＩｇＧ２重定常領域（ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）

【０７５５】

ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱ
ＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶ
ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤ
ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ
ＣＫＶＳＮＫＧＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫ
ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳ
ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ
ＬＳＬＳＰＧＫ

【０７５６】

配列番号２９６。ヒトＩｇＧ３重定常領域（ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）

【０７５７】

ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ
ＴＹＴＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＬＫＴＰＬＧＤＴＴＨＴＣＰＲＣＰＥＰＫＳ
ＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰＥＰＫＳＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰＥＰＫＳＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣ
ＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥ
ＤＰＥＶＱＦＫＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＬ
ＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹ
ＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＳＧＱＰＥＮ
ＮＹＮＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＩＦＳＣＳＶＭＨ
ＥＡＬＨＮＲＦＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０７５８】

配列番号２９７。ヒトＩｇＧ４重定常領域（ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）

【０７５９】

ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫ
ＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＳＫＹＧＰＰＣＰＳＣＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶ
ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹ
ＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤ
ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＬＧＫ

【０７６０】

配列番号２９８。ヒトＣｋａｐｐａ軽定常領域（ＣＬ－カッパ）。

【０７６１】

ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶ
ＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹ
ＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

【０７６２】
配列番号２９９。ヒトＣｌａｍｂｄａ　１軽定常領域（ＣＬ－ラムダ１）。
【０７６３】
ＧＱＰＫＡＮＰＴＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＧＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＫＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ
【０７６４】
配列番号３００。ヒトＣｌａｍｂｄａ　２軽定常領域（ＣＬ－ラムダ２）。
【０７６５】
ＧＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＳＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ
【０７６６】
配列番号３０１。ヒトＣｌａｍｂｄａ　３軽定常領域（ＣＬ－ラムダ３）。
【０７６７】
ＧＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＳＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＫＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ
【０７６８】
配列番号３０２。ヒトＣｌａｍｂｄａ　６軽定常領域（ＣＬ－ラムダ６）。
【０７６９】
ＧＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＫＶＡＷＫＡＤＧＳＰＶＮＴＧＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＡＥＣＳ
【０７７０】
配列番号３０３。ヒトＣｌａｍｂｄａ　７軽定常領域（ＣＬ－ラムダ７）。
【０７７１】
ＧＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＶＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＧＳＰＶＫＶＧＶＥＴＴＫＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＲＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＡＥＣＳ．
【０７７２】
実施例３．結合ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体の操作及び特徴付け
材料及び方法
単一エピトープ及び二重エピトープ結合ＩｇＧ－ＩｇＧ（ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）抗ＯＸ４０抗体を、１Ａ７及び３Ｃ８可変領域を使用して生成した。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、ハーフ抗体のうちの１つのみが遊離システインを有する二重特異性抗体である非対称ｔｈｉｏｍａｂを操作することによって構築した。本実験において、ヒトＣｋａｐｐａ定常領域上の置換Ｋ１４９Ｃが使用されたが、本開示は、任意の抗体残基における操作されたシステインの使用を企図する。Ｋ１４９Ｃに単一の遊離システインを含む二重特異性抗体を、ノブ－イントゥ－ホール変異型（参照）及びハーフ抗体のインビトロ構築を用いて上述のように生成した（Ｓｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３１（８）：７５３－８）。抗体は、ｐＲＫベクターにおいて構築され、全ての抗体重鎖は、グリコシル化を除去し、Ｆｃ受容体への結合を減衰させるためにＮ２９７Ｇ変異を含有した。１Ａ７及び３Ｃ８ハーフ抗体は、所望の構築物に応じて、ノブ／Ｈｉｓまたはホール／Ｆｌａｇ重鎖のいずれか、及び天然またはＫ１４９Ｃ軽鎖を含有した。各抗体の重鎖及び軽鎖をコードするｐＲＫベクターＤＮＡを、発現のためにＨＥＫ２９３細胞内に共トランスフェクトし、結果として得られるタンパク質を上清から精製し、上述のように二重特異性抗体を構築し、精製した。
【０７７３】
ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、ビス－マレイミドポリエチレングリコールリンカー（ビス

－マレイミド（ＰＥＧ）を使用して、非対称ｔｈｉｏｍａｂ二重特異性抗体を化学的に結合することによって生成した。ノブまたはホールの軽鎖上にＫ１４９Ｃ変異を有する非対称ｔｈｉｏｍａｂ二重特異性抗体を、上述のノブ－イントゥ－ホール技術を使用して生成した。ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、本実験のために２個または３個のいずれかのＰＥＧ単位を含有したリンカーによりノブまたはホール上のＫ１４９Ｃ部位を通して作製したが、様々なＰＥＧ長が利用され得ることが企図される。

【０７７４】

結果

ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、ＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。ＣＤ４＋メモリーＴ細胞（ＣＤ４＋ＣＤ４５ＲＯ＋）をバフィーコート（ｂｕｆｆｙ ｃｏａｔ）から選別し、ＣＤ８０（Ｂ７－１）及びＣＤ３２ａ（ＦｃγＲＩＩａ）またはＣＤ３２ａ（ＦｃγＲＩＩａ）のみのいずれかを発現する照射Ｌ細胞を、代替抗原提示細胞（ＡＰＣ）として使用した。ＣＤ４＋メモリーＴ細胞をＬ細胞と共にインキュベートし、可溶性抗ＣＤ３抗体（マウス抗ヒトＣＤ３クローンＳＰ３４）及び漸増濃度の抗ＯＸ４０抗体または対照としての抗Ｈｅｒ２抗体で刺激した。細胞を７日間培養し、採取し、Ｔ細胞増殖についてはＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって、及びサイトカイン放出についてはＥＬＩＳＡによってアッセイした。

【０７７５】

Ｔ細胞増殖データが図１０に示される。結果は、四価の単一エピトープ１Ａ７（Ｎ２９７Ｇ）－１Ａ７（Ｎ２９７Ｇ）及び二価の二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８（Ｎ２９７Ｇ）がＦｃＲ媒介性架橋の不在下で軽度のレベルのアゴニスト活性をもたらし、四価の二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８（Ｎ２９７Ｇ）－１Ａ７／３Ｃ８（Ｎ２９７Ｇ）が強いレベルのアゴニスト活性を促進することを示す。

【０７７６】

四価の単一エピトープ３Ｃ８（Ｎ２９７Ｇ）－３Ｃ８（Ｎ２９７Ｇ）が試験セットに含まれたアッセイが繰り返された。これらのデータを図１１に示す。結果は、再度、架橋（Ｎ２９７Ｇ）の不在下で１Ａ７／３Ｃ８四価形式の強固なアゴニズムを示し、四価係合の関連において１Ａ７及び３Ｃ８エピトープを標的とする相乗的組み合わせを図示した。重要なことには、データはまた、１Ａ７／３Ｃ８　ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式がＣＤ３刺激の不在下で不活性であることも示し、その強固な活性に関わらず、ＴＣＲ係合が依然として必要であることを示す。

【０７７７】

実施例４．結合ＦＡｂ－ＩｇＧ抗体の操作及び特徴付け

材料及び方法

単一エピトープ及び二重エピトープ結合Ｆａｂ－ＩｇＧ（ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ）抗ＯＸ４０抗体を、１Ａ７及び３Ｃ８可変領域に基づいて生成した。ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体を、Ｋ１４９Ｃに遊離システインを含む１Ａ７完全長ヒトＩｇＧ１をＣ末端遊離システインで操作された３Ｃ８　Ｆａｂに結合することによって構築した。本実験において、ヒトＣｋａｐｐａ定常領域上の置換Ｋ１４９Ｃが使用されたが、本開示は、任意の抗体残基における操作されたシステインの使用を企図する。

【０７７８】

ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、ビス－マレイミドポリエチレングリコールリンカー（ビス－マレイミド（ＰＥＧ）を使用して、Ｆａｂ及びＩｇＧ抗体を化学的に結合することによって生成した。リンカーは、本実験のために２個または３個のいずれかのＰＥＧ単位を含有した。様々なＰＥＧ長が利用され得ることが企図される。３Ｃ８　ＦａｂをビスマルＢＭＰＥＧ３と反応させ、次いで、過剰のＢＭＰＥＧ３を除去した。次いで、コンジュゲートされた３Ｃ８　Ｆａｂを１Ａ７　ＩｇＧ１　Ｋ１４９Ｃと反応させ、結合Ｆａｂ－ＩｇＧを、従来のクロマトグラフィー法を用いて、Ｓ２００　ＳＥＣカラム、続いてＭｏｎｏ－Ｑカラムを使用して精製した。最終精製ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体の質を、分析用サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱との組み合わせ（ＳＥＣ－ＭＡＬＳ）、ならびに

質量分析法を用いて評価した。ＳＥＣ－ＭＡＬＳを、０８．ｍｌ／分で、ＰＢＳ中のＸｂｒｉｄｇｅ　ＢＥＨカラムを使用して実行した。

【０７７９】

結果

結果を図１２に示す。データ適合は、以下の最終半径及び分子量をもたらした：ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７／３Ｃ８は、７．３ｎｍ＋／－４．６％のＲｈ（Ｑ）ｚ（ｎｍ）及び２４８．６＋／－１５％ＫＤａのＭＷを有し、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７（Ｎ２９７Ｇ）／３Ｃ８は、７．３ｎｍ＋／－４．３％のＲｈ（Ｑ）ｚ及び２３８．２ＫＤａ＋／－１６．７％のＭＷを有した。質量分析法は、精製ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧが予測したＭＷを有したことを確認した（データ示さず）。

【０７８０】

ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ抗体を、代替抗原提示細胞（ＡＰＣ）としてＣＤ３２ａを発現するＬ細胞を利用して、上述の一次Ｔ細胞アッセイを使用してＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。ヒトＩｇＧ１及びヒトＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｇ）バージョンのＴ細胞増殖データを、それぞれ、図１３及び図１４に示す。結果は、二価の１Ａ７　ＩｇＧ、二価の３Ｃ８　ＩｇＧ、二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８　ＩｇＧによって媒介される弱い活性とは対照的に、１Ａ７／３Ｃ８　ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式が強いレベルのアゴニスト活性を促進することを示す。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式のデータと共に（同じアッセイに含まれる）、結果は、四価の関連において、２つのエピトープ（この実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８　ＯＸ４０エピトープ）を標的とする利益を示す。

【０７８１】

実施例５．組換えＦｖ－ＩｇＧ抗体の操作及び特徴付け

材料及び方法

単一エピトープ及び二重エピトープ組換えＦｖ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ）抗ＯＸ４０抗体を、１Ａ７及び３Ｃ８可変領域に基づいて生成した。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体を、追加のＶＬ領域Ｎ末端を天然ＶＬ領域に、そして追加のＶＨ領域Ｎ末端を天然ＶＨ領域に遺伝的に操作することによって構築した。構築されたｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは、四価の単一エピトープ（１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８）形式または四価の二重エピトープ（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）形式のいずれかをもたらした。これらの実施例に使用されたｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８の重鎖及び軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ、配列番号２４０～２４１に提供され、これらの実施例に使用されたｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７の重鎖及び軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ、配列番号２４２～２４３に提供される。従来の分子生物学法を用いて、抗体をｐＲＫベクターにおいて構築した。全ての抗体は天然ＩｇＧ１定常領域を含んだ。各ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの重鎖及び軽鎖をコードするｐＲＫベクターＤＮＡを、発現のためにＨＥＫ２９３細胞に共トランスフェクトし、結果として得られるタンパク質を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ樹脂を使用して上清から精製した。

【０７８２】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体を、ルシフェラーゼレポーターを有する、ＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞（クローン２Ａ４　Ｊｕｒｋａｔ－ＯＸ４０－ｌｕｃ）を使用して、ＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。細胞を、９６ウェル組織培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．、カタログ番号３６０３）中の５０ｕＬのＡＩＭ－Ｖ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１２０５５－０９１）において、2×10^5細胞でＣｏｒｎｉｎｇ　９６ウェルプレート（カタログ番号３６０３）に播種した。抗ＯＸ４０抗体を、２Ｘ濃度でＡＩＭ－Ｖ培地に連続希釈し、５０ｕＬの希釈した抗体を各ウェルに添加し、５％CO_2で１６～１８時間、３７℃でインキュベートした。１００ｕＬのＢｒｉｇｈｔ　Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ２６１０）を添加し、室温で１０分間混合した。発光光度をＩｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ１０００　Ｐｒｏプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ）で検出した。上述の一次Ｔ細胞アッセイとは対照的に、このＪｕｒｋａｔレポーターアッセイは、ＦｃＲ＋Ｌ細胞との共インキュベートを

含まない。したがって、このアッセイにおけるアゴニスト活性は、任意の人工架橋の不在下で、抗体によって媒介された架橋のみを反映する。

【０７８３】

結果

データを図１５に示す。任意の架橋の不在下で、１Ａ７　ＩｇＧ１抗体は、ＯＸ４０受容体アゴニズムを媒介しなかった。四価の単一エピトープ構築物（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－３Ｃ８）は、中程度レベルの架橋依存活性を媒介した。最も強いレベルのアゴニスト活性は、四価の二重エピトープ構築物（ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８）によって媒介された。

【０７８４】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体を、ＣＤ３２ａを発現するＬ細胞を利用して、上述の一次Ｔ細胞アッセイを使用してＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。ヒトＩｇＧ１バージョンのＴ細胞増殖データを図１６に示す。Ｊｕｒｋａｔルシフェラーゼレポーターアッセイと一致して、二重エピトープバージョン（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）は、単一エピトープバージョン（１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８）の活性よりも実質的に大きい受容体活性化を促進する。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式のデータと共に、ｒ：ＦＡｂ－ＩｇＧの結果は、四価の関連において、２つのエピトープ（この実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８　ＯＸ４０エピトープ）を標的とする利益をさらに支持する。

【０７８５】

実施例６．組換えＦＡｂ－ＩｇＧ抗体の操作及び特徴付け

材料及び方法

１Ａ７及び３Ｃ８可変領域を含む単一エピトープ及び二重エピトープ組換えＦａｂ－ＩｇＧ（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ’ｓ）抗ＯＸ４０抗体を生成した。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体を、追加の重鎖Ｆａｂ領域（ＶＨ－ＣＨ１）Ｎ末端を天然重鎖Ｆａｂ（ＶＨ－ＣＨ１）領域に遺伝的に操作することによって構築した。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの四価の単一エピトープバージョンは、１Ａ７または３Ｃ８　Ｆａｂのいずれかをタンデムに構築し（すなわち、１Ａ７－１Ａ７または３Ｃ８－３Ｃ８）、それぞれ、１Ａ７または３Ｃ８軽鎖（ＶＬ－Ｃｋａｐｐａ）を共発現させることによって操作された。四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、天然ＩｇＧと同じように「２鎖系」である、すなわち、単一の重鎖と単一の軽鎖とが存在する。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの四価の二重エピトープバージョンは、重鎖／軽鎖対合を制御するために追加の操作を必要とする。二重エピトープバージョンは、１Ａ７及び３Ｃ８両方の軽鎖を有するタンデム重鎖（例えば、１Ａ７－３Ｃ８または３Ｃ８－１Ａ７）を共発現させ、「３鎖系」（１Ａ７－３Ｃ８配向については配列番号２４４～２４６、または３Ｃ８－１Ａ７配向については配列番号２４７～２４９）をもたらすことによって作製される。可変領域自体は適切な対合を確実にせず、したがって、垂直変異型は、国際公開第ＷＯ２０１６１７２４８５号に記載されるように、ＶＨ／ＶＬ及びＣＨ１／ＣＬ領域に組み込まれた。ＶＨ／ＶＬ領域は、変異型対ＶＨ－Ｑ３９Ｋ／ＶＬ－Ｑ３８ＥまたはＶＨ　Ｑ３９Ｅ／ＶＬ　Ｑ３８Ｋ（Ｋａｂａｔ番号付け）を利用し、ＣＨ１／ＣＬ領域は、変異型対－ＣＨ１－Ｓ１８３Ｅ／ＣＬ－Ｖ１３３ＫまたはＣＨ１－Ｓ１８３Ｋ／ＣＬ－Ｖ１３３Ｅ（ＥＵ番号付け）を利用した。適切な重鎖／軽鎖対合を指示するための他の企図される変異型には、ＣＨ１　Ａ１４１Ｉ、Ｆ１７０Ｓ、Ｓ１８１Ｍ、Ｓ１８３Ａ、Ｖ１８５Ａ、及びＣＬ　Ｆ１１６Ａ、Ｌ１３５Ｖ、Ｓ１７４Ａ、Ｓ１７６Ｆ、及びＴ１７８Ｖ（ＥＵ番号付け）が含まれる。従来の分子生物学法を用いて、抗体をｐＲＫベクターにおいて構築した。各ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの重鎖及び軽鎖（単一エピトープには１つの軽鎖［１Ａ７または３Ｃ８］、二重エピトープには２つの軽鎖［１Ａ７及び３Ｃ８］）をコードするｐＲＫベクターＤＮＡを、発現のためにＨＥＫ２９３細胞内に共トランスフェクトした。結果として得られるタンパク質を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ樹脂を使用して上清から精製した。

【０７８６】
最終精製ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体の質を、分析用サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱との組み合わせ（ＳＥＣ－ＭＡＬＳ）、ならびに質量分析法を用いて評価した。ＳＥＣ－ＭＡＬＳを、ＰＢＳ中のＸｂｒｉｄｇｅ　ＢＥＨカラムを使用して上述のように実行した。
【０７８７】
結果
二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョン３Ｃ８－１Ａ７及び１Ａ７－３Ｃ８の結果を、それぞれ、図１７及び図１８に示す。データ適合は、以下の最終半径及び分子量をもたらした：ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７は、７．６ｎｍのＲｈ（Ｑ）ｚ（ｎｍ）及びおよそ２３６ＫＤａのＭＷを有し、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８は、７．２ｎｍのＲｈ（Ｑ）ｚ及びおよそ２３３．３　ＫＤａのＭＷを有した。
【０７８８】
ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体を、上述のように、ルシフェラーゼレポーターを有する、ＯＸ４０発現Ｊｕｒｋａｔ細胞（２Ａ４　Ｊｕｒｋａｔ－ＯＸ４０－ｌｕｃ）を使用して、ＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。データを図１９に示す。四価の単一エピトープ構築物（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－３Ｃ８）は、架橋依存活性を媒介しなかった。対照的に、強いアゴニスト活性は、四価の二重エピトープ構築物（ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８）によって媒介された。
【０７８９】
ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体を、ＣＤ３２ａを発現するＬ細胞を利用して、上述の一次Ｔ細胞アッセイを使用してＯＸ４０受容体を作動するそれらの能力について試験した。ヒトＩｇＧ１バージョンのＴ細胞増殖データを図２０に示す。四価の単一エピトープバージョンは、活性を示さない（１Ａ７－１Ａ７）か、または軽度の活性（３Ｃ８－３Ｃ８）を示した。対照的に、またＪｕｒｋａｔルシフェラーゼレポーターアッセイと一致して、二重エピトープバージョン（１Ａ７－３Ｃ８及び３Ｃ８－１Ａ７）は、強い受容体活性化を促進した。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式、及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式のデータと共に、ｒ：ＦＡｂ－ＩｇＧの結果は、四価の関連において、２つのエピトープ（この実施例において、１Ａ７及び３Ｃ８　ＯＸ４０エピトープ）を標的とする利益をさらに支持する。
【０７９０】
実施例７．四価形式の大規模な産生
四価形式を、より深いインビトロ及びインビボ特徴付けのために大規模で発現させ、精製した。以下に記載の全ての新しい変異型のＤＮＡを、上述の遺伝子合成または変異生成を通してｐＲＫ哺乳類発現ベクターにおいて構築した。重鎖及び軽鎖ＤＮＡを、上述のように、発現のために２９３またはＣＨＯ細胞内に共トランスフェクトした。Ｆａｂをコードするｄｎａを大腸菌に発現させた。
【０７９１】
ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗ＯＸ４０抗体の精製
【０７９２】
採取したＣＨＯ培地を５ｍＬのＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、＃１７－５４３８－０１）上にローディングした。試料をローディングした後、カラムを、１０カラム容積（ＣＶ）のＴｒｉｓ緩衝液（２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、２ｍＭアジ化ナトリウム（NaN_3））、５ＣＶのＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４緩衝液（２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４、２ｍＭ　ＮａＮ３）、１０ＣＶのＴｒｉｓ緩衝液、２ＣＶのＫＰ洗浄緩衝液（０．４Ｍリン酸カリウム（ｐＨ７．０）、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０２％ポリソルベートＴｗｅｅｎ２０）、及び最後に１０ＣＶのＴｒｉｓ緩衝液で洗浄した。タンパク質を、５ＣＶの溶出緩衝

液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．０）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）で溶出し、すぐに１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ　８．０緩衝液で中和した。中和した溶出液を濃縮し、移動相としてアルギニン緩衝液（２００ｍＭアルギニン、１３７ｍＭコハク酸、１ｍＭ　NaN_3）を用いて、ＨｉＬｏａｄ　１６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、＃２８－９８３－３６）上で精製した。溶出した画分を１ｍＬの単位で収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した。最終溶出物のプールを濃縮し、２０ｍＭ酢酸ヒスチジン（ＨｉｓＯＡｃ）ｐＨ　５．５、２４０ｍＭスクロース、０．０２％ポリソルベートＴｗｅｅｎ２０中に製剤化した。

【０７９３】

ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧの産生

【０７９４】

ヒンジ－システイン－Ｆａｂ（Ｆａｂ－ＳＰＰＣ）をＥ．ｃｏｌｉに発現させ、前述のように精製した（Ｓｃｈｅｅｒ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｒｅｏｒｉｅｎｔｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｆａｂ　ｄｏｍａｉｎｓ　ｏｆ　ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ　ｒｅｓｕｌｔｓ　ｉｎ　ｐｏｔｅｎｔ　ＨＥＲ２　ａｃｔｉｖａｔｏｒｓ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　２０１２，７，ｅ５１８１７）。ＴＨＩＯＭＡＢ抗体をＣＨＯ細胞において組換えにより発現させ、前述のように精製した（Ｓａｄｏｗｓｋｙ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｔｏ　ｇｅｎｅｒａｔｅ　ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ－ａｎｄ　ｐｅｐｔｉｄｅ－ｐａｙｌｏａｄ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｔｏ　ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．２０１７）。

【０７９５】

ヒンジ－システイン－Ｆａｂをビス－マレイミド架橋剤で官能化した。新しいビス－マレイミド架橋剤（ＢＭＰＥＧ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，２２３３７）をＮ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｄ５５１１）中５０ｍＭの最終濃度に再構成した。次いで、精製したＦａｂ－ＳＰＰＣを、室温で２時間、１０モル当量のＢＭＰＥＧ（ｐＨ５．０）と反応させ、反応の進行を質量分析法により監視した。２時間のインキュベーション後、反応は完了し、過剰の架橋剤を、１０，０００　ＭＷＣＯ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心式フィルタユニット（ＵＦＣ９０１０９６，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて、コンジュゲーション緩衝液（２５ｍＭ酢酸ナトリウム（ＮａＯＡｃ）ｐＨ５．０、２ｍＭ　NaN_3）への単純な緩衝液交換により除去した。緩衝液交換後、最終官能化Ｆａｂ（Ｆａｂ－ＢＭＰＥＧ）を質量分析法を用いて分析した。

【０７９６】

ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧをコンジュゲートし、精製した。精製したＴＨＩＯＭＡＢ抗体（５ｍｇ／ｍＬ）を、５モル過剰のＦａｂ－ＢＭＰＥＧ（５ｍｇ／ｍＬ）と反応させた。反応混合物を、コンジュゲーション緩衝液で５．０の最終ｐＨに調整し、室温で２１時間インキュベートした。反応の進行を質量分析法を用いて監視した。２１時間のインキュベーション後、反応は完了し、反応混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）で精製した。簡潔に、試料を、１．５Ｍ硫酸アンモニウムで調整し、ＰｒｏＰａｃ（商標）ＨＩＣ－１０カラム（５μｍ、７．８ｍｍ×７５ｍｍ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，０６３６６５）上にローディングした。試料をローディングした後、カラムを５ＣＶのＨＩＣ緩衝液Ａ（５０ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ７．０）、１Ｍ硫酸アンモニウム）で洗浄し、６０ＣＶにわたって０％～８０％ＨＩＣ緩衝液Ｂ（５０ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ７．０）、２０％イソプロパノール）の直線勾配で溶出した。溶出した画分を収集し、製剤化前にＬＣ／ＭＳにより分析した。最終コンジュゲートを２０ｍＭ　ＨｉｓＯＡｃ　ｐＨ５．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液中に製剤化し、最終コンジュゲートの質をＬＣ／ＭＳ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及びＳＥＣを用いて評価した。

【０７９７】

ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧの産生

【０７９８】

ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ（ノブ－イントゥ－ホール）抗体を発現させ、精製した。ハーフ抗体を、前述のように発現させ、精製し、アニーリングして（Ａｔｗｅｌｌ，Ｓ．，Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．，Ｗｅｌｌｓ，Ｊ．ａ＆Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．Ｓｔａｂｌｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｓ ｆｒｏｍ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｍａｉｎ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｏｆ ａ ｈｏｍｏｄｉｍｅｒ ｕｓｉｎｇ ａ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９７，２７０，２６－３５）、ノブ－イントゥ－ホールＴＨＩＯＭＡＢ抗体（ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ）を形成した。アニーリングプロセスにより、ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ抗体上の操作されたシステインは遮断され、したがって、マレイミド架橋剤に対して未反応性であった。付加物を除去するために、ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ抗体を還元し、前述のように再酸化した（Ｓａｄｏｗｓｋｙ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｔｏ ｇｅｎｅｒａｔｅ ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ－ａｎｄ ｐｅｐｔｉｄｅ－ｐａｙｌｏａｄ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ＴＨＩＯＭＡＢ（商標）ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．２０１７）。最終脱保護ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ抗体をコンジュゲーション緩衝液中に製剤化し、４℃で貯蔵した。

【０７９９】

ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ抗体を結合した。脱保護ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ抗体を１０モル当量の新しく調製したＢＭＰＥＧ（ｐＨ５．０）（上記を参照されたい）と２時間反応させ、反応の進行を質量分析法により監視した。反応が完了した後、過剰の架橋剤をイオン交換クロマトグラフィー（ＩＥＸ）により除去した。簡潔に、反応混合物をＩＥＸ緩衝液Ａ（２５ｍＭ ＮａＯＡｃ ｐＨ５．０、２ｍＭ NaN_3）で１０倍希釈し、事前に平衡化したＨｉ－Ｔｒａｐ ＳＰＨＰ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，１７１１５２０１）カラム上にローディングした。試料をローディングした後、カラムを５ＣＶのＩＥＸ緩衝液Ａで洗浄し、ＩＥＸ緩衝液Ｂ（２５ｍＭ ＮａＯＡｃ ｐＨ５．０、１０００ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ NaN_3）で、１ＣＶにわたって０％～１００％の段階勾配で溶出した。画分を収集し、質量分析法により分析した。最終試料（ＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ＿ＢＭＰＥＧ）を５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、コンジュゲーション緩衝液中に製剤化した。

【０８００】

次いで、精製したＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨ＿ＢＭＰＥＧを、同じ緩衝液中の１．５モル過剰のＴｈｉｏＭａｂ＿ＫｉＨに添加して、結合ＩｇＧを形成した。反応混合物を室温で４８時間インキュベートし、反応の進行をＬＣ／ＭＳ分析で監視した。４８時間後、反応は完了し、先に述べたように混合物をＨＩＣで精製した。最終精製ＣＩｇＧを２０ｍＭ ＨｉｓＯＡｃ ｐＨ５．５、１５０ｍＭ ＮａＣｌ中に製剤化した。

【０８０１】

実施例８．四価の二重エピトープ抗体形式の内因性アゴニスト活性

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ抗体を、架橋の不在下でＴ細胞を活性化するそれらの能力について試験した。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ二重エピトープバージョン３Ｃ８－１Ａ７及び１Ａ７－３Ｃ８、ならびに単一エピトープバージョン１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８を操作し、上述のようにＬＡＬＡＰＧエフェクター減衰バージョンを用いて産生した。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧを、上述のように、ＦｃγＲＩＩａ＋Ｌ細胞（Ｌ細胞はＢ７－１を発現しなかった）を使用して、一次ヒトＴ細胞アッセイにおいて試験した。

【０８０２】

Ｔ細胞増殖データを図２１に示す。二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ ３Ｃ８－１Ａ７及び１Ａ７－３Ｃ８は、最高レベルの活性を示し、Ｆｃ媒介架橋に対する依存性を示さず、曲線は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧがＩｇＧ１またはＬＡＬＡＰＧに関わらず、実質的に同じに見えた。単一エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧバージョン１Ａ７－１Ａ７及び３Ｃ８－３Ｃ８

は、ＩｇＧ１　１Ａ７と比べて強化された活性を示したが、二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式と比べて弱い活性を示した。さらに、Ｆｃ媒介架橋の不在下で（右側のパネルのＬＡＬＡＰＧバージョン）、単一エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧは活性を示さなかった。同様の結果がヒトＩｇＧ１及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗ＯＸ４０抗体のヒトＩｇＧ１　ＬＡＬＡＰＧバージョン（データ示さず）から得られた。

【０８０３】

実施例９．単一エピトープ及び二重エピトープの四価形式の活性比較

４つ全ての四価形式を、上述のように、Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイにおいて試験した。記載のように、このアッセイにおけるアゴニスト活性は、任意の外因性架橋の不在下での、抗体の内因性活性を反映する。図２２及び図２３のデータは、単一エピトープ形式よりも四価の二重エピトープが明らかに優れていることを示す。さらに、このアッセイにおいて試験した二価の二重エピトープ１Ａ７／３Ｃ８抗体は、２つのエピトープを標的とする二価のＩｇＧ単独がアゴニスト活性に不十分であることを示す。最適な活性を提供する四価の関連において、２つのエピトープが標的である。

【０８０４】

四価の二重エピトープ形式を、Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイにおいて直接試験した。図２４のデータは、組換え二重エピトープ形式ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧがバイオコンジュゲート二重エピトープｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ形式と比べて大きい活性を提供することを示す。このアッセイにおいて、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７抗体は、他のｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式よりもわずかに優れていることを示した。

【０８０５】

実施例１０．抗体：ＯＸ４０複合体形成の測定

標的ＯＸ４０への結合の際に四価の単一エピトープ及び二重エピトープ抗体形式が高次（免疫）複合体を形成する能力を、サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱との組み合わせ（ＳＥＣ－ＭＡＬＳ）を用いて試験した。精製した抗体及びヒトＯＸ４０（Ｇ＆Ｐ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＦＣＬ２４７９）を、ＰＢＳ中様々なモル比で混合した。混合物をＷａｔｅｒｓ　ｘＢｒｄｉｇｅ　ＢＥＨ２００Ａ　ＳＥＣ　３．５ｕｍ（７．８×３００ｍｍ）カラムにかけ、Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ検出器ＤＡＷＮ　ＨＥＬＥＯＳ－ＩＩ多角度光散乱光度計及びＯｐｔｉｌａｂ　Ｔ－ｒＥＸ示差屈折率検出器に接続されたＡｇｉｌｅｎｔ　１２００　ＨＰＬＣにより分析した。

【０８０６】

図２５は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧのＳＥＣクロマトグラムを示す。サイズに正比例である溶出時間の大幅な早期シフトが、単一エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７と比べて二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８間で形成された複合体で観察された。同様の結果がｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式で得られ（データ示さず）、四価の二重エピトープ形式が四価の単一エピトープ形式よりも標的タンパク質を伴う大きい免疫複合体を形成することができることを示唆する。

【０８０７】

図２６は、これらの実験からのＭＡＬＳデータからの抗体／ＯＸ４０複合体の計算されたサイズを示す。データは、四価の単一エピトープ形式及び二価の二重エピトープ形式の両方と比べて、四価の二重エピトープ形式への標的結合によって形成されたより大きい免疫複合体をさらに支持する。これらのデータは、２よりも大きい力価の関連において、２つのエピトープを標的とすることから観察された優れたアゴニスト活性と一致する。

【０８０８】

実施例１１．マウスにおける四価の抗ＯＸ４０抗体の薬物動態（ＰＫ）

四価の抗体形式のＰＫを、Ｃ５７ＢＬ－６またはＣ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤ（重度の複合免疫不全）マウスにおいて試験した。このセクションに記載のマウスＰＫ研究は、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）によって承認された。試験した全ての抗体は、天然ヒトＩｇＧ１重定常鎖及びＣｋａｐｐａ軽定常鎖を含んだ。ＩｇＧ１　１Ａ７、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１

Ａ７－１Ａ７、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－１Ａ７、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７、及びｃＩｇＧ－ｃＩｇＧ　３Ｃ８－３Ｃ８抗体のＰＫは、免疫不全Ｃ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウスにおいて評価された。加えて、１Ａ７　ＩｇＧ１、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８、ｃＩｇＧ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８、及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８抗体のＰＫは、免疫適格Ｃ５７ＢＬ－６マウスにおいて評価された。抗ｇＤ　ＩｇＧ１抗体はアイソタイプ対照として含まれた。マウスＰＫ研究は、１０ｍｇ／ｋｇの抗ＯＸ４０抗体の単一静脈内（ｉ．ｖ）投与で行われ、ＰＫ分析のために投与後２１日目まで血清試料（ｎ＝３／時点／群）を様々な時点で収集した。

【０８０９】

比色検出システムを用いたサンドイッチＥＬＩＳＡを使用して、Ｃ５７ＢＬ－６またはＣ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウス血清中の抗ＯＸ４０　ｈｕＩｇＧ１抗体（ＩｇＧ１、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、またはｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ）及びアイソタイプ対照抗ｇＤ　ｈｕＩｇＧ１抗体を定量化した。マイクロタイタープレートをヒツジ抗ヒトＩｇＧでコーティングして、抗ＯＸ４０を捕捉した。希釈した試料、標準品、及び対照をプレートに添加し、インキュベートした。その後、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰを検出のために添加し、インキュベートした。ペルオキシダーゼ基質（テトラメチルベンジジン）を添加して呈色し、１Ｍリン酸を添加することによって反応を停止させた。検出吸光度については４５０ｎｍで、そして参照吸光度については６２０ｎｍでプレートを読み取った。試料濃度を、４パラメータのロジスティック曲線適合プログラムにデータを入力することによって決定した。アッセイの報告範囲は、０．１５６～２０ｎｇ／ｍＬの抗ＯＸ４０であった。最小試料希釈は１／１００であり、Ｃ５７ＢＬ－６マウス血清またはＣ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウス血清について１５．６ｎｇ／ｍＬの最小定量可能濃度をもたらした。

【０８１０】

図２７及び図２８に示されるように、ＩｇＧ１、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ１、及びｃＩｇＧ１を含む抗ＯＸ４０抗体形式は、Ｃ．Ｂ－１７　ＳＣＩＤマウスにおいて対照抗ｇＤ　ＩｇＧ１抗体と比較可能である同様のＰＫ特性を示した。全ての抗体形式は、静脈内投与後に双指数関数的減少を示し、短い分布相及び長い最終排出相を有する。ＩｇＧ１、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧのＰＫは一般に、Ｃ５７ＢＬ－６マウスにおいて、１０日目まで抗ｇＤ対照と比較可能であった（図２９）。１４及び２１日目のｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ１のＰＫにおける高い可変性は、抗薬物抗体の発達による可能性があり得る。ｃ：ＩｇＧ－ＩｇＧ曝露は、ＩｇＧ１と比較して、３日目までわずかに低いが、曝露における迅速な減少は、７日目から観察され、抗薬物抗体発達による可能性がある。

【０８１１】

実施例１２．ヒトＯＸ４０ノックイン（ｈＯＸ４０ｋｉ）マウスにおける薬力学的（ＰＤ）研究

抗ＯＸ４０抗体形式のインビボＰＤを、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）抗原による免疫化に応答してＴ細胞活性化を刺激するそれらの能力について試験した。０日目に、ヒトＯＸ４０ノックインマウス（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）に、マウス当たり総容積１００μＬに対して１：１の比率で、ＰＢＳまたはＣＦＡ　Ｈ３７　Ｒａ（ＢＤ　Ｄｉｆｃｏ；カタログ番号２３１１３１）に乳化した５０μｇのＩｍｊｅｃｔ　ｍｃＫＬＨ　Ｓｕｂｕｎｉｔｓ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ；カタログ番号７７６４９）を皮下（尾ベース）注射した。＋１日目に、動物を群に分け、１０ｍｇ／ｋｇの抗ヒトＯＸ４０抗体（全てのヒトＩｇＧ１重鎖定常領域）または対照として抗ｇＤヒトＩｇＧ１を静脈内投与した。抗ＫＬＨ　ＩｇＧ抗体の応答を定量化するために、＋１４日目に異なる群のマウスから採血し、血清抗ＫＬＨ　ＩｇＧレベルを、製造業者の

指示に従いＥＬＩＳＡキット（Ｌｉｆｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｃ；カタログ番号ＫＬＨＧ－１）により測定した。

【０８１２】

メモリー応答にアクセスするために、＋１６日目に、マウスに５０μｇの可溶性ＫＬＨを腹腔内に再投与し、再投与の４日後（＋２０日目）に所属リンパ節をプロファイルした。いくつかの実験では、＋２０日目にＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を所属リンパ節から精製し、ＷＴマウスからの精製したＣＤ１１ｃ$^{+}$脾臓ＤＣの存在下で、１０μｇ／ｍＬの可溶性ＫＬＨでインビトロで刺激した。２日後、上清を収集し、Ｌｕｍｉｎｅｘを使用してＩＦＮ－γ産生をアッセイした。統計の有意性は、スチューデントのＴ検定によって分析された。別途記載のない限り、データは平均±ＳＥＭを表し、ｐ＜０．０５は統計的に有意であると見なされた。

【０８１３】

図３０、図３１、及び図３２は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　１Ａ７－３Ｃ８を１Ａ７及び３Ｃ８のＩｇＧ１バージョンと比較する、ＫＬＨ免疫化ＰＤ実験からの結果を示す。四価の二重エピトープ抗体形式の優れたＣＤ４　Ｔ細拡張及び抗ＫＬＨ　ＩｇＧ応答（図３０）、ならびに所属リンパ節（ｄＬＮ）におけるＣＤ８　Ｔ細胞拡張及び総細胞拡張（図３１）。四価の二重エピトープ形式は、ＫＬＨでの精製したＣＤ４＋Ｔ細胞のエクスビボ再刺激後により多くのインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）も刺激した（図３２）。

【０８１４】

反復研究は、１Ａ７及び３Ｃ８抗体のＩｇＧ１バージョンと共に、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ、ｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧ、及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧの四価の二重エピトープ形式を直接比較した。図３３は、この実験からのデータを示す。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ及びｃ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞の拡張において明らかに優れていることを示し、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、より軽度のレベルのＴ細胞活性化を示す。総合すると、これらの結果は、四価の二重エピトープ抗体の優れたインビトロアゴニスト活性がインビボでのより大きなＴ細胞活性化につながることを明らかにする。

【０８１５】

実施例１３．四価抗体の抗腫瘍活性

四価抗体を、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈで生成された雌のヒトＯＸ４０（ＴＮＦＲＳＦ４）ノックインＣ５７ＢＬ／６Ｎマウス（ｈｕＯＸ４０．ｔｎｆｒｓｆ４．ｋｉ．Ｂ６Ｎ）の同系Ｅ．Ｇ７－ＯＶＡ（ＥＬ４発現ニワトリオボアルブミン（ＯＶＡ））リンパ腫の腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍活性について試験した。マウスに、１００マイクロリットルのＨＢＳＳ＋マトリゲル中の３百万個のＥ．Ｇ７－ＯＶＡ腫瘍細胞を右片側腹に皮下接種した。マウスの腫瘍を、それらが約２５０ｍｍ^{3}の平均腫瘍容積に達するまで（接種のおよそ５日後）成長させた。この時点で（０日目）、マウスを３つの群に集めた（全ての群に関して、ｎ＝１０）。抗ｇＤは、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質Ｄに結合し、陰性対照としての機能を果たす。抗体を滅菌ＰＢＳ中に希釈し、投与容積は１００ｕｌであった。１日目に、全ての群に１０ｍｇ／ｋｇの静脈内単回投与を与えた。試験した全ての抗体は、ヒトＩｇＧ１重鎖定常領域を含んだ。投与後２４時間時点で５匹のマウス／群／時点から血液を収集した。投与後６日目で他の５匹のマウス／群／から血液を収集した。イソフルラン誘導麻酔下（吸入で有効）で、血液を眼窩静脈叢採血により収集した（収集容積は１００ｕｌを超えなかった）。ＰＫ分析のために血液から血清を採取した。測定値及び体重を、２回／週で収集した。＞１５％の体重減少を示す動物を毎日量り、それらが＞２０％の体重を失った場合安楽死させた。有害な臨床問題を示す動物をより頻繁に、重症度に応じて最大で毎日観察し、瀕死の場合は安楽死させた。しかしながら、この研究におけるマウスは有害な臨床徴候を示さなかった。腫瘍容積が２，０００ｍｍ^{3}を超えた場合、マウスを安楽死させた。残りの腫瘍を、２回／週で測定し、量った。

【０８１６】

図３４は、実験からの腫瘍容積データを示す。四価の二重エピトープｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ３Ｃ８－１Ａ７は、天然ＩｇＧ１　１Ａ７のより軽度な活性と比べて優れた抗腫瘍活性

をもたらした。これらの結果は、この抗体形式のインビトロ及びインビボＰＤ活性の優位性と一致し、治療薬としてのｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ及び他の四価の二重エピトープ形式の有用性を示す。

【０８１７】

実施例１４．構造決定及びエピトープマッピング

抗ＯＸ４０リガンドＦａｂ及びＯＸ４０リガンドＥＣＤの発現及び精製

【０８１８】

抗ＯＸ４０リガンドの２つのＦａｂ断片を、以下のように同じ方法で発現させ、精製した。ＦａｂをＥ．ｃｏｌｉに発現させた。タンパク質を２段階で精製した。最初に、細胞溶解液上清をＧセファロースカラム上にローディングし、０．６％酢酸で溶出した。第２に、Ｆａｂ含有画分をプールし、ＳＰセファロースカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて精製した。ローディング緩衝液は、ｐＨ５．５の２－（Ｎ－モルフォリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）を含有し、タンパク質は、ＮａＣｌ勾配で溶出された。

【０８１９】

ヒトＯＸ４０リガンド細胞外ドメイン（ＥＣＤ、残基Ｌ２９～Ｄ１７０）を、エンドグリコシダーゼＨと共にＳＦ９昆虫細胞において共発現させた。ＯＸ４０リガンド含有培地を、遠心分離により細胞片から分離した。タンパク質を、最初に１０ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ（Ｑｉａｇｅｎ）カラムを用いて精製した。ＯＸ４０リガンドを、２０ｍＭ　ｔｒｉｓ（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）（ｐＨ８．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び３００ｍＭイミダゾールを含有する緩衝液で溶出した。ＯＸ４０リガンドを含有する画分をプールし、２０ｍＭ　４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸）（Ｈｅｐｅｓ）（ｐＨ７．２）及び２００ｍＭ　ＮａＣｌ中で平衡化されたＳ－７５カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により精製した。Ｎ末端ｈｉｓ－タグを、トロンビン（Ｓｉｇｍａ）と共に４℃で一晩インキュベートすることにより切断した。切断したＯＸ４０リガンドタンパク質を、１．０ｍＬのＮｉ－ＮＴＡセファロース（Ｑｉａｇｅｎ）カラムのフロースルー画分において収集し、上述の同じＳ－７５緩衝液中で平衡化されたＳ－７５カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）のＳＥＣによりさらに精製した。

【０８２０】

抗ＯＸ４０リガンドＦａｂ及び抗原複合体の生成及び結晶化

【０８２１】

等モル量のＯＸ４０　ＥＣＤ（ＰＵＲ＃１２４７２５）、１Ａ７抗ＯＸ４０リガンドＦａｂ（ＰＵＲ＃１１５８１０）、及び３Ｃ８抗ＯＸ４０リガンドＦａｂ（ＰＵＲ＃１０９６３９）を一緒に混合し、４℃で一晩インキュベートした。次いで、三元複合体を、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．５）及び０．１５Ｍ　ＮａＣｌ中で平衡化したＳ２００　１６／６０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のＳＥＣにより精製した。精製した複合体を、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ及び液体クロマトグラフィー質量分析法（ＬＣ－ＭＳ）により分析し、これにより、最終ＳＥＣステップの高分子量（ＨＭＷ）ピーク画分中の３つ全ての構成成分が明らかとなった。ＨＭＷピーク画分を、カットオフが１０，０００分子量のＶｉｖａｓｐｉｎ濃縮器を使用して、１０ｍｇ／ｍＬに濃縮した。

【０８２２】

結晶化試験は、９６ウェル形式の市販のスパースマトリックススクリーン（ｓｐａｒｓｅ　ｍａｔｒｉｘ　ｓｃｒｅｅｎｓ）を使用して、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。初期の結晶ヒットは、大半は高塩状態で観察された。追加のスクリーン（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）は、結晶回折の質を改善するために行われた。最終結晶化条件には、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．５）、１．５Ｍ　Ｄ－Ｌ　リンゴ酸（ｐＨ７．０）、及び０．１５ｍＭジメチルエチルアンモニウムプロパンスルホネート（別名、ＮＤＳＢ－１９５）が含まれた。結晶は、抗凍結剤緩衝液（リザーバ溶液に添加された２５％グリセロール）に短時間浸漬し、続いて液体窒素中に急浸漬することによって、データ収集のために保存された。

【０８２３】
Ｘ線回折データ収集及び構造決定
【０８２４】
三元複合体結晶の回折データセットを、Ｐｉｌａｔｕｓ－６Ｍ検出器を用いて、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｌｉｇｈｔ Ｓｏｕｒｃｅ（ＡＬＳ）ビームライン５．０．２で単色Ｘ線を使用して収集した。完全なデータセットのために、回転法を単一の結晶に適用した。プログラムＸＤＳ（Ｋａｂｓｃｈ Ｗ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ，２０１０，６６：１２５－１３２）を使用して、データを整理し、２．６Åでの最終統計を表１に示す。構造は、プログラムＰｈａｓｅｒを使用する分子置換（ＭＲ）によって解析した（ＭｃＣｏｙ Ａ．Ｊ．，Ｇｒｏｓｓｅ－Ｋｕｎｓｔｌｅｖｅ Ｒ．Ｗ．，Ａｄａｍｓ Ｐ．Ｄ．，ＭＷｉｎｎ．Ｄ．，Ｓｔｏｒｏｎｉ Ｌ．Ｃ．，Ｒｅａｄ Ｒ．Ｊ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ａｐｐｌｉｅｄ ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ ２００７，４０，６５８－６７４）。２つのＦａｂ断片の肘角度は、５°間隔で＋９０°～－１０°の範囲の様々な肘角度で一連のＦａｂ構造モデル（生成ベースのＰＤＢエントリー１ＦＶＤ）に対する回転検索により決定した。＋７０°及び０°の肘角度のモデルが最高のシグナル対ノイズ比（３ｘ）を示した。次いで、２つの最良の１ＦＶＤベースモデル（＋７０°、０°の肘角度）を使用して完全ＭＲ検索を行い、Ｆａｂの定常ドメイン（ＣＨ１及びＣＬ）を有した、前に決定したＯＸ４０ ＥＣＤ－３Ｃ８抗ＯＸ４０ ｆａｂ複合体構造（ＣＲＹ＃２１８２９）を除去した（Ｃｏｍｐａａｎ Ｄ．Ｍ．，Ｈｙｍｏｗｉｔｚ Ｓ．Ｇ．，Ｔｈｅ Ｃｒｙｓｔａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ ｃｏｍｐｌｅｘ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，２００６，１４（８）：１３２１－３０）。このＭＲ検索から三元複合体の解析が得られた。電子密度の検査は、０°の肘角度のＦａｂモデルが最良の解析をもたらすことを示し、１Ａ７のＦａｂに対応した。ＣＨ１及びＣＬドメインを適合させるために、３Ｃ８ ｆａｂに対する肘角度のさらなる調整が必要であった。正しい１Ａ７ Ｆａｂ配列を、我々は、グラフィックモデリングプログラムＣＯＯＴを使用して、初期の１ＦＶＤベースのＭＲ解析内に構築した（Ｅｍｓｌｅｙ，Ｐ．，Ｌｏｈｋａｍｐ，Ｂ．，Ｓｃｏｔｔ，Ｗ．Ｇ．＆ Ｃｏｗｔａｎ，Ｋ．Ｆｅａｔｕｒｅｓ ａｎｄ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｃｏｏｔ．Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６６，４８６－５０１（２０１０））。構造は、反復様式で、プログラムＰｈｅｎｉｘ（Ａｄａｍｓ，Ｐ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．ＰＨＥＮＩＸ：ａ ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｐｙｔｈｏｎ－ｂａｓｅｄ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎ．Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６６，２１３－２２１（２０１０））及びＢＵＳＴＥＲ（Ｄｓａｆａ Ｂｒｉｃｏｇｎｅ Ｇ．，Ｂｌａｎｃ Ｅ．，Ｂｒａｎｄｌ Ｍ．，Ｆｌｅｎｓｂｕｒｇ Ｃ．，Ｋｅｌｌｅｒ Ｐ．，Ｐａｃｉｏｒｅｋ Ｗ．，Ｒｏｖｅｒｓｉ Ｐ，Ｓｈａｒｆｆ Ａ．，Ｓｍａｒｔ Ｏ．Ｓ．，Ｖｏｎｒｈｅｉｎ Ｃ．，Ｗｏｍａｃｋ Ｔ．Ｏ．（２０１６）、ＢＵＳＴＥＲ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．１１．５．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ：Ｇｌｏｂａｌ Ｐｈａｓｉｎｇ Ｌｔｄ）を用い、ＣＯＯＴにおけるマニュアルによるモデル構築と組み合わせて（Ｅｍｓｌｅｙ，Ｐ．，Ｌｏｈｋａｍｐ，Ｂ．，Ｓｃｏｔｔ，Ｗ．Ｇ．＆ Ｃｏｗｔａｎ，Ｋ．Ｆｅａｔｕｒｅｓ ａｎｄ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｃｏｏｔ．Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６６，４８６－５０１（２０１０））、さらに精密化された。コンピュータによる精密化プロトコルには、最大尤度標的関数の最小化、異方性の個別Ｂ因子精密化、及びＴＬＳ精密化方法が含まれた。最終精密化統計値を表１に示す。
表１ データ収集及び精密化統計値

	抗ＯＸ４０　１Ａ７、３Ｃ８－ＯＸ４０　ＥＣＤ三元複合体	抗ＯＸ４０　３Ｃ８－ＯＸ４０　ＥＣＤ二元複合体
データ収集	ＡＬＳ　５．０．２	ＡＬＳ　５．０．２
空間群	Ｉ２２２	Ｐ４１２２
細胞寸法		
ａ，ｂ，ｃ（Å）	１０９．８，１２５．２，１９７．５	１１７．０，１１７．０，１１８．９
α，β，γ（°）	９０．０，９０．０，９０．０	９０．０，９０．０，９０．０
分解能（Å）	１０５．８－２．６１（２．７０－２．６１）＊	４２．０－２．１（２．１７－２．１）＊
R_{sym}またはR_{merge}	０．０９７（１．１３）	０．０６８（０．６９）
Ｉ／σＩ	１１．０８（１．５５）	２０．６（３．６５）
完全性（％）	１００（１００）	９９．９（９９．４）
冗長性	６．４（６．２）	１２．７（１２．４）
精密化		
分解能（Å）	１０５．８－２．６１	４２．０－２．１
反射数	４１７２１	４８６９５
R_{work}/R_{free}	２０．４／２５．７	２１．８／２４．２
原子数	７６９０	４３４１
タンパク質	７４７０	４０５３
リガンド／イオン	１４	０
水	２０６	２６８
Ｂ因子	６２．３	５５．９
タンパク質	６２．５	５５．５
リガンド／イオン	９３．１	
水	５２．９	６２．０
Ｒ．ｍ．ｓ偏差		
結合長さ（Å）	０．０１９	０．０１３
結合角度（°）	１．８４	１．８２

＊最高分解能シェルは括弧で示される。

【０８２５】

図３５は、ＯＸ４０に結合した１Ａ７及び３Ｃ８の２つのＦａｂの三元複合体の構造を示す。１Ａ７及び３Ｃ８は、ＯＸ４０受容体の正反対の領域上に結合する。構造における１Ａ７及び３Ｃ８　ＦａｂのＣ末端間の計算された距離は、約１２０Åである。対照的に、抗体ヒンジは、２つのＩｇＧ　ＦａｂアームのＣ末端を最大距離の約３５Åに制限する。この分析は、ＯＸ４０結合エピトープ及び結果として構造における２つのＦａｂの配向がＩｇＧ内ＯＸ４０結合を可能にしないことを示唆する。これは、単一のＯＸ４０受容体が２つの別個のｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ分子によって係合されるモデルをさらに示唆し、そのそれぞれが他のＯＸ４０受容体に結合する３つの他のＦｖを有する。結果は、理論上、免疫複合体化であろう。このモデルは、実施例１０に記載のＳＥＣ－ＭＡＬＳデータ、及び四価の二重エピトープ抗体の内因性アゴニスト活性と一致する。

【０８２６】

１Ａ７及び３Ｃ８抗体によって結合されたＯＸ４０エピトープは、三元複合体構造の視

覚的検査によって決定された。図３６は、１Ａ７（灰色のボックス）及び３Ｃ８（黒色の外枠ボックス）の結合エピトープを明らかにするヒトＯＸ４０の配列を示す。位置の番号付けは、ＵｎｉＰｒｏｔに列記されるものに従う（Ｔｈｅ ＵｎｉＰｒｏｔ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ，ＵｎｉＰｒｏｔ：ｔｈｅ ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｎｏｗｌｅｄｇｅｂａｓｅ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．４５：Ｄ１５８－Ｄ１６９（２０１７））。１Ａ７抗体は、ＯＸ４０残基１１４～１１９、１２４、１２６～１２７、１２９～１３０、１３２、１４０、及び１４２に結合する。３Ｃ８抗体は、ＯＸ４０残基６８～７１、８３～９０、９５、及び９８に結合する。本開示は、これらまたは重複するエピトープに結合する抗体がＯＸ４０受容体を作動するための四価の二重エピトープ形式を産生するための良好な対であり得ることを示唆するデータ及び構造／配列分析を提供する。

【０８２７】

実施例１５．抗ＯＸ４０抗体セットの拡張及びＯＸ４０エピトープ空間

抗体発見キャンペーンは、ＯＸ４０の四価の二重エピトープ標的のための抗体のセットを増大するために、及び他のＯＸ４０エピトープに対する適用範囲を拡張するために行われた。

【０８２８】

材料及び方法

【０８２９】

ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ ＭｅｄｉｕｍＡ（カタログ番号０３８０１）、Ｍｅｄｉｕｍ Ｂ（カタログ番号０３８０２）、Ｍｅｄｉｕｍ Ｃ（カタログ番号０３８０３）、及びＭｅｄｉｕｍ Ｅ（カタログ番号０３８０５）は、ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからである。電気融合に使用されるＣｙｔｏｆｕｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｃ（カタログ番号ＬＣＭ－Ｃ）は、Ｃｙｔｏ Ｐｕｌｓｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓからである。表面ＩｇＧを発現するＳＰ２ａｂ融合パートナーは、Ｅｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ（（ＥＮＺ－７０００８－０００１）からであり、ヤギ抗ラットＩｇＧ Ｆｃ－ＨＲＰコンジュゲート抗体は、Ｂｅｔｈｙｌ（Ａ１１０－２３６Ｐ）からである。ＴＭＢ ｏｎｅ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ＨＲＰ ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（カタログ番号ＴＭＢＷ－１０００－０１）及びＴＭＢ ｓｔｏｐ ｒｅａｇｅｎｔ（カタログ番号ＢＳＴＰ－１０００－０１）は、ＢｉｏＦｘ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓからである。

【０８３０】

スプラーグドーリーラットを、５０ｕｇのヒト及びｃｙｎｏ ＯＸ４０抗原で１回刺激し、続いて各ラットにＣＦＡ／ＩＦＡアジュバントを使用して２５ｕｇを注射し、合計６回のブーストが１週間間隔で行われた。最後の前融合ブーストの３日後、免疫化されたマウスからのリンパ球を採取した。

【０８３１】

Ｃｙｔｏ Ｐｕｌｓｅ ＣＥＥＦ－５０装置（Ｃｙｔｏ Ｐｕｌｓｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、単離したラットのリンパ球をＳＰ２ａｂ骨髄腫細胞と融合させた。簡潔に、Ｂ細胞富化及びＩｇＭ＋ラットＢ細胞枯渇後、単離したＩｇＭ－ラットＢ細胞及びＳＰ２ａｂ細胞を１：１比で混合し、その後、Ｃｙｔｏｆｕｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｃ中に１０００万細胞／ｍＬで再懸濁し、製造業者のガイダンスに従い、電気融合を行った。融合した細胞を、７％CO_2インキュベータ内で、ＨＡＴ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎを含むＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｍｅｄｉｕｍ Ｃ中、３７℃で一晩培養した。６日間の培養後、融合した細胞をヤギ抗ラットＩｇＧ－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（Ｊａｃｋｓｏｎ １１２－６０６－０７１）で３０分間染色し、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、その後、単一のラットＩｇＧ＋ハイブリドーマ細胞を、ＦＡＣＳＡｒｉａにより、２００μＬ／ウェルのＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｍｅｄｉｕｍ Ｅを含む９６ウェル細胞培養プレート（＃３５３０７５，Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）内に選別した。７日間の培養後、ハイブリドーマ上清をＥＬＩＳＡによりスクリーニングし、ヒト及びｃｙｎｏ ＯＸ４０の両方に対する全てのＥＬＩＳＡ陽性ハイブリドーマクローンを

、新しい９６ウェル細胞培養プレートに集めた。
【０８３２】
ＥＬＩＳＡアッセイを以下のように行った。９６ウェルマイクロタイターＥＬＩＳＡプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を、０．０５Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ９．６）中１μｇ／ｍｌで、１００μＬ／ウェルのヒト／ｃｙｎｏ ＯＸ４０のいずれかで、４℃で一晩コーティングした。洗浄緩衝液（ＰＢＳ中０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０、Ｓｉｇｍａ）で３回洗浄した後、プレートを、ＢＳＡを含む２００μＬのＥＬＩＳＡアッセイ希釈剤で遮断した。１００μＬの培養上清または希釈した精製ｍＡｂを添加し、室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、ＨＲＰコンジュゲートヤギ抗ラットＩｇＧ Ｆｃと１時間インキュベートした。３回洗浄した後、結合した酵素を、１００μＬ／ウェルのＴＭＢ基質（ＢｉｏＦＸ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＭＤ，ＵＳＡ）を５分間添加することによって検出した。１００μＬ／ウェルのｓｔｏｐ ｒｅａｇｅｎｔ（ＢｉｏＦＸ，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＭＤ，ＵＳＡ）を添加することによって反応を停止させ、$A_{630\ nm}$で色検出した。
【０８３３】
ｈｕＯＸ４０を過剰発現するＪｕｒｋａｔ細胞を、１％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するリン酸緩衝液食塩水（ＰＢＳ）で２回洗浄し、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液（１％ＦＢＳを含有するＰＢＳ）中に5×10^{6}細胞／ｍｌの最終濃度に再懸濁した。１００μｌの細胞を、Ｕ底９６ウェル組織培養プレート（＃３５３０７７，Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）の各ウェルに添加し、精製したｍＡｂを添加し、３０分後に氷上でインキュベートし、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、３０分間、１：４００希釈でヤギ抗ラットＩｇＧ－Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂ，１１２－６０６－０７１）で連続処理した。ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄した後、染色した細胞を、ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して分析し、フローサイトメトリーのデータをＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ Ｓｔａｒ，Ｉｎｃ．）を用いて分析した。
【０８３４】
ハイブリドーマ上清を、プロテインＡ親和性クロマトグラフィーにより精製し、次いで、滅菌濾過し（０．２μｍ孔径、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，ＮＹ，ＵＳＡ）、ＰＢＳ中に４℃で貯蔵した。機能アッセイでさらに試験する前に、精製したｍＡｂをＥＬＩＳＡにより確認した。
【０８３５】
エピトープビンは、以下のように、９６×９６アレイベースのＳＰＲ撮像システム（Ｃａｒｔｅｒｒａ ＵＳＡ）により決定された。精製したラット抗ＯＸ４０抗体を、１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ４．５）（Ｗａｓａｔｃｈ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，ＣＢＮａＯＡｃ－ｐＨ４．５－０．１Ｌ）中に１０ｕｇ／ｍｌで希釈した。アミン結合を使用して、抗体を、Ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ Ｆｌｏｗ Ｍｉｃｒｏｓｐｏｔｔｅｒ（Ｃａｒｔｅｒｒａ，ＵＳＡ）を使用してＳＰＲ ｓｅｎｓｏｒｐｒｉｓｍ ＣＭＤ ２００Ｍチップ（ＸａｎＴｅｃ Ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）上に直接固定化し、９６の抗体のアレイを作製した。
【０８３６】
抗体ビニングについて、印刷したチップをＩＢＩＳ ＭＸ９６ ＳＰＲｉ（Ｃａｒｔｅｒｒａ ＵＳＡ）上にローディングし、ＨＢＳ－Ｐ緩衝液中５０ｎＭに希釈したヒトＯＸ４０タンパク質を、２５℃で４分にわたってチップ上に注入し、続いて、４分間にわたって、ＨＢＳ－Ｐ緩衝液（ＧＥ，ＢＲ－１００６－７１）中に１０ｕｇ／ｍｌで希釈した、精製した抗体の２回目の注入を行った。エピトープのビニングデータを、Ｗａｓａｔｃｈビニングソフトウェアツールを用いて処理した。
【０８３７】
抗体動力学について、抗体を上述のように固定化し、ＨＢＳ－Ｐ緩衝液中３００ｎＭ、１００ｎＭ、３３．３ｎＭ、１１．１ｎＭ～３．７ｎＭの連続希釈したヒトまたはｃｙｎ

ｏ　ＯＸ４０タンパク質をチップ上に注入し、２５℃で、３分間会合させ、１０分間解離させた。動力学データを、Ｓｃｒｕｂｂｅｒソフトウェア（ＢｉｏＬｏｇｉｃ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて処理した。

【０８３８】

結果

【０８３９】

３１８のハイブリドーマ産生ラット抗ＯＸ４０抗体を、エピトープビン、溶液中のＯＸ４０の親和性、細胞表面ＯＸ４０への結合、ならびに単独及び抗Ｆｃ抗体と架橋されたときの機能活性について特徴付けた。外因的に架橋されたとき、多くの抗体がＯＸ４０のアゴニズムを促進したが、３１８の抗体のいずれもそれら自体で内因性アゴニズムを媒介しなかった（データ示さず）。ビニング、親和性及び結合、ならびに活性データに基づいて、抗体を、ハイブリドーマからヒトＩｇＧ１重鎖及びヒトＣｋａｐｐａ軽鎖を有するキメララットＶＨ及びＶＬドメイン内にクローニングした。抗体は、上述のようにＨＥＫ２９３細胞において発現され、精製された。

【０８４０】

表２は、上述のようにアレイベースのＳＰＲ撮像システム（Ｃａｒｔｅｒｒａ　ＵＳＡ，Ｗａｓａｔｃｈ　Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）を使用して測定された、キメラＩｇＧ１抗ＯＸ４０抗体のうちの３４のエピトープビン及び平衡解離定数（ＫＤ）を要約する。表２は、抗体を捕捉し、分析物ＯＸ４０に対するビニングを試験することによってＢｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて測定された１Ａ７及び３Ｃ８　ＩｇＧ１抗体の親和性も示す。

表２．ＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧとしての拡張した抗ＯＸ４０抗体セットの特性

ＩｇＧ形式			ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式		
抗体	ビン	ＫＤ（ｎＭ）	対	ＫＤ（ｎＭ）	最大活性（ＲＬＵ）
１Ａ７	１Ａ７	０．１５			
３Ｃ８	３Ｃ８	１．２	３Ｃ８－１Ａ７	０．２３	１８５０
２Ａ９	８	１．９６	２Ａ９－１Ａ７	０．２３	１４２１
２Ｂ４	９	１２９．３	２Ｂ４－１Ａ７	０．９１	４２０
２Ｂ５	１１	１６．５	２Ｂ５－１Ａ７	０．３１	１６００
２Ｄ８	１１	０．９１２	２Ｄ８－１Ａ７	０．３５	１５５５
２Ｇ７	１０	１．７９	２Ｇ７－１Ａ７	０．２７	１４７３
３Ｆ５	１１	１４．６７	３Ｆ５－１Ａ７	０．３５	１３９２
３Ｇ５	１０	２２．５８	３Ｇ５－１Ａ７	０．５９	１７３５
３Ｇ８	１１	１８．１５		０．６６	
２Ｃ７	６	５０			
２Ａ２	２	５．５０６			
２Ｆ１０	１０	５．８２８			
２Ｅ１２	４	０．０１			
２Ｄ５	１０	ＮＤ			
２Ｂ１２	２	７．２６６			
３Ｃ２	２	２．３９９			
３Ｂ１	２	５．９５			
２Ｃ１０	５	０．７６３			
２Ｂ７	ＮＤ	ＮＤ			
２Ｆ６	２	３０．３１			
２Ｅ４	２	０．０９１			
３Ｅ１０	２	２．１４６			
２Ｈ５	５	０．４９３			
２Ａ３	５	５．５２			
３Ａ１２	ＮＤ	ＮＤ			
２Ｃ９	１０	５．１５			
２Ｄ１０	ＮＤ	ＮＤ			
３Ｈ１２	ＮＤ	ＮＤ			
２Ｄ３	４	０．２４１			
３Ｈ４	ＮＤ	ＮＤ			
３Ｄ１２	ＮＤ	５．８５５			
３Ｄ１	２	ＮＤ			
２Ｅ１	２	６．６２５			
２Ｈ１	４	５３			
２Ａ６	７	２８８．５			

【０８４１】

２７の主抗体を、非１Ａ７エピトープビン（すなわち、１Ａ７のＯＸ４０への結合を遮

断しない抗体）から選択し、１Ａ７可変領域と対合されたｒ：Ｆｖ－ＩｇＧとして構築した。上述のように、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　ＤＮＡを構築し、タンパク質を発現させ、精製した。最初の８つのｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの結合親和性は、上述のように、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）技術によって測定した。表２は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧのＯＸ４０結合親和性（ＫＤ）を示す。これらの抗体の最初の８つのＩｇＧ及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧバージョンを、ＯＸ４０＋Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼアッセイにおいて、ＯＸ４０受容体を作動する能力について試験した（図３７）。予想通り、新しい抗体のいずれも外因性架橋の不在下で、ＩｇＧとしてアゴニスト活性を媒介しない（左側のグラフ）。対照的に、抗体可変領域のうちの１つを除く全てが、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式の１Ａ７可変領域と対合されたとき、ＯＸ４０アゴニズムを促進する（右側のグラフ）。例外は、１Ａ７と対合されたとき、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの関連において、活性を媒介しなかった２Ｂ４抗体である。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの最大活性を表２に提供する。

【０８４２】

実施例１６．ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧの操作されたリンカー変異型

本開示の抗体形式の重要な要素は、免疫グロブリンドメインを接続するためのリンカーの使用である。変異型リンカーを有する一連のｒ：Ｆｖ－ＩｇＧが設計された。第１のセットのリンカーは、セリン、グリシン、またはセリン及びグリシンを実質的に含む配列を含んだ。セリン及びグリシンは、それらの柔軟性及び好ましい溶液特性により、通常リンカーとして使用される。第２のセットのリンカーは、天然の抗体配列を実質的に含む配列を含んだ。これらのリンカーにおいて、抗体配列を構成する天然の配列は、リンカーとして使用される。２つの特に有用な天然の抗体配列は、ＶＨ１とＣＨ１ドメインとの間の肘に存在する重鎖配列、及びＶＬとＣＬドメインとの間の肘に存在する軽鎖配列である。天然抗体配列リンカーの有用性は、それらが四価の抗体形式内のある非天然配列を低減するために使用され得ることである。所与のリンカーの長さは、１つの残基～２０以上の残基まで様々であり得る。典型的には、長さがより長ければ、連結された免疫グロブリンドメイン間により大きな柔軟性が提供される。表３は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７の四価の二重エピトープ形式内に操作されたリンカーを説明する。

表３．リンカーの説明

名称	重鎖リンカー（ＬＨ）	ＬＨ配列番号	軽鎖リンカー（ＬＬ）	ＬＬ配列番号
グリシン／セリンリンカー				
ＧＳ（短い）	ＧＧＧＧＳＧ	２７０	ＧＧＳＧＧ	２７１
ＧＳ（中間）	ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ	２７２	ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ	２７２
ＧＳ（長い）	ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ	２７３	ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳ	２７４
天然の抗体配列リンカー				
肘（短い）	ＡＳＴＫＧＰ	２７５	ＲＴＶＡＡＰ	２７６
肘（長い）	ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ	２７７	ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ	２７８

【０８４３】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８／１Ａ７の可変リンカーをコードするＤＮＡを上述のように構築し、タンパク質を上述のようにＨＥＫ２９３細胞に発現させ、精製した。ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧを、上述のように、初代ヒトＴ細胞及びＪｕｒｋａｔレポーターアッセイの両方においてＯＸ４０アゴニスト活性について試験した。図３８のデータは、グリシン－セリン

リンカーがＪｕｒｋａｔレポーターアッセイにおいて、天然の抗体肘リンカーと比べてわずかに強化されたＯＸ４０のアゴニズムをもたらしたが、データは、全ての操作されたリンカーが、ＯＸ４０受容体のアゴニズムを可能にするｒ：Ｆｖ－ＩｇＧのＦｖとＩｇＧ部分との間に有効なリンクを提供することを明らかにすることを示す。

【０８４４】

実施例１７．四価形式の親和性操作

１Ａ７及び３Ｃ８両方の可変領域の変異型は、個々のＯＸ４０結合構成成分の親和性に対する四価の二重エピトープ形式のアゴニスト活性の依存性を探求するために操作された。親和性操作アプローチは、ファージディスプレイ及び次世代シーケンシング（ＮＧＳ）と組み合わせたＮＮＫ－ｗａｌｋライブラリ生成を活用した（Ｋｏｅｎｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２０１５，２９０（３６）：２１７７３－２１７８６により完全に記載される）。

【０８４５】

１Ａ７及び３Ｃ８の可変ドメインＮＮＫ－Ｗａｌｋライブラリを設計及び構築した。１Ａ７及び３Ｃ８ Ｆａｂをファージミド構築物内にサブクローニングした。多様な１Ａ７ ＶＨ残基は、２８～３５、４９～６５、９３～１０２であり、ＶＬ残基は、２８～３４、５０～５６、９１～９６であった。多様な３Ｃ８ ＶＨ残基は、２８～３５、５０～６５、９５～９７であり、ＶＬ残基は、２８～３４、５０～５６、８９～９６であった。ファージミド構築物における多様な残基は、ＮＮＫ ｗａｌｋによりランダム化され、それぞれ、ランダム化を標的とする１つの位置にＮＮＫコドンを有する。ＮＮＫは２０個全てのアミノ酸をコードする（等しい割合で、ｎ＝Ｇ、Ａ、Ｔ、及びＣ；Ｋ＝Ｇ及びＴ）。各変異生成反応の鋳型は、各反応において、ランダム化を標的とする位置の全てに停止コドン（ＴＡＡ）を導入することによって生成された。ＶＨ及びＶＬライブラリは、変異生成反応からのＤＮＡ産物のプールをＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＸＬ１細胞内に電気穿孔し、約10^9の形質転換体を得ることによって別個に生成された。

【０８４６】

１Ａ７及び３Ｃ８ライブラリをコードするファージは、組換えＯＸ４０タンパク質に対してパンニングされた。ＯＸ４０結合クローンは、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートを使用して選択された。ファージディスプレイライブラリを、１回目として５ｕｇ／ｍｌプレート結合ＯＸ４０と共にインキュベートし、続いて、ストレプトアビジンコーティングされたプレート上で、５０、１０、２、０．５、０．１ｎＭ、及び０．１ｎＭビオチニル化＋１００ｎＭ非ビオチニル化で数回の溶液結合ＯＸ４０選択を行った。各実行からの結合ファージを洗浄し、１００ｍＭ ＨＣｌで２０分間溶出し、次いで、１／１０容積の１Ｍ Ｔｒｉｓ（ｐＨ１１．０）で中和し、増殖及び次回の選択のためにＥ．ｃｏｌｉを感染させるために使用した。ファージ力価を各実行で監視した。パンニングは、富化が観察されなかった実行で停止した。前の実行からの細菌ペレットからＤＮＡを抽出した。

【０８４７】

パンニング後の富化したＮＮＫ ｗａｌｋライブラリを詳細に配列決定した。未選択及び選択した両方の１Ａ７及び３Ｃ８ ＮＮＫライブラリからのＥ．ｃｏｌｉ ＸＬＩ細胞からファージミドＤＮＡを単離し、Ｐｈｕｓｉｏｎ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）を使用するＶＬ及びＶＨ領域のＰＣＲ増幅に使用した。ＴｒｕＳｅｑ Ｎａｎｏ ＤＮＡライブラリ調製キット（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を用いて、ＰＣＲ産物を精製してライブラリを生成した。固有のバーコードを有する多重アダプタライゲートされたライブラリを、３００－ｂｐペアエンドシーケンシングのためにＩｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑシーケンシングシステムで配列決定した。富化分析の配列は、それぞれ、１Ａ７及び３Ｃ８に関して、０．１ｎＭ及び０．５ｎＭビオチン化ヒトＯＸ４０におけるパンニングからであった。

【０８４８】

ＮＧＳ結果の分析について、アンプリコンのサイズが３００ｂｐよりも大きかった場合、配列決定の読み取りはＲ１／Ｒ２読み取りに分けられた。その場合、完全なアンプリコ

ンを再構築するために、ＦＬＡＳＨプログラム［Ｍａｇｏｃ，Ｔ．＆　Ｓａｌｚｂｅｒｇ，Ｓ．Ｌ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２０１１］を用いて統合ステップを行った。各再構築した完全なアンプリコンについて、変異領域に隣接するヌクレオチド配列（それぞれ９ｂｐの長さ）を使用して、変異部分の配列を位置特定し、抽出した。抽出した配列を、望ましくないインデル配列をスクリーニングするために既知の鋳型の長さと照らし合わせた。残りの配列をアミノ酸に変換し、研究者の必要性に応じてさらにフィルタをかけることが可能であった。（すなわち、１つの変異のみを有する抽出した配列のみを維持するか、または既知の未変異位置に変異を有する抽出した配列を破棄する）。スクリーニングし、基準（すなわち、上に列記したもの）を満たしたアミノ酸配列を維持した後、これらの配列を、それらの固有のアミノ酸配列に基づいて計数した。次いで、ある特定のカットオフより上のアミノ酸配列のみ（すなわち、標準＞２計数またはＶｉｖｉａｎ’ｓ＞２０計数）を使用して、望ましくないアミノ酸配列をさらに破棄した。次いで、これらの「きれいにした」アミノ酸配列を使用して、変異部分におけるアミノ酸の頻度のＬｏｇ２比を計算する。特に、各位置の２０の残基のそれぞれの頻度は、事前パンニングされたライブラリ及びパンニング後のライブラリの「きれいにした」アミノ酸配列から決定された。事前パンニングされたライブラリは時折、一番初期のライブラリによる主なサンプリング不足の問題を考慮して、１回目のパンニングされたライブラリであった。その後、ｌｏｇ２は、パンニング後ライブラリ対事前パンニングライブラリの度数比を導いた。少なくとも４～５（すなわち、＞＝１６ｘ－３２ｘ富化）のＬｏｇ２比は、実際の富化と考えられた。

【０８４９】

ＮＮＫ　ｗａｌｋファージパンニングＮＧＳ結果に基づいて、置換は、１Ａ７及び及び３Ｃ８可変領域の親和性を増加及び低減する両方を行うように選択された。重鎖（ヒトＩｇＧ１定常領域）及び軽鎖（Ｃｋａｐｐａ定常領域）変異型をコードするＤＮＡを上述のように構築し、上述のように抗体をＨＥＫ２９３細胞に発現させ、精製した。変異型のＯＸ４０への結合を、上述のように、Ｂｉａｃｏｒｅを使用して試験した。表４及び表５は、生成及び試験された全ての変異型の変異型の名称、置換（複数可）、及びＯＸ４０親和性（ＫＤ）を表す。全ての置換の位置は、Ｋａｂａｔ慣例に従い番号付けされる。

表４．１Ａ７親和性変異型

変異型	別名	置換（複数可）	ＫＤ（Ｍ）
１Ａ７	１Ａ７	ＷＴ	１．４０Ｅ－１０
１Ａ７．ＨＣ．Ｔ２８Ｅ		Ｔ２８Ｅ	１．３６Ｅ－１０
１Ａ７．ＬＣ．Ｎ３１Ｑ		Ｎ３１Ｑ	１．００Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００１		Ｓ３２Ｈ；Ｎ５４Ｑ；Ｖ１０２Ｙ	３．４６Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００３		Ｔ３０Ｆ；Ｎ５４Ｌ；Ｌ９４Ｈ	５．８４Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００４		Ｍ３４Ｌ；Ｎ６０Ｑ；Ｓ１０１Ａ	２．２６Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００５		Ｔ３０Ｉ；Ｅ６５Ｓ	２．３９Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００６		Ｓ３２Ａ；Ｖ９３Ｓ	２．３２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００７		Ｔ３０Ｇ；Ｄ５６Ｅ	２．７６Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００８		Ｄ３１Ｒ；Ｄ５３Ｙ；Ｌ９４Ｆ	４．９２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．００９		Ｋ６２Ｖ；Ｖ１０２Ｒ	１．３３Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０１０		Ｆ２９Ｌ；Ｓ５８Ｌ；Ｓ１０１Ｖ	２．２１Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０１		Ｔ２８Ｓ	１．８９Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０２		Ｔ３０Ｅ	２．１７Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０３		Ｔ３０Ｑ	１．６５Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ．０４		Ｄ３１Ｅ	２．４２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０５		Ｓ３２Ｑ	１．０７Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ．０６		Ｓ３２Ｔ	３．６８Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０７		Ｙ３３Ｌ	５．０８Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ．０８		Ｙ３３Ｐ	１．９８Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．０９		Ｍ３４Ｉ	５．８３Ｅ－１１
１Ａ７ＶＨ．１０		Ｍ３４Ｓ	５．８４Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１２		Ｎ５４Ｑ	２．５２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１３		Ｇ５５Ｐ	３．３８Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１４		Ｇ５５Ｑ	２．０５Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１５		Ｄ５６Ｅ	１．２７Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１６		Ｄ５６Ｎ	４．９５Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１７		Ｓ５７Ａ	１．３７Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１８		Ｓ５７Ｎ	３．９３Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．１９		Ｓ５８Ｑ	２．２１Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２０		Ｎ６０Ｔ	１．４６Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２１		Ｆ６３Ｓ	１．８４Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２２		Ｒ６４Ｎ	１．９６Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２３		Ｅ６５Ｑ	１．０２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２４		Ｖ９３Ｉ	１．８４Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２５		Ｌ９４Ｆ	１．５７Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２６		Ｌ９４Ｉ	１．６２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２７		Ｌ９４Ｙ	４．４９Ｅ－１０

１Ａ７ＶＨ．２８		Ａ９５Ｔ	３．３８Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．２９		Ｒ９７Ｓ	２．８３Ｅ－０８
１Ａ７ＶＨ．３０		Ｗ９８Ｆ	８．７８Ｅ－１１
１Ａ７ＶＨ．３１		Ｗ９８Ｌ	２．９１Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ．３２		Ｗ９８Ｎ	４．０４Ｅ－０８
１Ａ７ＶＨ．３３		Ｗ９８Ｙ	５．１９Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．３４		Ｙ１９９Ｎ	３．６３Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．３５		Ｆ１００Ａ	２．８７Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ．３６		Ｓ１０１Ｎ	１．５２Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．３７		Ｖ１０２Ａ	１．６８Ｅ－１０
１Ａ７ＶＨ．３８		Ｖ１０２Ｑ	１．９５Ｅ－１０
	１Ａ７（低）	Ｐ９６Ａ	４．８９Ｅ－０９
１Ａ７ＶＨ０９／ＶＬ１９	１Ａ７（高）	Ｍ３４Ｉ／Ｒ５３Ｙ	９．００Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ００１		Ｓ３０Ｌ；Ｌ５４Ｉ；Ｌ９４Ｅ	６．１２Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ００２		Ｎ３１Ｍ；Ｓ５６Ａ；Ｐ９６Ｖ	３．０３Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００３		Ｙ３２Ｆ；Ｌ５４Ａ；Ｌ９４Ｓ	１．６０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００４		Ｓ３０Ｇ；Ｓ５２Ｉ；Ｈ９２Ｑ	１．７４Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００５		Ｌ３３Ｉ；Ｓ５６Ｖ	１．４８Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００６		Ｓ５６Ｍ；Ｐ９６Ａ	３．７６Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００７		Ｎ３１Ｓ；Ｌ５４Ｓ；Ｌ９４Ｓ	１．２２Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００８		Ｄ２８Ｓ；Ｌ５４Ｎ；Ｔ９３Ｇ	３．７３Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ００９		Ｓ３０Ｇ；Ｒ５３Ａ；Ｔ９３Ｇ	１．３８Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０１０		Ｎ３１Ｌ；Ｌ５４Ｓ；Ｔ９３Ｓ	１．０６Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０１		Ｄ２８Ｅ	１．０７Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０２		Ｄ２８Ｑ	１．８１Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０３		Ｉ２９Ｎ	３．３１Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０４		Ｉ２９Ｑ	６．５２Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０５		Ｓ３０Ｄ	１．３９Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０６		Ｓ３０Ｇ	１．４６Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０７		Ｓ３０Ｎ	９．５８Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ０８		Ｎ３１Ｅ	１．１９Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ０９		Ｙ３２Ａ	３．３３Ｅ－０８
１Ａ７－ＶＬ１０		Ｌ３３Ａ	１．６６Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ１１		Ｌ３３Ｉ	１．３０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ１２		Ｎ３４Ｓ	１．９０Ｅ－０９
１Ａ７－ＶＬ１３		Ｙ５０Ａ	３．２０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ１４		Ｙ５０Ｑ	２．５３Ｅ－０９
１Ａ７－ＶＬ１５		Ｔ５１Ｇ	１．４０Ｅ－１０

１Ａ７－ＶＬ１６		Ｓ５２Ｄ	１．２０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ１７		Ｒ５３Ｆ	７．７５Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ１８		Ｒ５３Ｎ	９．３４Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ１９		Ｒ５３Ｙ	４．８０Ｅ－１１
１Ａ７－ＶＬ２０		Ｌ５４Ｉ	１．５７Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２１		Ｇ９１Ｅ	１．８６Ｅ－０９
１Ａ７－ＶＬ２３		Ｈ９２Ｎ	２．４７Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２４		Ｌ９４Ｉ	１．６０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２５		Ｌ９４Ｎ	１．３８Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２６		Ｌ９４Ｑ	１．３９Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２７		Ｐ９５Ａ	１．３０Ｅ－１０
１Ａ７－ＶＬ２８		Ｐ９６Ｓ	４．０６Ｅ－１０

表５．３Ｃ８親和性変異型

変異型	別名	置換（複数可）	ＫＤ（Ｍ）
３Ｃ８＿ｈＩｇＧ１	３Ｃ８	ＷＴ	１．２３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－０１		Ａ２８Ｋ	１．３９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－０２		Ｆ２９Ｅ	８．９８Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－０３		Ｔ３０Ｈ	７．９９Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－０４		Ｔ３０Ｋ	２．１３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－０５		Ｙ３２Ｌ	９．８１Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－０６		Ｙ３２Ｖ	４．１８Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－０７		Ｌ３３Ｓ	０．０００００１８
３Ｃ８ＶＨ－０８		Ｅ３５Ｉ	３．５９６６７Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－０９		Ｖ５０Ｆ	７．７３５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１０		Ｖ５０Ｓ	２．０１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１１		Ｉ５１Ｐ	０．０００００００１３７
３Ｃ８ＶＨ－１２		Ｎ５２Ｌ	２．１５Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－１３		Ｇ５３Ｈ	２．１３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１４		Ｇ５３Ｑ	１．７６Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１５		Ｓ５４Ｆ	２．７５６５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１６		Ｓ５４Ｉ	１．０９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１７		Ｓ５４Ｐ	１．５９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－１８		Ｇ５５Ｅ	９．２８５Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－１９		Ｄ５６Ｅ	７．９９Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－２０		Ｄ５６Ｑ	１．５６Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２１		Ｔ５７Ｆ	１．７５５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２２		Ｔ５７Ｈ	１．３２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２３		Ｔ５７Ｉ	１．５７Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２４		Ｔ５７Ｎ	１．３５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２５		Ｙ５８Ｅ	１．４３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２６		Ｙ５８Ｐ	０．０００００００４９５
３Ｃ８ＶＨ－２７		Ｙ５９Ｐ	１．１９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２８		Ｅ６１Ｋ	２．０２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－２９		Ｆ６３Ｈ	１．４１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－３０		Ｋ６４Ｑ	６．９６Ｅ－１０

３Ｃ８ＶＨ－３１		Ｄ９５Ｉ	１．２２Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－３２		Ｄ９５Ｔ	１．５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－３３		Ｒ９６Ｆ	３．９２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－３４		Ｒ９６Ｇ	１．３９Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－３５		Ｒ９６Ｙ	１．４２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－３６		Ｌ９７Ｅ	０．０００００００１２２
３Ｃ８ＶＨ－３７		Ｌ９７Ｓ	４．２８Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０１		Ａ２８Ｋ／Ｅ６１Ａ	１．３１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０２		Ｉ３４Ｖ／Ｇ５５Ｅ	１．０３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０３		Ｔ３０Ｖ／Ｆ６３Ａ	９．５１Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０４		Ｔ３０Ｋ／Ｆ６３Ｓ	１．０３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０５	３Ｃ８（高）	Ｎ３１Ｉ／Ｋ６４Ｌ	３．７３５Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０６		Ａ２８Ｑ／Ｆ６３Ｙ	１．１７Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０７		Ｆ２９Ｙ／Ｇ６５Ｓ	１．２５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０８		Ｔ３０Ｌ／Ｙ５９Ｆ	１．１２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ０９		Ｔ３０Ｅ／Ｉ５１Ｇ	９．７３Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＨ－ｔｒｉｐｌｅ１０		Ｎ３１Ｉ／Ｆ６３Ｖ	４．８１２５Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－０１		Ｈ２４Ｐ	４．７８Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０２		Ｈ２４Ｒ	１．０３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０３		Ｈ２４Ｓ	１．３８Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０４		Ｈ２４Ｖ	８．７２Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－０５		Ａ２５Ｌ	１．０３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０６		Ａ２５Ｐ	１．６３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０７		Ａ２５Ｖ	１．７１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－０８		Ｓ２６Ｇ	９．５１Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－０９		Ｓ２６Ｐ	４．４６Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－１０		Ｑ２７Ｅ	５．８０Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－１１		Ｑ２７Ｐ	１．６３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－１２		Ｑ２７Ｓ	９．７６Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－１３		Ｄ２８Ｐ	１．６５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－１４		Ｉ２９Ｑ	２．４７Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－１５		Ｉ２９Ｙ	８．３５Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－１６		Ｓ３０Ｅ	７．５４Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－１７		Ｓ３０Ｑ	１．０９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－１８		Ｓ３１Ｅ	９．６３Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－１９		Ｓ３１Ｑ	９．１２Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－２０		Ｙ３２Ｌ	２．１３Ｅ－０８

３Ｃ８ＶＬ－２１		Ｙ３２Ｐ	２．５１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－２２		Ｉ３３Ｅ	２．７８Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－２３		Ｉ３３Ｌ	１．０２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－２４		Ｉ３３Ｙ	１．８３Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－２７		Ｈ５０Ｎ	６．７６Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－２８		Ｇ５１Ｐ	５．０１Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－２９		Ｎ５３Ｐ	３．５０Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－３０		Ｌ５４Ｄ	４．０６Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－３１		Ｌ５４Ｆ	３．８０Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－３２		Ｅ５５Ｆ	２．５９Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－３３		Ｅ５５Ｔ	１．４９Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－３４		Ｓ５６Ｄ	７．７０Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－３５		Ｓ５６Ｅ	５．９１Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－３６		Ｓ５６Ｉ	７．１０Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－３７		Ｓ５６Ｖ	３．８６Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－３８		Ｓ５６Ｙ	７．８８Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－３９		Ｖ８９Ｇ	１．４３Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－４０		Ｖ８９Ｋ	６．８７Ｅ－０６
３Ｃ８ＶＬ－４１		Ｈ９０Ｆ	２．６８Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－４２		Ｈ９０Ｑ	１．４４Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－４３		Ｙ９１Ｅ	２．７０Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－４４		Ｙ９１Ｖ	８．３１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－４５		Ａ９２Ｐ	３．０８Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－４６		Ａ９２Ｓ	７．１４Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－４７		Ｑ９３Ｐ	７．４１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－４８		Ｆ９４Ｇ	１．１８Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－４９		Ｆ９４Ｑ	９．７７Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－５０		Ｆ９４Ｒ	６．７４Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－５１		Ｐ９５Ｉ	９．８９Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－５２	３Ｃ８（低）	Ｐ９５Ｙ	５．４５Ｅ－０８
３Ｃ８ＶＬ－５３		Ｙ９６Ｅ	３．６６Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－５４		Ｙ９６Ｌ	８．４３Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０１		Ｄ２８Ｓ；Ｔ５２Ｓ；Ｆ９４Ｌ	９．３８Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０２		Ｓ３０Ｙ；Ｎ５３Ｋ；Ａ９２Ｓ	４．７７Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０３		Ｓ３０Ｎ；Ｓ５６Ｌ；Ｙ９６Ｌ	６．０２Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０４		Ｉ３３Ｖ；Ｇ５１Ｓ；Ｙ９６Ｆ	４．９８３３３Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０５		Ｖ３４Ｓ；Ｓ５６Ｖ；Ｖ８９Ｇ	９．３１５Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０６		Ｓ５６Ｅ；Ｑ９３Ｎ	８．０７Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０７		Ｖ３４Ｔ；Ｓ５６Ｌ；Ｈ９０Ｇ	１．２２Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉ		Ｓ３０Ｇ；Ｔ５	１．０３４５Ｅ－０９

ｐｌｅ０８		２Ｓ；Ｙ９６Ｌ	
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ０９		Ｓ３１Ｎ；Ｔ５２Ｓ；Ｑ９３Ｓ	１．０１Ｅ－０９
３Ｃ８ＶＬ－ｔｒｉｐｌｅ１０		Ｉ３３Ｌ；Ｓ５６Ｅ	４．７９Ｅ－１０
３Ｃ８ＶＬ－ＹＡ			２．１０５６７Ｅ－０８

【０８５０】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７への組み込みのために変異型を選択した。選択された変異型は、上の表４及び表５において、高または低と指定される。増加した親和性（より低いＫＤ）を有する１Ａ７及び３Ｃ８の変異型は、それぞれ、１Ａ７（高）及び３Ｃ８（高）と称される。低減した親和性（より高いＫＤ）を有する１Ａ７及び３Ｃ８の変異型は、それぞれ、１Ａ７（低）及び３Ｃ８（低）と称される。

【０８５１】

ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ　３Ｃ８－１Ａ７の高親和性及び低親和性変異型をコードするＤＮＡを上述のように構築した。全ての構築物は、ヒトＩｇＧ１重定常領域及びヒトＣｋａｐｐａ軽定常領域を含んだ。変異型は、上述のようにＨＥＫ２９３細胞において発現され、精製された。変異型のＯＸ４０への結合を、上述のように、Ｂｉａｃｏｒｅを使用して試験した。図３９は、ＩｇＧ１及びｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式の高親和性及び低親和性変異型バージョンの親和性プロットを示す。ＩｇＧ１形式における最大２ｌｏｇの親和性差異は、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧ形式においてより軽度の親和性差異に変換される。

【０８５２】

親和性変異型ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧを、一次ヒトＣＤ４＋メモリーＴ細胞アッセイ及びＯＸ４０＋Ｊｕｒｋａｔ細胞ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、ＯＸ４０アゴニスト活性について試験した。データを図４０に示す。１Ａ７及び３Ｃ８　Ｆｖにおける増加及び／または低減した親和性は、ＯＸ４０アゴニズム活性においてわずかな差異をもたらし、全体的に独立した結合単位の様々な親和性は、四価の二重エピトープ形式の内因性アゴニズム活性の可能性を許容する。

【０８５３】

実施例１８．四価の二重エピトープ抗体を使用するデス受容体５のアゴニズム

多価の二重エピトープアプローチは、ＴＮＦＲＳＦメンバーのデス受容体５（ＤＲ５）、別名、ＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド受容体２（ＴＲＡＩＬＲ２）及びＴＮＦＲＳＦ１０Ｂを標的とする抗体内にアゴニズム活性を操作するために探求された。ＤＲ５は、がん細胞のアポトーシスを媒介する際のその役割により治療的関心の標的である（Ａｓｈｋｅｎａｚｉ　２０１５，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２５（２）：４８７－４８９）。ＤＲ５に対する抗体は、活性に関してインビボでのＦｃγＲ媒介架橋に依存することが確立されている（Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　１９：１０１－１３、Ｋｉｍ　＆　Ａｓｈｋｅｎａｚｉ，２０１３，Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　２１０：１６４７－５１）。

【０８５４】

１６のマウス抗ＤＲ５モノクローナルＡｂ一セットを、古典的なハイブリドーマに基づく技術から生成した。重鎖及び軽鎖をコードするＤＮＡを、ハイブリドーマからクローニングし、マウスＩｇＧ２ａ重定常鎖及びマウスＣｋａｐｐａ定常鎖と共に、上述のようにｐＲＫベクター内にサブクローニングした。以前に前臨床的及び臨床的に特徴付けされたヒト化抗ＤＲ５ヒトＩｇＧ１抗体ドロジツマブ（Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　１７（１０）：３１８１－３１９２）も比較物として産生された。プロアポトーシス因子Ｂａｘ及びＢａｋ（Ｂａｘ$^{-}$／Ｂａｋ$^{-}$）のダブルノックアウトを有するＣＨＯ細胞を使用して抗体を発現させ（Ｍａｃａｒａｅｇ　ＮＦ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｐｒｏｇ　２９：１０５０－８）、プロテ

インＡカラム上で精製した。必要な場合、最も活性な抗体をさらに精製して、サイズ排除カラム、ＳＰカチオン交換カラム、または疎水性相互作用カラムのいずれかを用いたクロマトグラフィーを介して凝集した種を除去した。

【０８５５】

アレイベースの表面プラズモン共鳴撮像（ＳＰＲｉ）技法（Ｃａｒｔｅｒｒａ ＵＳＡ，Ｗａｓａｔｃｈ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）を利用して、抗ＤＲ５抗体を異なるエピトープ群に分類した。「古典的な」サンドイッチアッセイに類似するエピトープビニングアッセイは、抗ＤＲ５抗体をラベル不含バイオセンサ上に固定化し、精製された組換えｆｌａｇ標識ＤＲ５細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を有する全ての表面結合抗体を飽和し、続いてＤＲ５への結合について競合するように各抗体を添加するためにマイクロ流体技術を利用した。抗体を、事前に定めた位置でＥＤＣ／ＮＨＳ化学を使用して金表面バイオセンサ上に固定化した。固定化した抗体をＤＲ５抗原の細胞外ドメインで飽和し、続いて抗体／ＤＲ５複合体をセット中の第２の抗体と競合させた。固定化した抗体／抗原複合体に対する溶液抗体の結合の遮断は、抗体が同じエピトープ群に属することを示した。抗原及び溶液抗体の除去、ＤＲ５抗原を有する固定化した抗体の再飽和、及び異なる抗体の添加は、全ての抗体が試験されるまで繰り返された。全ての抗体が試験され、エピトープ群に配置されたら、ネットワークプロットを生成し、１６のマウス抗体によって認識される異なるエピトープを特定した。１６のマウス抗体を、ネットワークプロットとして表されるＤＲ５抗原に対して特定された３つの異なるエピトープ群間で分配した。ＳＰＲセンサグラムの綿密な検査をしたとき、３つのマウス抗体が低結合親和性を示し、ＳＰＲ応答はベースラインであった。これらの抗体の除去により、残りの１３の抗体がそれらのそれぞれのエピトープ群に定義された。マウス抗体のエピトープ群及びドロジツマブを表６に提供する。

表６．ＤＲ５特異的マウスモノクローナル抗体のエピトープビン及び親和性の要約。

エピトープ群	抗体	ＫＤ（ｎＭ）	標準偏差（＋／－）
１	１２Ａ１	２０．４３	３．５７
１	１３Ｅ１１	５２．２３	２．３５
１	１３Ｅ３	１２．２３	１．３３
２	１１Ｈ１２	０．７２	０．１８
２	３Ｆ１１	１．０３	０．１７
２	３Ｈ３	０．９７	０．２４
２	５Ｃ７	６．４３	０．７５
２	７Ｇ４	５２．３７	４．４８
３	１Ｂ１０	８．７１	０．１７
３	１４Ｇ８	４．４６	１．９９
３	３Ｃ９	ＮＤ	
３	３Ｄ５	２．６３	０．１６
３	３Ｈ１	ＮＤ	
３	４Ｄ９	０．３３	０．１２
３	４Ｈ１０	０．４１	０．１
３	６Ａ５	５７．８３	１．５１
ドロジツマブ	ドロジツマブ	３．３５	０．７

【０８５６】

抗体の可溶性ＤＲ５抗原への結合親和性は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を使用して

測定された。結合実験は、２５℃で、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００機器（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＳＰＲ測定値を使用して実行された。試験タンパク質を１ｕｇ／ｍＬでＰｒｏｔｅｉｎ－Ａコーティングされたセンサチップ上に固定化した。分析物ＤＲ５－ｆｌａｇ（１００～０．１６ｎＭ）の５倍連続希釈物を、３０μＬ／分の流速で泳動緩衝液（ＨＢＳ－Ｐ＋Ｂｕｆｆｅｒ １ｘ；０．０１ Ｍ ＨＥＰＥＳ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ－２０ ｐＨ７．４）に注入し、会合相及び解離相のセンサグラムを記録した。分析物を１８０秒間注入し、６００秒間解離させた。１：１ラングミュア結合モデルに適合させたデータの非線形回帰分析は、会合（k_{on}）速度定数、解離（k_{off}）速度定数、及び平衡解離定数（ＫＤ）をもたらした。速い会合及び解離速度定数を有する抗体について、定常親和性分析も得た。マウス抗体及びドロジツマブの親和性を表６に示す。ＫＤは、エピトープ群２及び３の抗体に関しては０．１～１００ｎＭの範囲であったが、群１からの抗体は、ＫＤ＞１０ｎＭを表した。

【０８５７】

選択した抗ＤＲ５抗体の二価の二重エピトープ、ならびに四価の単一エピトープ及び二重エピトープバージョンが操作された。選択したマウス抗体１３Ｅ３、３Ｈ３、４Ｄ９、及び１１Ｈ１２のＶＨ及びＶＬドメインをコードするＤＮＡを、上述のように、ヒトＩｇＧ１重定常領域及びヒトＣｋａｐｐａ軽定常領域を含むｐＲＫベクターに挿入して、マウスＦｖ－ヒトＩｇＧ１／ＣｋａｐｐａキメラＩｇＧを作製した。１３Ｅ３、３Ｈ３、４Ｄ９、１１Ｈ１２、及びドロジツマブ抗体の選択した組み合わせの二重エピトープバージョンは、「ノブ」または「ホール」変異型でＶＨ領域を適切な重鎖構築物内に挿入することによって操作された（Ｒｉｄｇｗａｙ ＪＢＢ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ ９：６１７－２１）。ＶＨ領域をコードするＤＮＡを、Ｃ末端６Ｈｉｓタグを有するノブ変異Ｔ３６６Ｗ（ＥＵ番号付け）を含む変異型ヒトＩｇＧ１内にサブクローニングするか、またはＣ末端Ｆｌａｇタグを有するホール変異Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ（ＥＵ番号付け）を含む変異型ヒトＩｇＧ１内にサブクローニングした。１３Ｅ３、３Ｈ３、４Ｄ９、１１Ｈ１２、及びドロジツマブ抗体の選択した組み合わせの四価の二重エピトープバージョンは、実施例２に記載され、図９に図示されるｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョン２（Ｖ２）形式を使用して操作された。この形式は、ヘテロ二量体形成を促進するために、上述のノブ／ホール変異型を使用する。ＶＨ領域をコードするＤＮＡを、ノブ変異Ｔ３６６Ｗ（ＥＵ番号付け）を含む変異型ヒトＩｇＧ１内にサブクローニングするか、またはホール変異Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ（ＥＵ番号付け）を含む変異型ヒトＩｇＧ１内にサブクローニングした。

【０８５８】

ＩｇＧ、二重エピトープＩｇＧ、及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、上述のように、Bax^{-}／Bak^{-} ＣＨＯ株で発現され、精製された。二重エピトープＩｇＧ及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧは、別個のハーフ抗体のインビトロ構築に基づく方法を用いて産生された（Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，２０１３，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３１（８）：７５３－８）。ノブ／ホール変異型ハーフ抗体を、上述のように、ハーフ抗体として発現させ、インビトロで構築し、精製した。

【０８５９】

ＩｇＧ、二重エピトープＩｇＧ、及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗ＤＲ５抗体を、カスパーゼ８活性を促進するそれらの能力について試験した。ＨＴ－２９及びＣｏｌｏ２０５細胞株をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから得た。細胞を、３７℃、５％CO_2下で、Ｌ－グルタミン（Ｌ－ｇｌｕｔ）及び１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｉｎｃ．，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）で補充されたＲＰＭＩ培地中に維持した。抗体は５０ｎＭで試験されるか、または抗体の希釈物を成長培地中で調製するかのいずれかであった。１００μＬの各抗体試料を、９６白色壁付プレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の各ウェルに添加した。付着細胞をトリプシン処理し、組織培養フラスコから剥離した。５０μＬの$1.0x10^{6}$細胞／ｍＬ細胞上清を、９６白色壁付プレート中の１００μＬのＡｂに添加した。３

７℃、５％　CO_2で、細胞を、カスパーゼ－８については４時間、そして細胞生存率については２４時間インキュベートした。カスパーゼ活性及び細胞生存率は、ＰｒｏｍｅｇａからのＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ　８及びＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ）発光アッセイを用いて評価された。実験は三つ組で行われ、発光はＥｎｖｉｓｉｏｎ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して読み取った。細胞のみに正規化することにより、カスパーゼ８の活性倍数及び細胞生存率％を計算した。

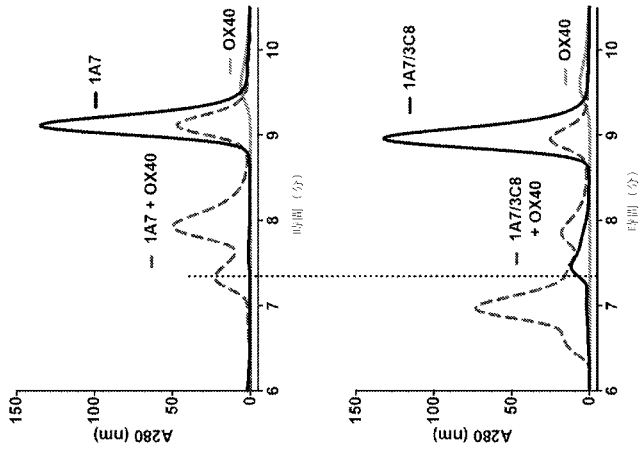
【０８６０】

図４１は、ヒト結腸直腸腺癌ＨＴ－２９細胞に対する抗ＤＲ５抗体のＩｇＧ１、二重エピトープＩｇＧ１、及び二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョンの５０ｎＭ抗体濃度におけるカスパーゼ８の活性を示す。二価の単一エピトープＩｇＧ１または二価の二重エピトープＩｇＧ１抗体のいずれもそれ自体でカスパーゼ８の活性を媒介せず、活性についての外因性架橋の要件と一致した。ドロジツマブＩｇＧ１は、この実験において、ある軽度のレベルの活性を示した可能性がある。対照的に、ドロジツマブを４Ｄ９（Ｄｒｏｚ－４Ｄ９）と、そして１１Ｈ１２を４Ｄ９（１１Ｈ１２－４Ｄ９）と対合した四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ形式は、ＤＲ５に対する内因性アゴニスト活性を媒介し、カスパーゼ８のシグナル伝達を促進した。興味深いことに、ｒ：Ｆｖ－ＩｇＧにおいて４つ全てのＦｖがドロジツマブＦｖである、四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－ドロジツマブ形式も内因性アゴニスト活性を媒介した。四価の二重エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　１３Ｅ３－３Ｈ３及び四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ　４Ｄ９－４Ｄ９の両方が、わずか～全くＤＲ５アゴニスト活性を媒介しなかった。

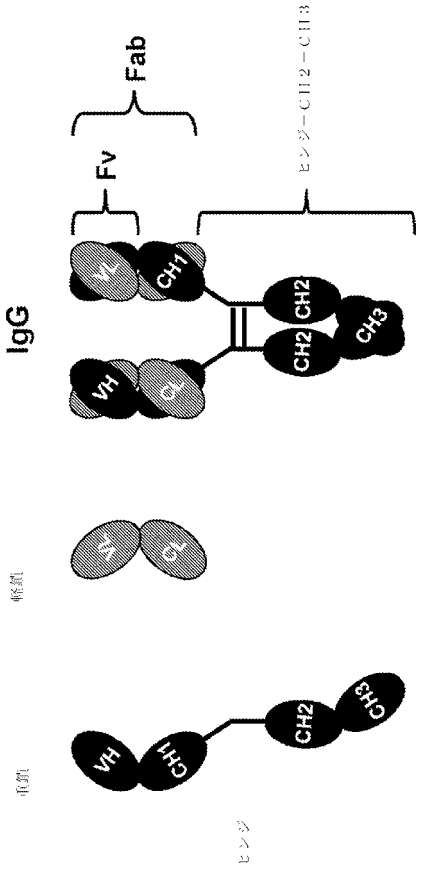
【０８６１】

ドロジツマブ－４Ｄ９の組み合わせがさらなる特徴付けのために選択された。ＩｇＧ、二重エピトープＩｇＧ、及びｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧ抗体を、ＨＴ－２９細胞及びヒト結腸直腸腺癌Ｃｏｌｏ２０５細胞株の両方に対するカスパーゼ８の活性及び抗増殖活性について試験した。図４２～４３は、ＨＴ－２９細胞に対するカスパーゼ８の活性（図４２）及び抗増殖活性（図４３）を測定する用量応答曲線を示す。図４４～４５は、Ｃｏｌｏ２０５細胞に対するカスパーゼ８の活性（図４４）及び抗増殖活性（図４５）を測定する用量応答曲線を示す。４Ｄ９のＩｇＧ１バージョン、４Ｄ９の四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧバージョン、またはドロジツマブと４Ｄ９との二価の二重エピトープの組み合わせのいずれもカスパーゼ８の活性を媒介せず、またいずれの細胞株の細胞生存率に対して任意の作用を有しなかった。ＩｇＧ１ドロジツマブは、より高い濃度で、両細胞株に対して軽度のカスパーゼ８の活性、及びＣｏｌｏ２０５細胞に対して抗増殖活性を媒介した。四価の単一エピトープｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－ドロジツマブは、両細胞株に対するＩｇＧ１バージョンよりも優れたカスパーゼ８の活性を促進し、Ｃｏｌｏ２０５細胞に対して強力な抗増殖活性を媒介した。ドロジツマブ及び４Ｄ９の四価の二重エピトープの組み合わせであるｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－４Ｄ９は、他の抗体と比べて効力及び最大活性の両方に関して、最も強いレベルのアゴニスト活性を媒介した。ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－４Ｄ９は、両細胞株において強いカスパーゼ８の活性、及びＣｏｌｏ２０５細胞に対して抗増殖活性を促進した。強いカスパーゼ８の活性にも関わらず、ＨＴ－２９細胞生存率に対するこれらの物質の影響の欠如は、この細胞株が外因性デス受容体媒介経路を通したシグナル伝達に対して感受性がないか、または感受性が弱いことを示唆する。これは、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－４Ｄ９、ｒ：Ｆａｂ－ＩｇＧドロジツマブ－ドロジツマブ、及び少ない程度ではあるがＩｇＧ１ドロジツマブによるＤＲ５アゴニズム及びカスパーゼ８の活性化が細胞増殖の阻害をもたらすＣｏｌｏ２０５細胞株と対照的である。それにも関わらず、総合すると、データは、治療目的の標的受容体を作動する多価の抗体形式における多重エピトープの最適な標的を支持する。

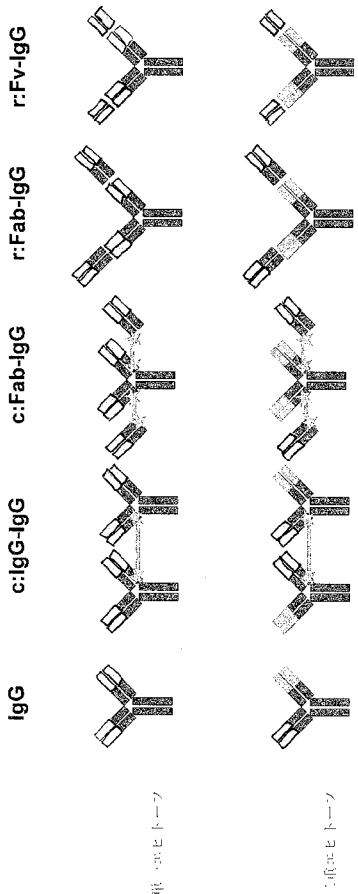
【図１】


1A7
OX40
1A7 + OX40
A280 (nm)
時間（分）
1A7/3C8
OX40
1A7/3C8 + OX40
A280 (nm)
時間（分）

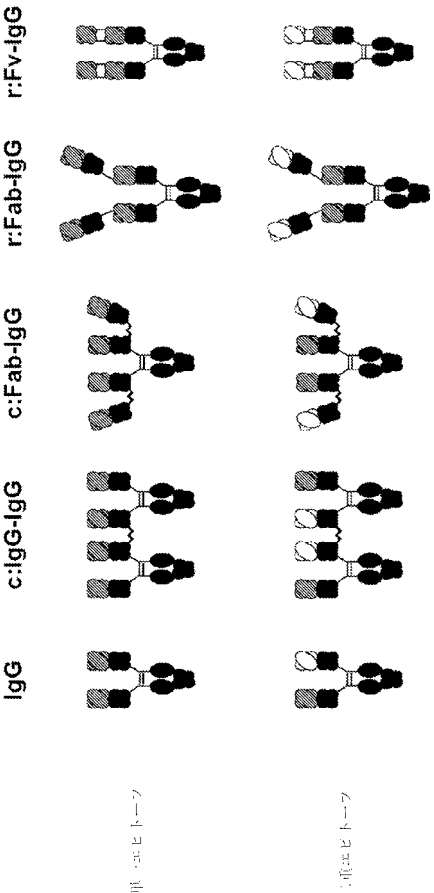
【図２】


IgG
Fab
Fv
ヒンジ－CH2－CH3
VH
CH1
VL
CL
CH2
CH2
CH3
軽鎖
重鎖
VH
CH1
CH2
CH3
ヒンジ

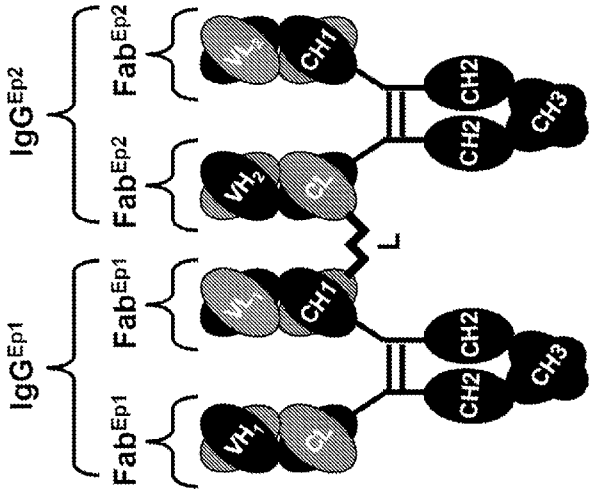
【図３Ａ】


IgG
c:IgG-IgG
c:Fab-IgG
r:Fab-IgG
r:Fv-IgG
一価エピトープ
二価エピトープ

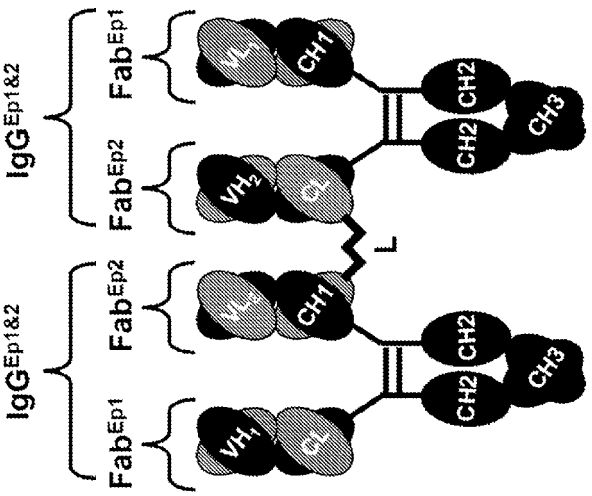
【図３Ｂ】


IgG
c:IgG-IgG
c:Fab-IgG
r:Fab-IgG
r:Fv-IgG
一価エピトープ
二価エピトープ

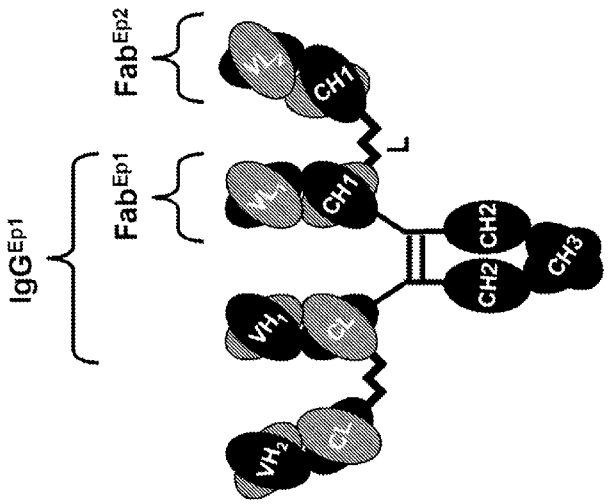
【図４】


IgG^Ep2
Fab^Ep2
Fab^Ep2
IgG^Ep1
Fab^Ep1
Fab^Ep1
L
VL
CH1
VH2
CL
VH1
CH2
CH3

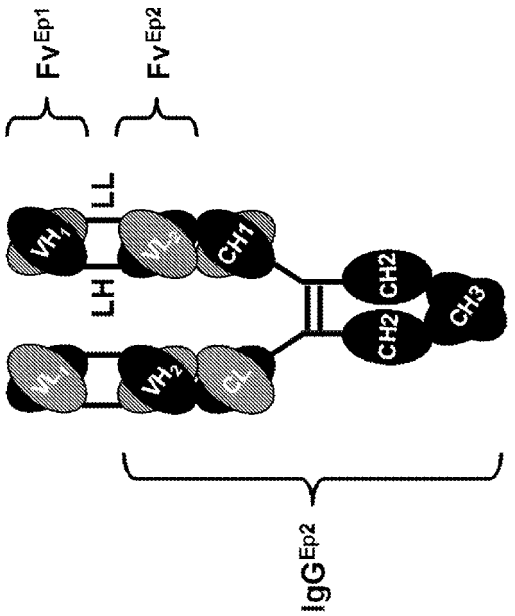
【図５】


IgG^Ep1&2
Fab^Ep1
Fab^Ep2
IgG^Ep1&2
Fab^Ep2
Fab^Ep1
L
VL
CH1
VH2
CL
VH1
CH2
CH3

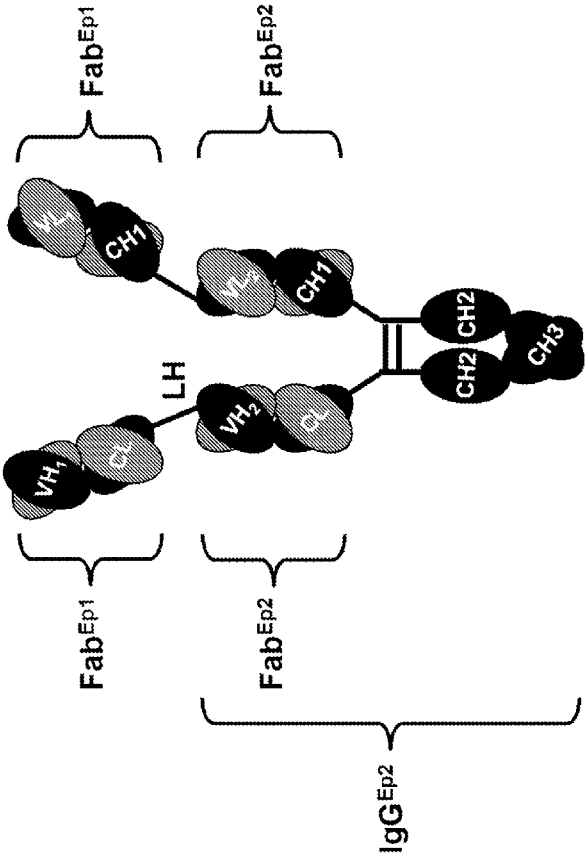
【図６】


IgG^Ep1
Fab^Ep1
Fab^Ep2
L
VL
CH1
VH1
CL
VH2
CH2
CH3

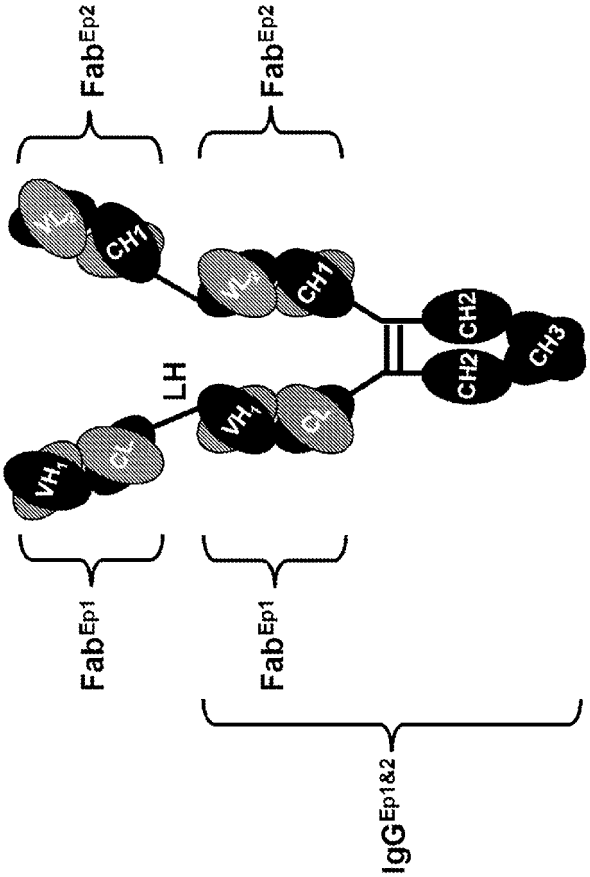
【図７】


Fv^Ep1
Fv^Ep2
LL
LH
VH1
VL2
CH1
VL1
VH2
CL
CH2
CH3
IgG^Ep2

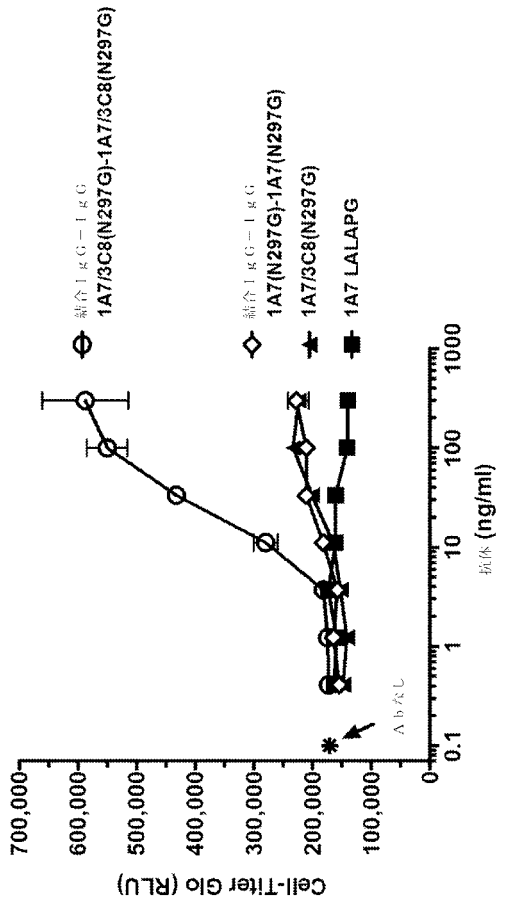
【図８】


FabEp1
FabEp2
VH1
CL
CH1
LH
VH2
CL
CH1
CH2
CH2
CH3
FabEp1
FabEp2
IgGEp2

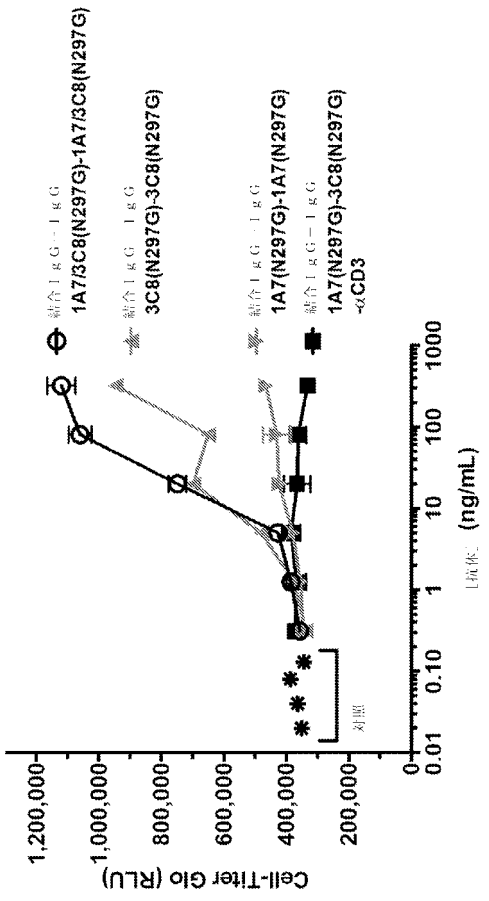
【図９】


FabEp2
FabEp2
VH2
CL
CH1
LH
VH1
CL
CH1
CH2
CH2
CH3
FabEp1
FabEp1
IgGEp1&2

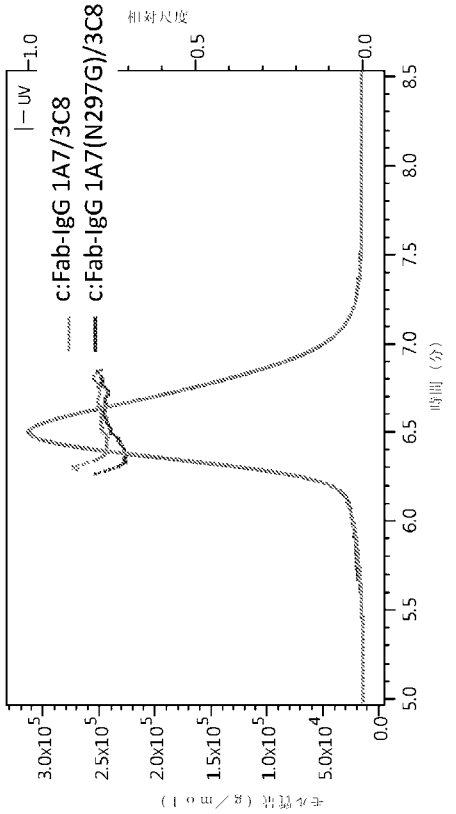
【図１０】


結合 IgG－IgG
1A7/3C8(N297G)-1A7/3C8(N297G)
結合 IgG－IgG
1A7(N297G)-1A7(N297G)
1A7/3C8(N297G)
1A7 LALAPG
Ab なし
Cell-Titer Glo (RLU)
抗体 (ng/ml)

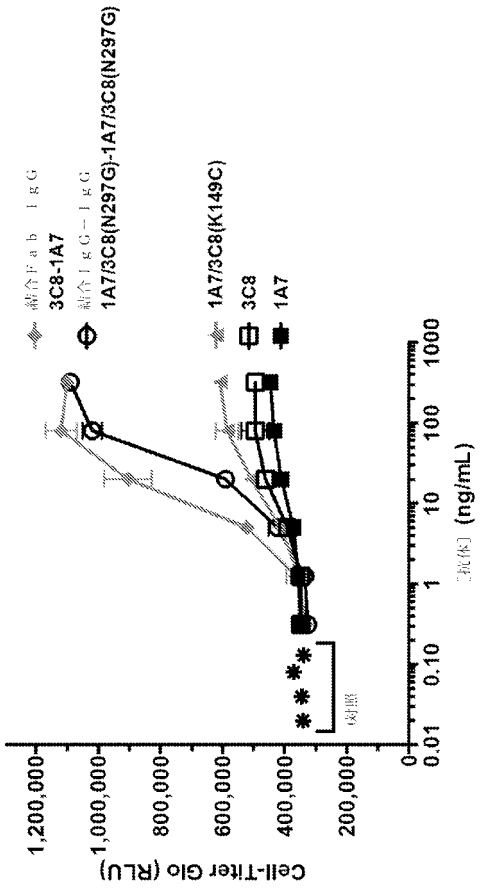
【図１１】


結合 IgG－IgG
1A7/3C8(N297G)-1A7/3C8(N297G)
結合 IgG－IgG
3C8(N297G)-3C8(N297G)
結合 IgG－IgG
1A7(N297G)-1A7(N297G)
結合 IgG－IgG
1A7(N297G)-3C8(N297G)
-αCD3
対照
Cell-Titer Glo (RLU)
抗体 (ng/mL)

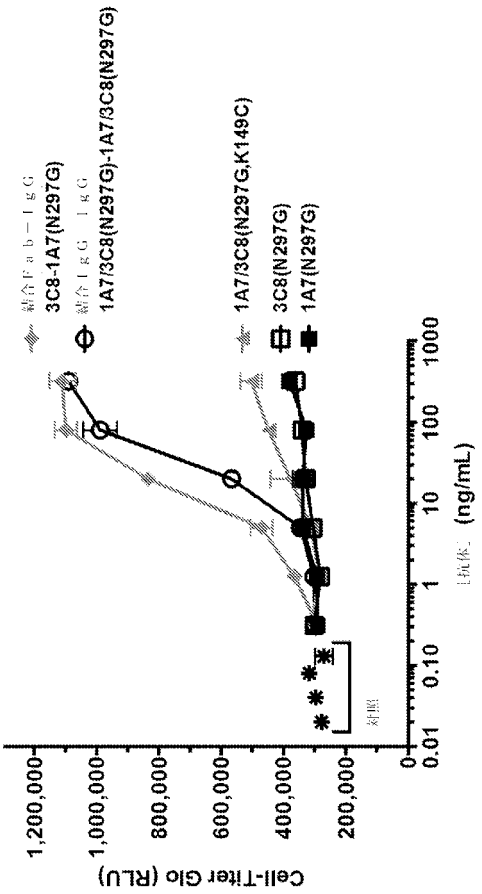
【図１２】



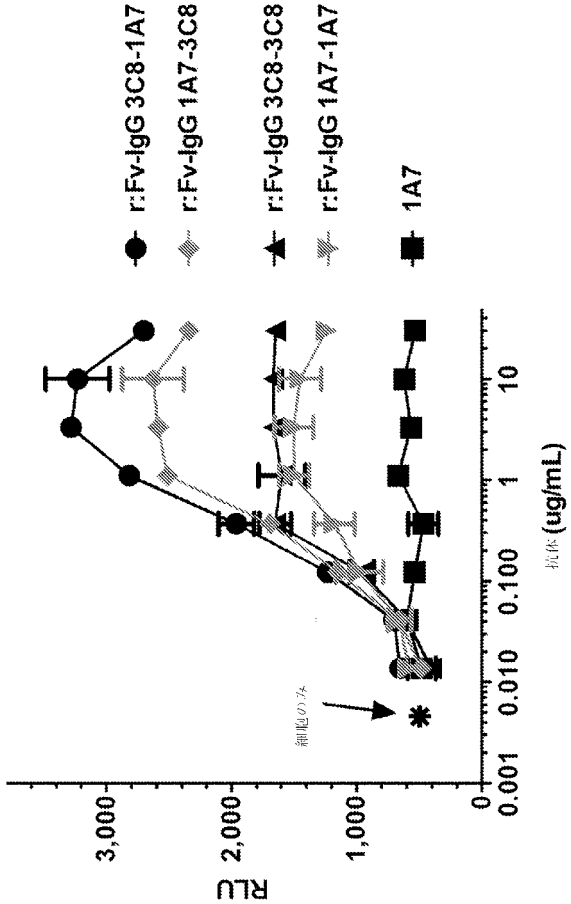
【図１３】



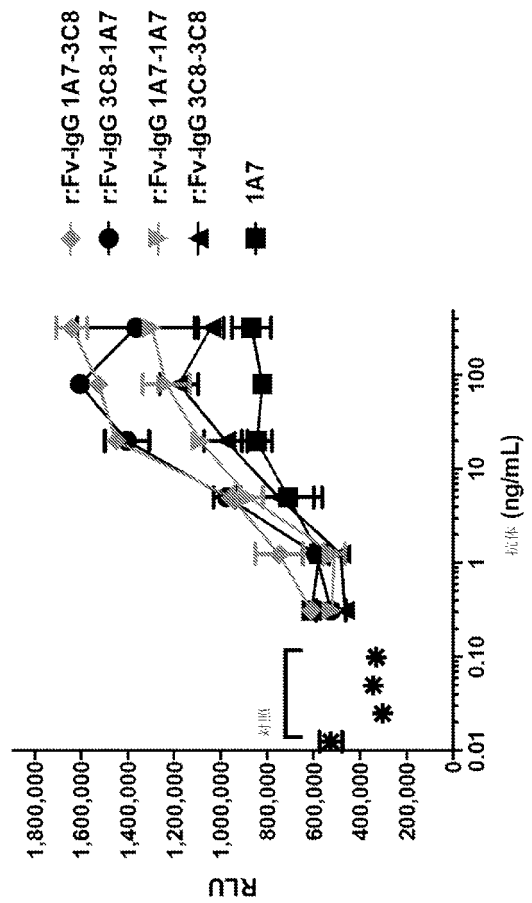
【図１４】



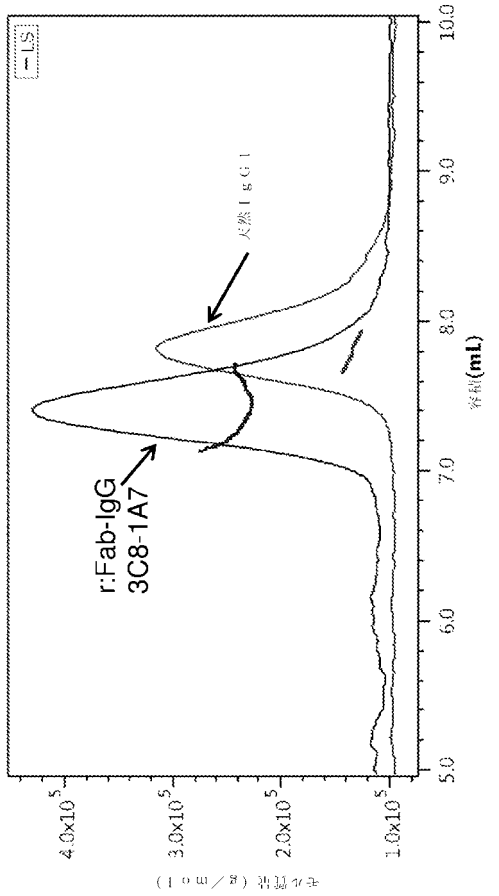
【図１５】



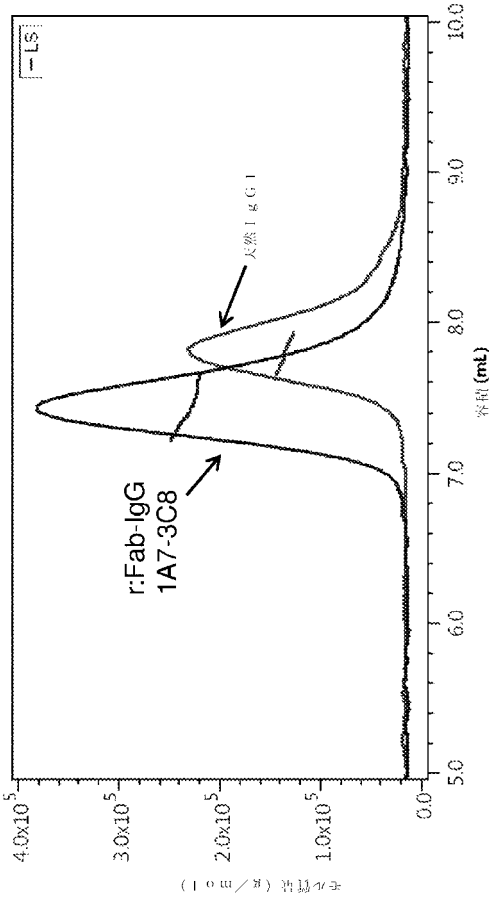
【図１６】



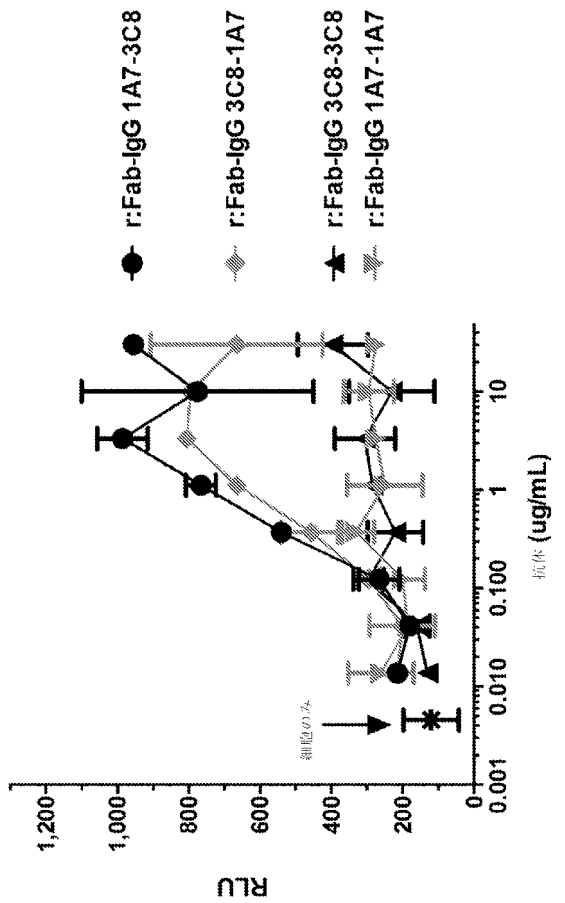
【図１７】



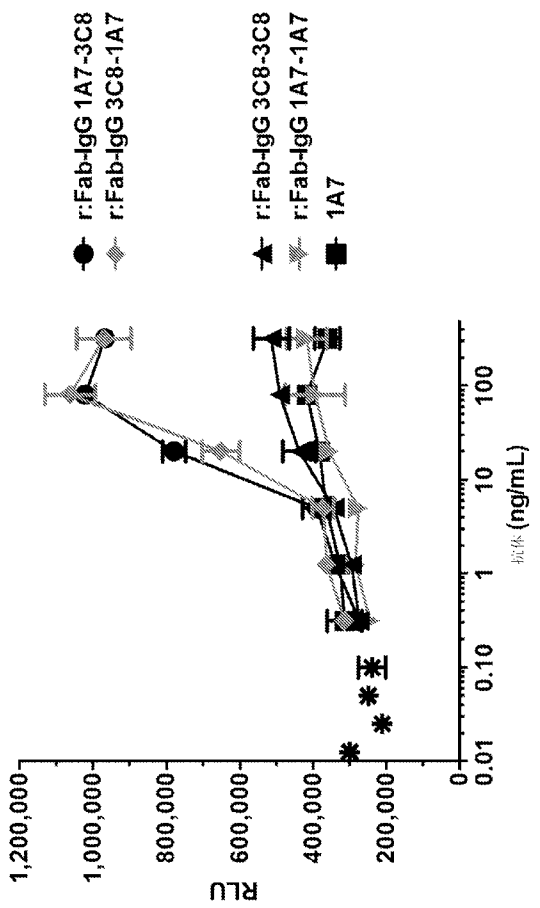
【図１８】



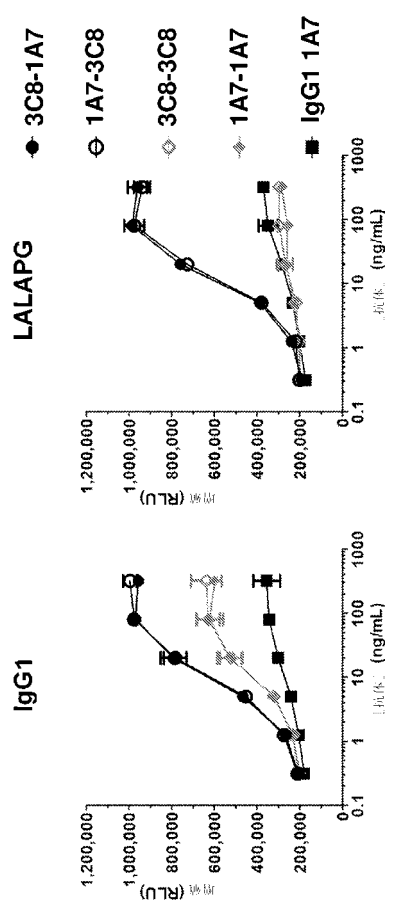
【図１９】



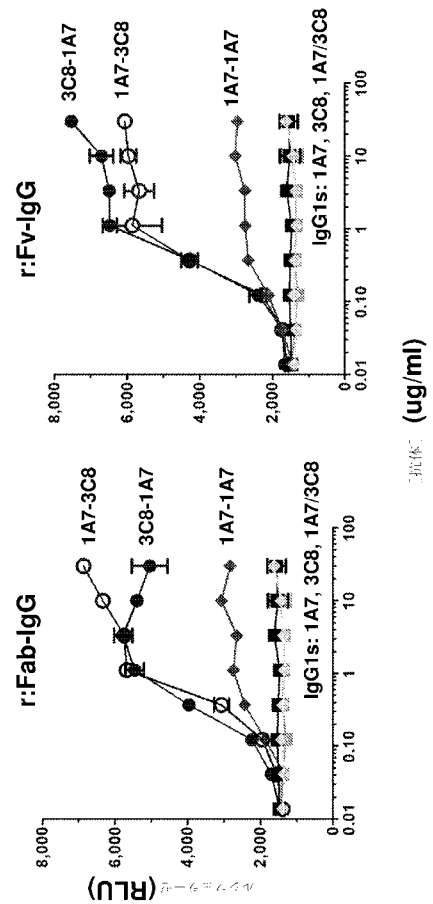
【図２０】



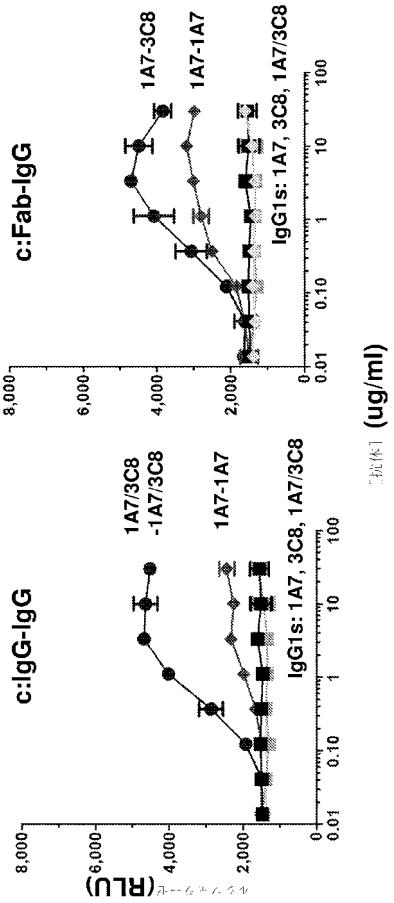
【図２１】



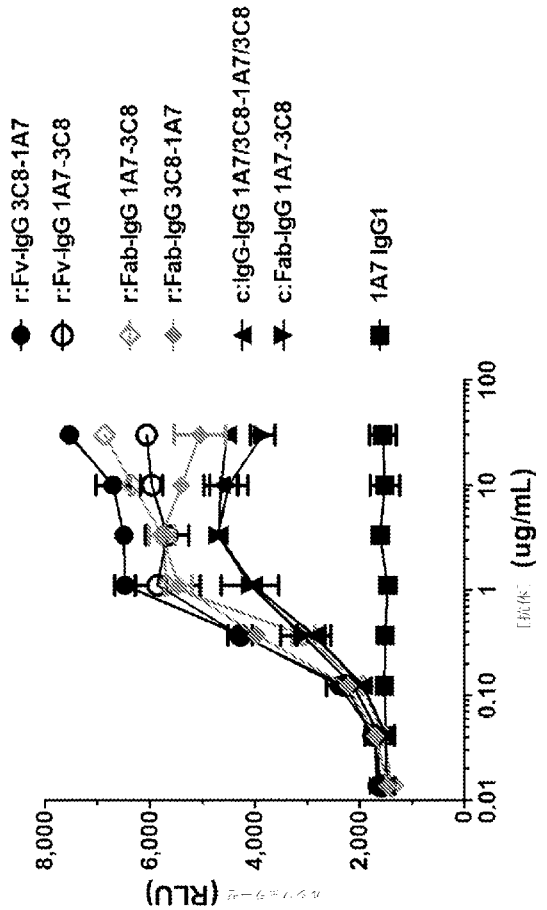
【図２２】



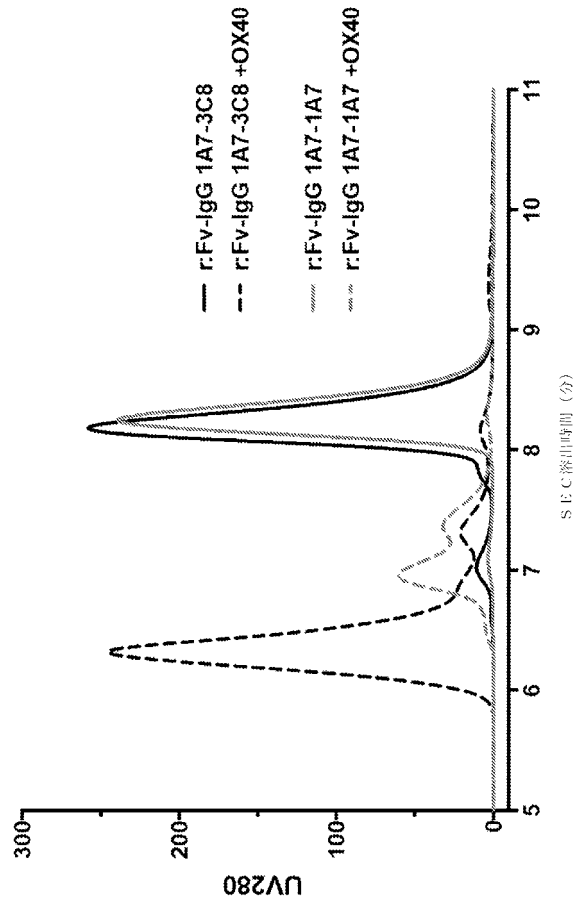
【図２３】



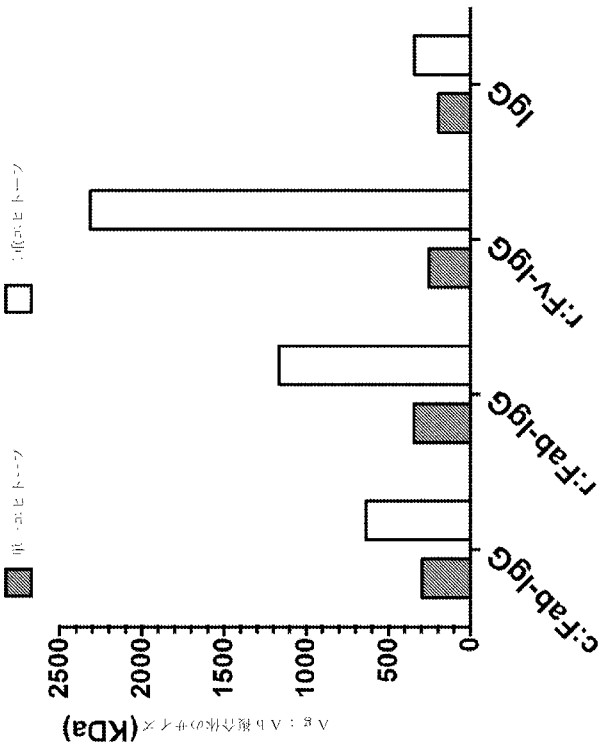
【図２４】



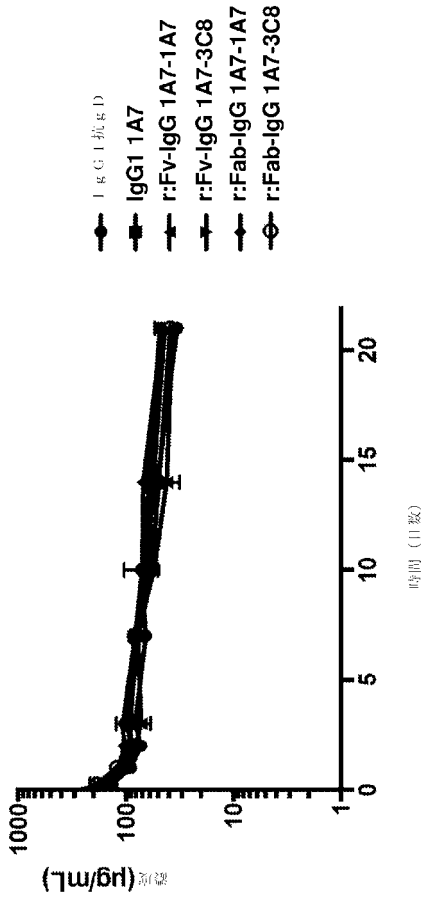
【図２５】



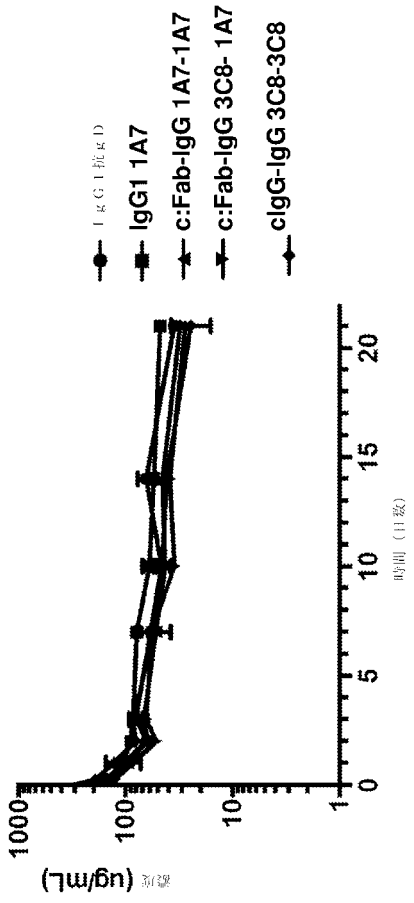
【図２６】



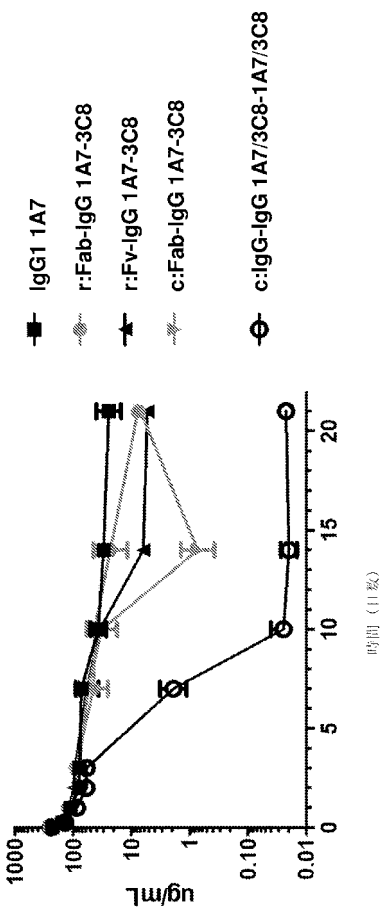
【図２７】



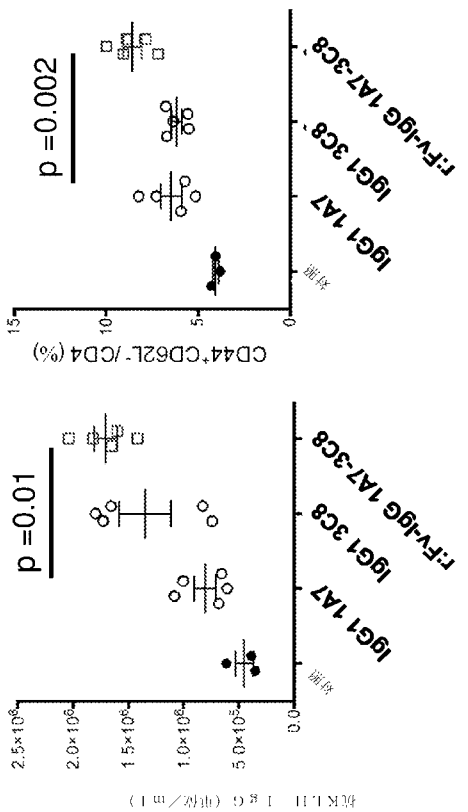
【図２８】



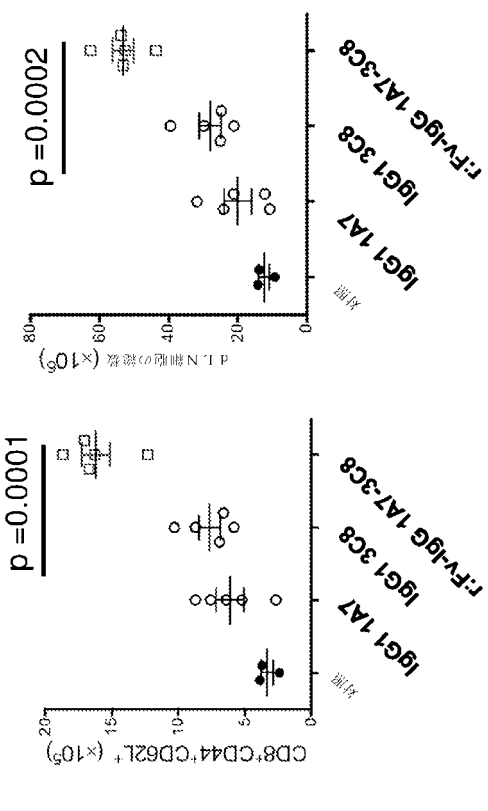
【図２９】



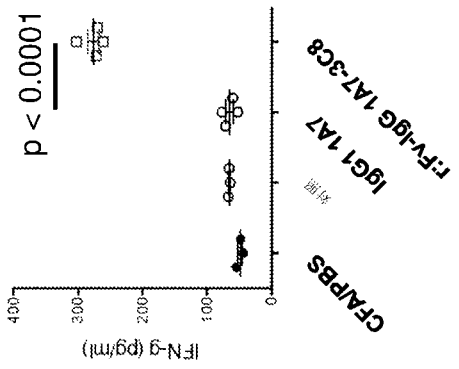
【図３０】



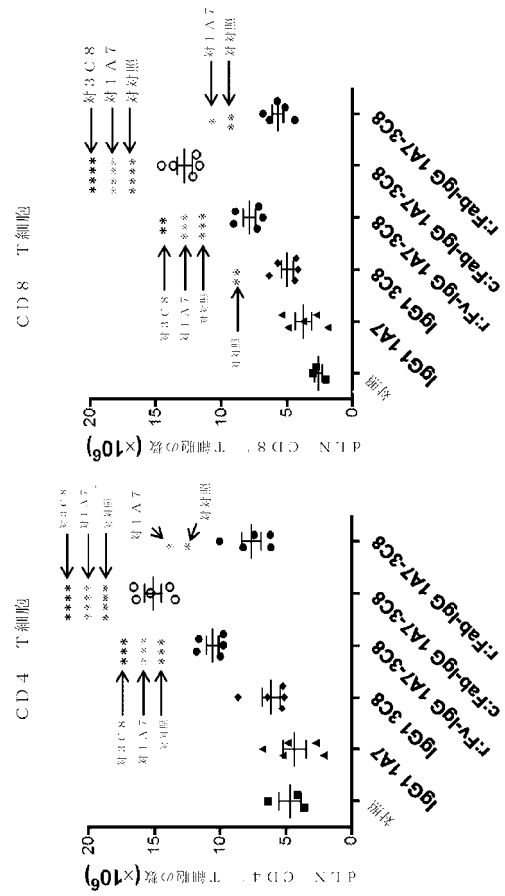
【図３１】



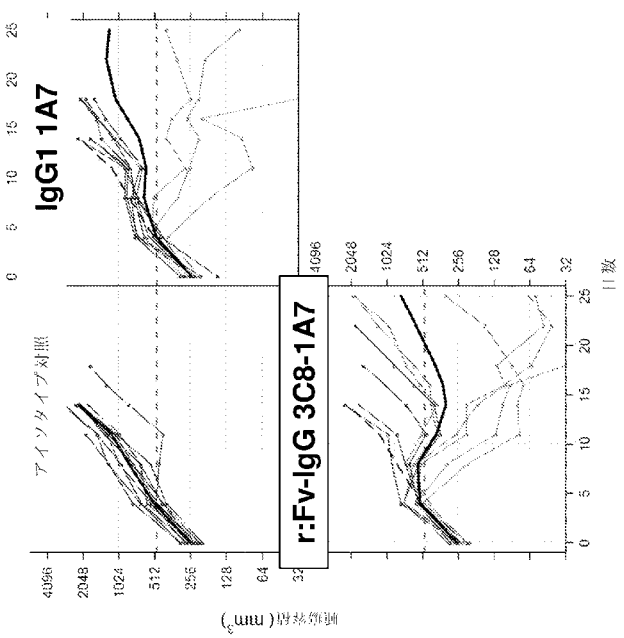
【図３２】



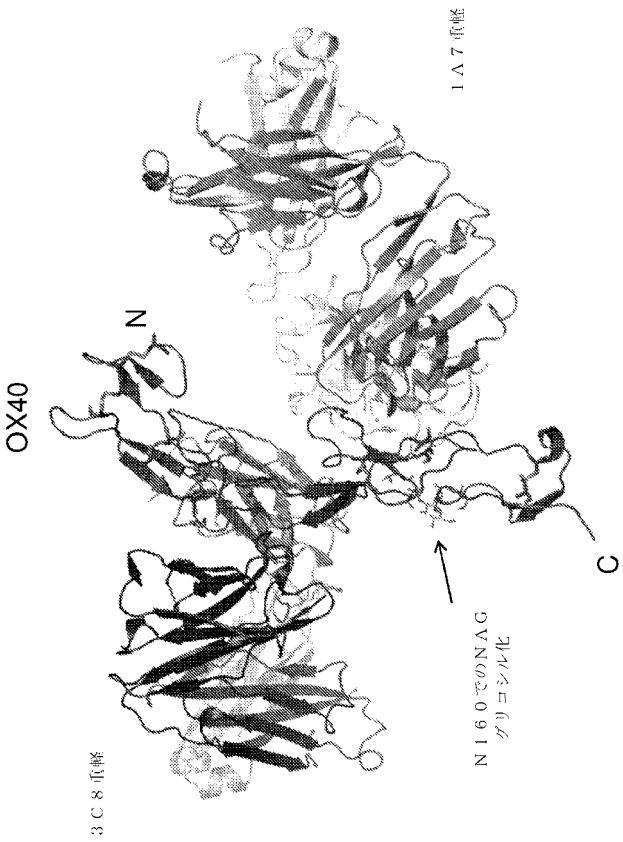
【図３３】



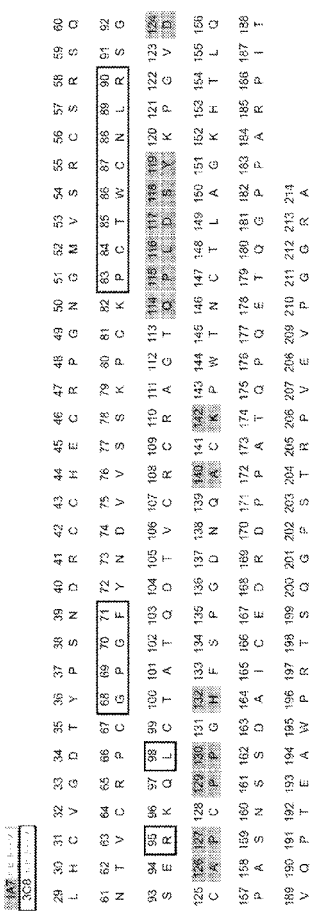
【図３４】



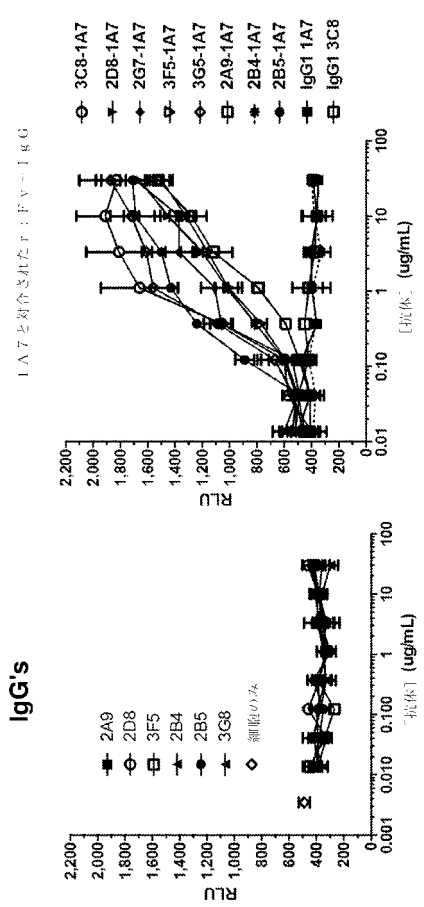
【図３５】



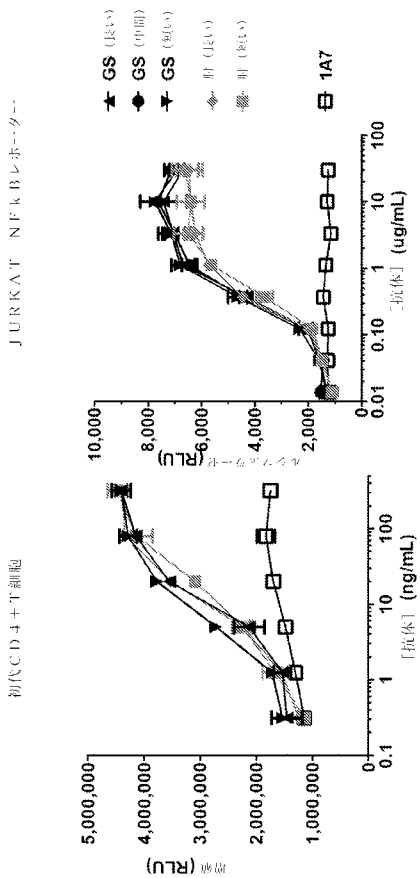
【図３６】



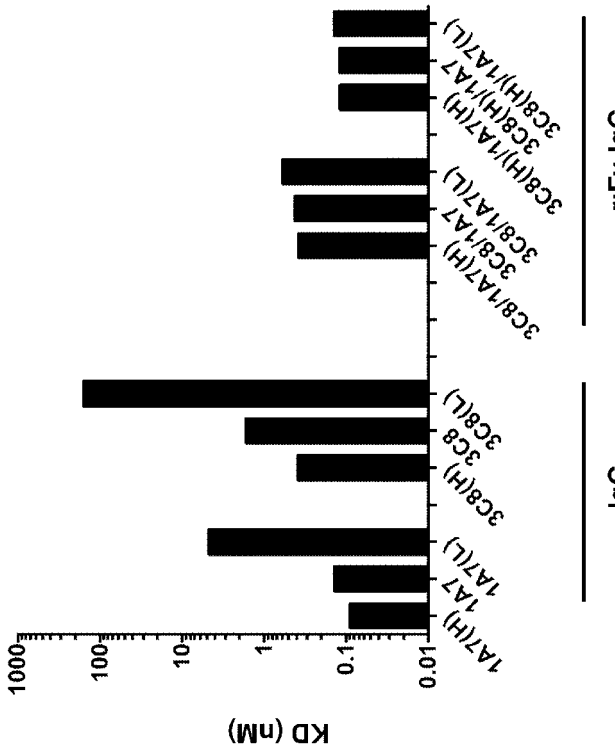
【図３７】



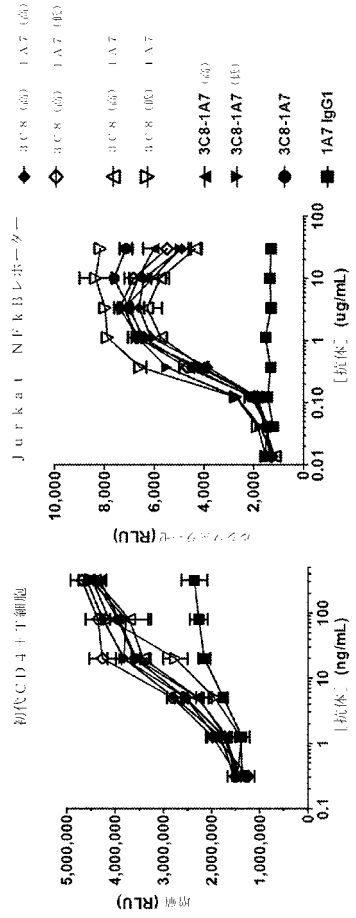
【図３８】



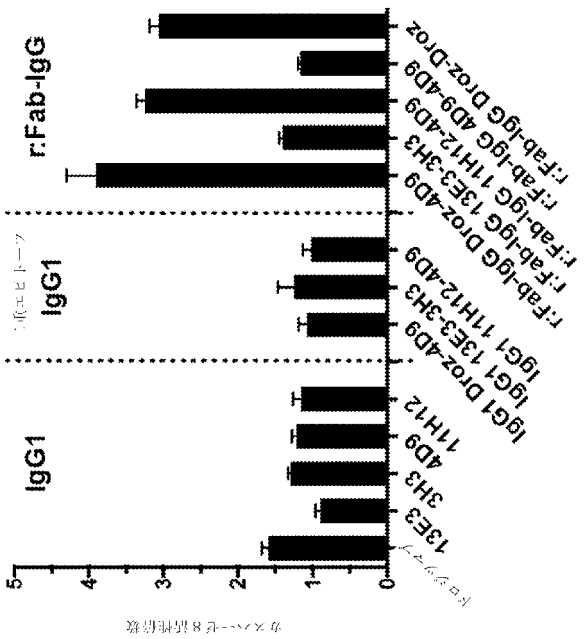
【図３９】



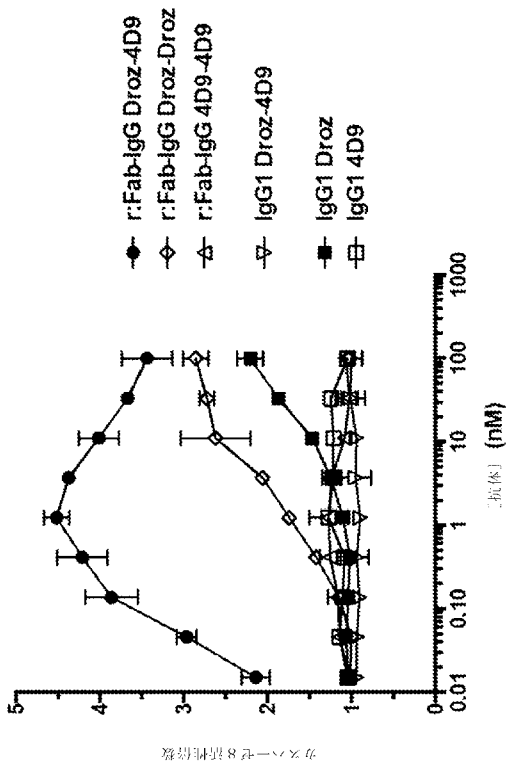
【図４０】



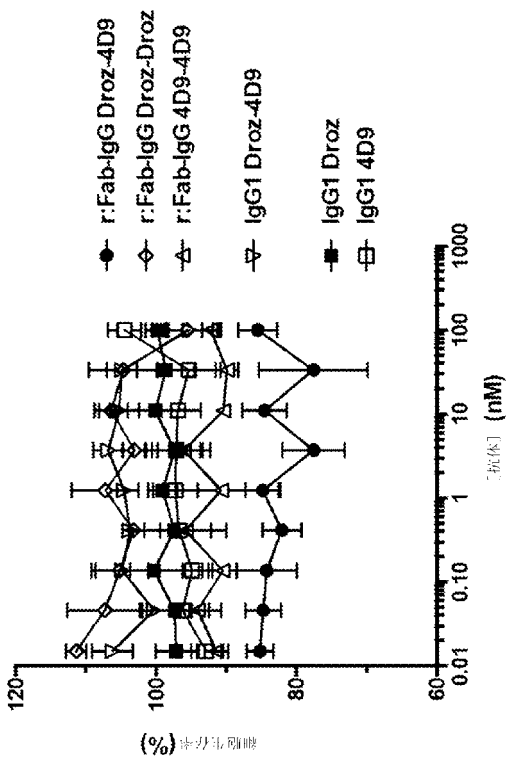
【図４１】



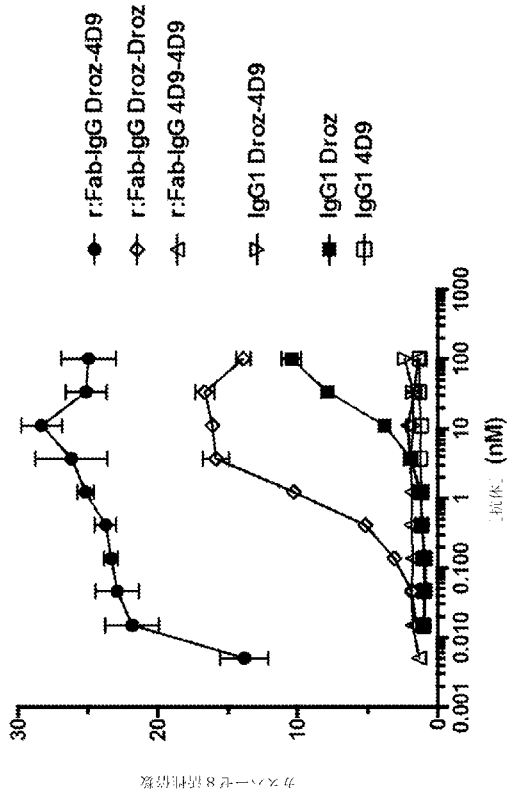
【図４２】



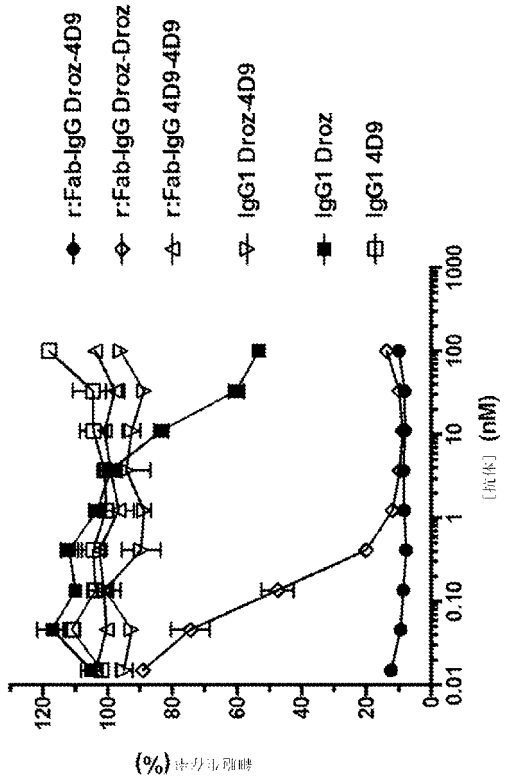
【図４３】



【図４４】



【図４５】



【配列表】

2019530434000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/045642

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/045642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD. A61K39/00

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2017/123673 A2 (INHIBRX LP [US]) 20 July 2017 (2017-07-20) examples 2,3	1-107
Y	WO 2015/017822 A1 (JN BIOSCIENCES LLC [US]) 5 February 2015 (2015-02-05) example 9	1-107
Y	US 2015/307620 A1 (VELLA ANTHONY T [US] ET AL) 29 October 2015 (2015-10-29) example 7	1-107

☐ 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	Date of mailing of the international search report
28 September 2017	10/10/2017

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

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/045642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017123673 A2	20-07-2017	US 2017198051 A1	13-07-2017
		WO 2017123673 A2	20-07-2017
WO 2015017822 A1	05-02-2015	EP 3027657 A1	08-06-2016
		JP 2016532692 A	20-10-2016
		US 2015038682 A1	05-02-2015
		WO 2015017822 A1	05-02-2015
US 2015307620 A1	29-10-2015	NONE	

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｐ	*13/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/02	
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*15/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00	
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	*13/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/10	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08	

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＵＮＩＸ
２．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　ラザール，　グレッグ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　ヤン，　イェンリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　クリステンセン，　エリン　エイチ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　ハン，　ジュリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９５１２９，　サン　ノゼ，　ウィズテリア　ウェイ　６６０６
(72)発明者　キム，　ジョン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

Ｆターム(参考)　4B064 AG27 CA19 CC24 DA05
4C084 AA19 NA05 ZB072 ZB261
4C085 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA57 CA40 DA76 EA28 FA74