(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-537779
(P2024-537779A)
(43)公表日　令和6年10月16日(2024.10.16)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	ZNA　4B065
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	4C085
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13	4H045
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15	
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全266頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-519378(P2024-519378)
(86)(22)出願日　令和4年9月27日(2022.9.27)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月17日(2024.5.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/077083
(87)国際公開番号　WO2023/056252
(87)国際公開日　令和5年4月6日(2023.4.6)
(31)優先権主張番号　63/250,160
(32)優先日　令和3年9月29日(2021.9.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519288755
ドラゴンフライ セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、サード・アベニュー１８０、シックス・フロア
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉 真奈美
(74)代理人　100221545
弁理士　白江 雄介
(72)発明者　ベッリ，アーロン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１６及びＢＡＦＦ－Ｒに結合するタンパク質

(57)【要約】
ＮＫＧ２Ｄ受容体、ＣＤ１６、及びＢ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する多重特異性結合タンパク質、並びに癌及び自己免疫性炎症性疾患の治療のために有用な多重特異性結合タンパク質の医薬組成物及び治療方法が記載される。

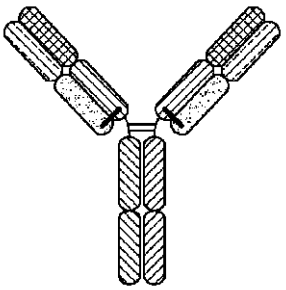


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質であって、
（ａ）ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位と、
（ｂ）Ｂ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含む、タンパク質。
【請求項２】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位がＦａｂフラグメントであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する前記第２の抗原結合部位がｓｃＦｖである、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項３】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位がｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する前記第２の抗原結合部位がＦａｂフラグメントである、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項４】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位を更に含む、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項５】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位がｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する前記第２及び前記追加の抗原結合部位が、各々Ｆａｂフラグメントである、請求項４に記載のタンパク質。
【請求項６】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位がｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する前記第２及び前記追加の抗原結合部位が、各々ｓｃＦｖである、請求項４に記載のタンパク質。
【請求項７】
前記第２及び前記追加の抗原結合部位のアミノ酸配列が同一である、請求項４～６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項８】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記ｓｃＦｖが、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体定常ドメイン又はその一部に連結しており、前記ｓｃＦｖが重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項３及び６又は７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項９】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖが、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体定常ドメイン又はその一部に連結しており、前記ｓｃＦｖが重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項２及び６～８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１０】
前記ヒンジが、アミノ酸配列Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙを更に含む、請求項８又は９に記載のタンパク質。
【請求項１１】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記ｓｃＦｖ内で、前記ｓｃＦｖの前記重鎖可変ドメインが、前記ｓｃＦｖの前記軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する、請求項３及び５～１０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１２】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内で、前記ｓｃＦｖの前記重鎖可変ドメインが、前記ｓｃＦｖの前記軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する、請求項２及び６～１１のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１３】
前記ジスルフィド架橋が、Ｋａｂａｔナンバリングスキームの下で番号付けされた前記重鎖可変ドメインのＣ４４と前記軽鎖可変ドメインのＣ１００との間で形成される、請求項１１又は１２に記載のタンパク質。
【請求項１４】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、可動性リンカーを介して前記軽鎖可変ドメインに連結されている、請求項３及び５～１３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１５】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、可動性リンカーを介して前記軽鎖可変ドメインに連結されている、請求項２及び６～１４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１６】
前記可動性リンカーが、$(G_4S)_4$（配列番号１１９）を含む、請求項１４又は１５に記載のタンパク質。
【請求項１７】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、前記軽鎖可変ドメインのＣ末端に位置付けられている、請求項３及び５～１６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１８】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、前記軽鎖可変ドメインのＣ末端に位置付けられている、請求項２及び６～１７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１９】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、前記軽鎖可変ドメインのＮ末端に位置付けられている、請求項３及び５～１６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２０】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内で、前記重鎖可変ドメインが、前記軽鎖可変ドメインのＮ末端に位置付けられている、請求項２、６～１７、及び１９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２１】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記Ｆａｂフラグメントが、抗原結合部位と前記Ｆｃ又はその一部との間に位置付けられていない、請求項２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８及び２０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２２】
ＢＡＦＦ－Ｒに結合するＦａｂのいずれも、抗原結合部位と前記Ｆｃ又はその一部との間に位置付けられない、請求項３、５、７又は８、１０又は１１、１３又は１４、１６又は１７、及び１９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２３】
タンパク質であって、
（ａ）ＮＫＧ２Ｄに結合するＦａｂフラグメントを含む第１の抗原結合部位と、
（ｂ）Ｂ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するヘテロ二量体を形成する第１の抗体定常ドメイン及び第２の抗体定常ドメインを含むＦｃドメインと、を含み、
前記ｓｃＦｖが、ヒンジを介して前記第１の抗体定常ドメインのＮ末端に連結しており、
前記Ｆａｂが、前記第２の抗体定常ドメインのＮ末端に連結している、タンパク質。
【請求項２４】
前記ヒンジが、Ｇｌｙ－Ｓｅｒを含む、請求項２３に記載のタンパク質。

【請求項２５】
前記第１の抗原結合部位が、ヒトＮＫＧ２Ｄに結合する、請求項１～２４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２６】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位が、それぞれ配列番号８１、８２、及び１１２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、及び相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むＶＨと、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２７】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位が、それぞれ配列番号８１、８２、及び９７のアミノ酸配列によって表されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含むＶＨと、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列によって表されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２８】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位が、配列番号９５と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～２７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２９】
ＮＫＧ２Ｄに結合する前記第１の抗原結合部位が、配列番号９５のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３０】
前記第２の抗原結合部位が、それぞれ配列番号２６０、２４９、及び２６１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む重鎖可変ドメインと、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項１～２９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３１】
前記第２の抗原結合部位が、それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２４８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む重鎖可変ドメインと、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項１～３０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３２】
前記第２の抗原結合部位が、配列番号２５０と少なくとも９０％同一の重鎖可変ドメインと、配列番号２５１と少なくとも９０％同一の軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項３１に記載のタンパク質。
【請求項３３】
前記第２の抗原結合部位が、配列番号２５０と比べてＧ４４Ｃ置換を有するＶＨと、配列番号２５１と比べてＧ１００Ｃ置換を有するＶＬと、を含む、請求項３２に記載のタンパク質。
【請求項３４】
前記第２の抗原結合部位が、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬとを含むか、又は配列番号２５０のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５１のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３５】
前記第２の抗原結合部位が、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～３４のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項３６】
前記第２の抗原結合部位が、配列番号２５０のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５１のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～３２又は３４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３７】
前記第２の抗原結合部位が、一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含み、前記ｓｃＦｖが、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３８】
前記第２の抗原結合部位が、一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含み、前記ｓｃＦｖが、配列番号２５４及び２５５からなる群から選択される配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１、２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８、２０又は２１、２３～３５及び３７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３９】
前記第２の抗原結合部位がｓｃＦｖを含み、前記ｓｃＦｖが、配列番号２５４と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１、２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８、２０又は２１、２３～３５及び３７又は３８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４０】
前記第２の抗原結合部位がｓｃＦｖを含み、前記ｓｃＦｖが、配列番号２５４のアミノ酸配列を含む、請求項１、２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８、２０又は２１、２３～３５及び３７～３９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４１】
前記タンパク質が、配列番号２７０と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１、２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８、２０又は２１、２３～３５及び３７～４０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４２】
前記タンパク質が、配列番号２７０のアミノ酸配列を含む、請求項１、２、９又は１０、１２又は１３、１５又は１６、１８、２０又は２１、２３～３５及び３７～４１のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４３】
前記タンパク質が、配列番号２７１と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１～３、５、７又は８、１０又は１１、１３又は１４、１６又は１７、１９、２４～３４及び３６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４４】
前記タンパク質が、配列番号２７１のアミノ酸配列を含む、請求項１～３、５、７又は８、１０又は１１、１３又は１４、１６又は１７、１９、２４～３４、３６、及び４３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４５】
前記第２の抗原結合部位が、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定される場合、５ｎＭ以下の解離定数（K_D）でヒトＢＡＦＦ－Ｒに結合する、請求項１～４４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４６】
前記第２の抗原結合部位が、ＢＡＦＦ－ＲのＢＡＦＦへの結合を阻害する、請求項１～４５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４７】
タンパク質であって、
（ａ）抗ＮＫＧ２Ｄ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第１の抗原結合部位であって、前記ＶＨが配列番号９５のアミノ酸配列を含み、前記ＶＬが配列番号８５のアミノ酸配列を含む、第１の抗原結合部位と、

（ｂ）抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第２の抗原結合部位であって、前記ＶＨが配列番号２５２のアミノ酸配列を含み、前記ＶＬが配列番号２５３のアミノ酸配列を含む、第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含む、タンパク質。
【請求項４８】
タンパク質であって、
（ａ）抗ＮＫＧ２Ｄ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第１の抗原結合部位であって、前記ＶＨが配列番号９５のアミノ酸配列を含み、前記ＶＬが配列番号８５のアミノ酸配列を含む、第１の抗原結合部位と、
（ｂ）配列番号２５４のアミノ酸配列を含む第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含む、タンパク質。
【請求項４９】
前記抗体Ｆｃドメインが、ヒトＩｇＧ１抗体Ｆｃドメインである、請求項１～４８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５０】
前記抗体Ｆｃドメイン又はその一部が、配列番号１１８と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、請求項４９に記載のタンパク質。
【請求項５１】
前記抗体Ｆｃドメインの少なくとも１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされたＱ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１、及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む、請求項４９又は５０に記載のタンパク質。
【請求項５２】
前記抗体Ｆｃドメインの少なくとも１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされたＱ３４７Ｅ、Ｑ３４７Ｒ、Ｙ３４９Ｓ、Ｙ３４９Ｋ、Ｙ３４９Ｔ、Ｙ３４９Ｄ、Ｙ３４９Ｅ、Ｙ３４９Ｃ、Ｌ３５１Ｋ、Ｌ３５１Ｄ、Ｌ３５１Ｙ、Ｓ３５４Ｃ、Ｅ３５６Ｋ、Ｅ３５７Ｑ、Ｅ３５７Ｌ、Ｅ３５７Ｗ、Ｋ３６０Ｅ、Ｋ３６０Ｗ、Ｑ３６２Ｅ、Ｓ３６４Ｋ、Ｓ３６４Ｅ、Ｓ３６４Ｈ、Ｓ３６４Ｄ、Ｔ３６６Ｖ、Ｔ３６６Ｉ、Ｔ３６６Ｌ、Ｔ３６６Ｍ、Ｔ３６６Ｋ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ｅ、Ｌ３６８Ａ、Ｌ３６８Ｄ、Ｋ３７０Ｓ、Ｎ３９０Ｄ、Ｎ３９０Ｅ、Ｋ３９２Ｌ、Ｋ３９２Ｍ、Ｋ３９２Ｖ、Ｋ３９２Ｆ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｔ３９４Ｆ、Ｄ３９９Ｒ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｖ、Ｓ４００Ｋ、Ｓ４００Ｒ、Ｄ４０１Ｋ、Ｆ４０５Ａ、Ｆ４０５Ｔ、Ｆ４０５Ｌ、Ｙ４０７Ａ、Ｙ４０７Ｉ、Ｙ４０７Ｖ、Ｋ４０９Ｆ、Ｋ４０９Ｗ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｒ、Ｔ４１１Ｄ、Ｔ４１１Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、及びＫ４３９Ｅから選択される、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５３】
前記抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされたＱ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含み、前記抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖が、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１、及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む、

請求項４９～５２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５４】
前記抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた配列番号１１８と比べてＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含み、前記抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖が、配列番号１１８と比べてＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ及びＦ４０５Ｔ置換を含む、請求項５３に記載のタンパク質。
【請求項５５】
前記抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた配列番号１１８と比べてＦ４０５Ｌ置換を含み、前記抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＫ４０９Ｒ置換を含む、請求項５３に記載のタンパク質。
【請求項５６】
前記抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖が、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた配列番号１１８と比べてＹ３４９Ｃ置換を含み、前記抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＳ３５４Ｃ置換を含む、請求項５３～５５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５７】
タンパク質であって、
（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む、タンパク質。
【請求項５８】
タンパク質であって、
（ａ）配列番号２７１のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号２７２のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）配列番号２７３のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む、タンパク質。
【請求項５９】
請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。
【請求項６０】
請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする１つ以上の核酸を含む、細胞。
【請求項６１】
腫瘍細胞死を増強させる方法であって、前記方法が、前記腫瘍細胞及びナチュラルキラー細胞を有効量の、請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項５９に記載の医薬組成物に曝露することを含む、方法。
【請求項６２】
癌を治療する方法であって、前記方法が、それを必要とする対象に、有効量の、請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。
【請求項６３】
前記癌が、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性Ｂ大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（ＭＡＬＴ）リンパ腫、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、及び急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）からなる群から選択される、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
Ｂ細胞死を増強させる方法であって、前記方法が、前記Ｂ細胞及びナチュラルキラー細

胞を、有効量の請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項５９に記載の医薬組成物に曝露することを含む、方法。
【請求項６５】
自己免疫性炎症性疾患を治療する方法であって、前記方法が、それを必要とする対象に、有効量の請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項５９に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。
【請求項６６】
前記タンパク質が、精製されたタンパク質である、請求項１～５８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６７】
前記タンパク質が、遠心分離、深層濾過、細胞溶解、均質化、凍結融解、アフィニティー精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、及び混合モードクロマトグラフィーからなる群から選択される方法を使用して精製される、請求項６６に記載のタンパク質。
【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、２０２１年９月２９日に出願された米国仮特許出願第６３／２５０，１６０号の利益を主張するものであり、この仮出願の完全な開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、Ｐａｔｅｎｔ　Ｃｅｎｔｅｒを介してＸＭＬファイル形式で提出されたコンピューター可読配列表を含み、その内容全体は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｐａｔｅｎｔ　Ｃｅｎｔｅｒを介して提出された配列表ＸＭＬファイルは、「１４２４７－７００－２２８＿ｓｅｑｌｉｓｔ．ｘｍｌ」という名称であり、２０２２年９月１６日に作成され、３０５，０４６バイトのサイズである。
【０００３】
本出願は、細胞上のＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１６、及びＢ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する多重特異性結合タンパク質、そのようなタンパク質を含む医薬組成物、並びに癌の治療のための方法を含むそのようなタンパク質及び医薬組成物を使用する治療法に関する。
【背景技術】
【０００４】
多大な研究努力にもかかわらず、癌は、世界中の国々で臨床的及び財政的に大きな負担であり続けている。世界保健機関（ＷＨＯ）によると、癌は死因の第２位である。手術、放射線療法、化学療法、生物学的療法、免疫療法、ホルモン療法、幹細胞移植、及び高精度医療は、既存の治療法の１つである。これらの分野における広範な研究にもかかわらず、特に最も侵襲性の強い癌に対する非常に効果的で治癒的な解決策は、未だに特定されていない。更に、既存の抗癌治療法の多くは、実質的に有害な副作用を有する。
【０００５】
癌免疫療法は、それらが高度に特異的であり、患者自身の免疫系を使用して癌細胞の破壊を促進することができるために望ましいものである。二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーなどの融合タンパク質は、腫瘍細胞及びＴ細胞に結合し、腫瘍細胞の破壊を容易にすることが文献に記載されている癌免疫療法である。
【０００６】
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は免疫系の構成要素であり、循環リンパ球のおよそ１５％を占める。ＮＫ細胞は、実際に全ての組織に浸潤し、事前感作を必要とせずに、腫瘍細胞を効果的に殺傷する能力によって当初は特徴付けられた。活性化ＮＫ細胞は、細胞傷害

性Ｔ細胞と同様な手段によって－すなわち、パーフォリン及びグランザイムを含有する細胞溶解性顆粒を介して、並びに細胞死受容体経路を介して標的細胞を殺傷する。活性化ＮＫ細胞はまた、他の白血球の標的組織への動員を推進するＩＦＮ－γなどの炎症性サイトカイン及びケモカインも分泌する。

【０００７】

ＮＫ細胞は、それらの表面上の様々な活性化受容体及び阻害性受容体を通してシグナルに応答する。例えば、ＮＫ細胞が健康な自己細胞に遭遇する場合、それらの活性は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）の活性化を通して阻害される。或いは、ＮＫ細胞が外来細胞又は癌細胞と遭遇する場合、それらは、それらの活性化受容体（例えば、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＣＲ、ＤＮＡＭ１）を介して活性化される。ＮＫ細胞はまた、それらの表面上のＣＤ１６受容体を通して、いくつかの免疫グロブリンの定常領域によっても活性化される。活性化に対するＮＫ細胞の全体的な感受性は、刺激性シグナルと阻害性シグナルとの合計に依存する。ＮＫＧ２Ｄは、本質的に全てのナチュラルキラー細胞によって発現されるＩＩ型膜貫通タンパク質であり、ここでは、ＮＫＧ２Ｄは活性化受容体として機能する。ＮＫＧ２ＤはＴ細胞上でも見出されており、それは共刺激性受容体として作用する。ＮＫＧ２Ｄを介して、ＮＫ細胞機能を調節するための能力は、悪性腫瘍を含む様々な治療背景において有用である。

【０００８】

ＢＡＦＦ－Ｒは、ＢＡＦＦ受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー１３Ｃ（ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ）、ＣＤ２６８、又はＢＲ３とも呼ばれ、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーのＩＩＩ型膜貫通タンパク質である。ＢＡＦＦ－Ｒは、移行後期（Ｔ２）Ｂ細胞において、及び全ての成熟Ｂ細胞上で発現され、胚中心Ｂ細胞で下方制御され、メモリー細胞上で再発現され、形質細胞上で不在である（非特許文献１）。ＢＡＦＦ－Ｒは、Ｂ細胞生存因子であるＢ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）に対する受容体である。ＢＡＦＦは、３つの受容体：ＢＡＦＦ－Ｒ、膜貫通活性化因子及びＣＭＡＬインタラクター（ＴＡＣＩ）、及びＢ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）に関与し得る。これらの３つの受容体のうち、ＢＡＦＦ－Ｒが、濾胞Ｂ細胞及び脾臓辺縁帯Ｂ細胞の発生に関与する主要な受容体である（非特許文献２）。

【０００９】

ＢＡＦＦ／ＢＡＦＦ－Ｒシグナル伝達軸は、Ｂ細胞過形成において役割を果たし得る。ＢＡＦＦ－Ｒの増加した発現、並びにＢＡＦＦの上昇した血清レベルが、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）患者において観察されている（非特許文献３）。ＢＡＦＦ－Ｒにおける一塩基多型（ＳＮＰ）は、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）のリスクの増大と関連している（非特許文献４）。ＢＡＦＦ／ＢＡＦＦ－Ｒ軸もまた、自己免疫性炎症性疾患に関与している（非特許文献５）。一部の全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）患者は、血清中のＢＡＦＦの増大したレベルを有し（非特許文献６）、ＢＡＦＦ－Ｒは、ＳＬＥにおいて、血液Ｂ細胞上で一貫して占拠している（非特許文献７）。自己反応性Ｂ細胞が、防御性Ｂ細胞と比較して、それらの生存に関して、ＢＡＦＦに大きく依存しているという観察を考慮すると（非特許文献８）、ＢＡＦＦの以上に高いレベルは、自己反応性Ｂ細胞の生存を高めることによって、自己免疫性疾患の病因に寄与し得ることが提案されている。

【００１０】

したがって、本分野では、癌及び自己免疫性炎症性疾患の治療で使用するためのＢＡＦＦ－Ｒに結合する新たな有用なタンパク質に対するニーズが依然としてある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｄａｖｉｄｓｏｎ（２０１２）Ｃｕｒｒ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｒｅｐ．，１４（４）：２９５－３０２

【非特許文献２】Ｓｃｈｉｅｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９３：２１１１－１４

【非特許文献３】Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ａｄｖ．Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，２５（５）：８３７－４４
【非特許文献４】Ｊｅｓｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｔｕｍｏｕｒ　Ｂｉｏｌ．，３７（１０）：１３６１７－２６
【非特許文献５】Ｍａｃｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１９０：１６９７－１７１０
【非特許文献６】Ｃｈｅｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．，４４：１３１３－１９
【非特許文献７】Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．，５２：３９４３－５４
【非特許文献８】Ｌｅｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２０：４４１－５３

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１２】
本出願は、ナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＧＤ１６受容体、並びにＢＡＦＦ－Ｒに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。そのようなタンパク質は、二種類以上のＮＫ活性化受容体に関与することができ、天然リガンドのＮＫＧ２Ｄへの結合をブロックし得る。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいて、ＮＫ細胞をアゴナイズすることができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいて、及び齧歯類並びにカニクイザルなどの他の種において、ＮＫ細胞をアゴナイズすることができる。本明細書で開示されるタンパク質のいずれか１つを含有する製剤、タンパク質を発現する１つ以上の核酸を含有する細胞、及びこのタンパク質を使用して腫瘍細胞死を増強する方法も提供される。
【００１３】
したがって、一態様では、本出願は、
（ａ）ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位と、
（ｂ）Ｂ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含むタンパク質を提供する。
【００１４】
本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はＦａｂフラグメントであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位はｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位はＦａｂフラグメントである。
【００１５】
本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位を更に含む。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位はＦａｂフラグメントである。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位は各々ｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位及び追加の抗原部位のアミノ酸配列は同一である。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位のアミノ酸配列は異なる。
【００１６】
本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖは、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体定常ドメイン若しくはその一部に連結しており、ｓｃＦｖは重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する

各ｓｃＦｖは、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体定常ドメイン若しくはその一部に連結しており、ｓｃＦｖは重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ヒンジは、アミノ酸配列Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙを更に含む。

【００１７】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ内において、ｓｃＦｖの重鎖可変ドメインは、ｓｃＦｖの軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する。いくつかの実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内において、ｓｃＦｖの重鎖可変ドメインは、ｓｃＦｖの軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する。いくつかの実施形態では、ジスルフィド架橋は、重鎖可変ドメインのＣ４４と軽鎖可変ドメインのＣ１００との間に形成される（Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って番号付けされる）。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、可動性リンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結している。いくつかの実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、可動性リンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結している。ある特定の実施形態では、可動性リンカーは、$(G_4S)_4$を含む。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＣ末端に位置付けられている。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＣ末端に位置付けられている。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＮ末端に位置付けられている。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する各ｓｃＦｖ内において、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＮ末端に位置付けられている。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合するＦａｂフラグメントは、抗原結合部位とＦｃ若しくはその一部との間には位置付けられていない。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合するＦａｂフラグメントは、抗原結合部位とＦｃ若しくはその一部との間には位置付けられていない。

【００１８】

別の態様では、本明細書では、

（ａ）ＮＫＧ２Ｄに結合するＦａｂフラグメントを含む第１の抗原結合部位と、

（ｂ）Ｂ細胞活性化因子受容体（ＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む第２の抗原結合部位と、

（ｃ）ＣＤ１６に結合するヘテロ二量体を形成する第１の抗体定常ドメイン及び第２の抗体定常ドメインを含むＦｃドメインと、を含むタンパク質であって、

ｓｃＦｖが、ヒンジを介して第１の抗体定常ドメインのＮ末端に連結し、Ｆａｂが第２の抗体定常ドメインのＮ末端に連結している、タンパク質が提供される。

【００１９】

いくつかの実施形態では、ヒンジは、Ｇｌｙ－Ｓｅｒを含む。

【００２０】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第１の抗原結合部位は、ヒトＮＫＧ２Ｄに結合する。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、それぞれ配列番号８１、８２、及び１１２のアミノ酸配列を含む相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、及び相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むＶＨと、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、それぞれ配列番号８１、８２、及び９７のアミノ酸配列によって表されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含むＶＨと、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列によって表されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号９５に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の

実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号９５のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。

【００２１】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、それぞれ配列番号２６０、２４９、及び２６１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む重鎖可変ドメインと、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変ドメインと、を含む。

【００２２】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２４８のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む重鎖可変ドメインと、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２５０に少なくとも９０％同一の重鎖可変ドメインと、配列番号２５１に少なくとも９０％同一の軽鎖可変ドメインと、を含む。

【００２３】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２５０と比べてＧ４４Ｃ置換を有するＶＨと、配列番号２５１と比べてＧ１００Ｃ置換を有するＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬとを含むか、又は配列番号２５０のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５１のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２５０のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５１のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。

【００２４】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含み、ｓｃＦｖは、配列番号２５２のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖを含み、ｓｃＦｖは、配列番号２５４及び２５５からなる群から選択される配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖを含み、ｓｃＦｖは、配列番号２５４に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖを含み、ｓｃＦｖは、配列番号２５４のアミノ酸配列を含む。

【００２５】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号２７０に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号２７０のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号２７１に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号２７１のアミノ酸配列を含む。

【００２６】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定された、５ｎＭ以下の解離定数（K_D）でヒトＢＡＦＦ－Ｒに結合する。

【００２７】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、ＢＡＦＦ－ＲのＢＡＦＦへの結合を（例えば、競合結合アッセイで測定された、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９９％だけ）阻害する（例えば、ブロックする）。

【００２８】

別の態様では、本明細書では、

（ａ）抗ＮＫＧ２Ｄ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第１の抗原結合部位であって、ＶＨが配列番号９５のアミノ酸配列を含み、ＶＬが配列番号８５のアミノ酸配列を含む、第１の抗原結合部位と、
（ｂ）抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第２の抗原結合部位であって、ＶＨが配列番号２５２のアミノ酸配列を含み、ＶＬが配列番号２５３のアミノ酸配列を含む、第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含むタンパク質が提供される。
【００２９】
別の態様では、本明細書では、
（ａ）抗ＮＫＧ２Ｄ抗体のＶＨ及びＶＬを含む第１の抗原結合部位であって、ＶＨが配列番号９５のアミノ酸配列を含み、ＶＬが配列番号８５のアミノ酸配列を含む、第１の抗原結合部位と、
（ｂ）配列番号２５４のアミノ酸配列を含む第２の抗原結合部位と、
（ｃ）ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第３の抗原結合部位と、を含むタンパク質を提供される。
【００３０】
本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、抗体Ｆｃドメインは、ヒトＩｇＧ１抗体Ｆｃドメインである。いくつかの実施形態では、抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部は、配列番号１１８に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗体Ｆｃドメインの少なくとも１つのポリペプチド鎖は、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされたＱ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１、及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む。ある特定の実施形態では、抗体Ｆｃドメインの少なくとも１つのポリペプチド鎖は、ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされたＱ３４７Ｅ、Ｑ３４７Ｒ、Ｙ３４９Ｓ、Ｙ３４９Ｋ、Ｙ３４９Ｔ、Ｙ３４９Ｄ、Ｙ３４９Ｅ、Ｙ３４９Ｃ、Ｌ３５１Ｋ、Ｌ３５１Ｄ、Ｌ３５１Ｙ、Ｓ３５４Ｃ、Ｅ３５６Ｋ、Ｅ３５７Ｑ、Ｅ３５７Ｌ、Ｅ３５７Ｗ、Ｋ３６０Ｅ、Ｋ３６０Ｗ、Ｑ３６２Ｅ、Ｓ３６４Ｋ、Ｓ３６４Ｅ、Ｓ３６４Ｈ、Ｓ３６４Ｄ、Ｔ３６６Ｖ、Ｔ３６６Ｉ、Ｔ３６６Ｌ、Ｔ３６６Ｍ、Ｔ３６６Ｋ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ｅ、Ｌ３６８Ａ、Ｌ３６８Ｄ、Ｋ３７０Ｓ、Ｎ３９０Ｄ、Ｎ３９０Ｅ、Ｋ３９２Ｌ、Ｋ３９２Ｍ、Ｋ３９２Ｖ、Ｋ３９２Ｆ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｔ３９４Ｆ、Ｄ３９９Ｒ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｖ、Ｓ４００Ｋ、Ｓ４００Ｒ、Ｄ４０１Ｋ、Ｆ４０５Ａ、Ｆ４０５Ｔ、Ｆ４０５Ｌ、Ｙ４０７Ａ、Ｙ４０７Ｉ、Ｙ４０７Ｖ、Ｋ４０９Ｆ、Ｋ４０９Ｗ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｒ、Ｔ４１１Ｄ、Ｔ４１１Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、及びＫ４３９Ｅから選択される、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む。ある特定の実施形態では、抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖は、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含み、抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１、及びＫ４３９から選択される１つ以上の位置で、配列番号１１８と比べて１つ以上の突然変異を含む（ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた）。ある特定の実施形態では、抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含み、抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ及びＦ４０５Ｔ置換を含む（ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた）。ある特定

の実施形態では、抗体重鎖定常領域の１つのポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＦ４０５Ｌ置換を含み、抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＫ４０９Ｒ置換を含む（ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた）。ある特定の実施形態では、抗体重鎖定常領域の１つ以上のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＹ３４９Ｃ置換を含み、抗体重鎖定常領域の他のポリペプチド鎖は、配列番号１１８と比べてＳ３５４Ｃ置換を含む（ＥＵナンバリングシステムに従って番号付けされた）。

【００３１】

別の態様では、本出願は、

（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、

（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含むタンパク質を提供する。

【００３２】

別の態様では、本出願は、

（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９０％、（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、

（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９０％、（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９０％、（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含むタンパク質を提供する。

【００３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、

（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、

（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、

（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、

（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、

（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、

（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む第３

のポリペプチドと、を含む。
【００３６】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、
（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む。
【００３７】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、
（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む。
【００３８】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、
（ａ）配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号１９４のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、
（ｃ）配列番号１９５のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含む。
【００３９】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号２７０のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。
【００４０】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９４のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるタンパク質は、配列番号１９５のアミノ酸配列に少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。
【００４２】
別の態様では、本出願は、
（ａ）配列番号２７１のアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）配列番号２７２のアミノ酸配列を含む第２のポリペプチドと、

（ｃ）配列番号２７３のアミノ酸配列を含む第３のポリペプチドと、を含むタンパク質を提供する。

【００４３】

別の態様では、本出願は、本明細書に開示されるタンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【００４４】

別の態様では、本出願は、本明細書に開示されるタンパク質をコードする１つ以上の核酸を含む細胞を提供する。

【００４５】

別の態様では、本出願は、腫瘍細胞死を増強する方法を提供し、本方法は、腫瘍細胞及びナチュラルキラー細胞を、有効量の本明細書に開示されるタンパク質又は本明細書に開示される医薬組成物に曝露することを含む。

【００４６】

別の態様では、本出願は、癌を治療する方法を提供し、本方法は、それを必要とする対象に有効量の本明細書に開示されるタンパク質又は本明細書に開示される医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、癌は、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性Ｂ大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（ＭＡＬＴ）リンパ腫、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、及び急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）からなる群から選択される。

【００４７】

別の態様では、本出願は、Ｂ細胞死を増強する方法を提供し、本法は、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞を有効量の本明細書に開示されるタンパク質又は本明細書に開示される医薬組成物に曝露することを含む。

【００４８】

別の態様では、本出願は、自己免疫性炎症性疾患を治療する方法を提供し、本方法は、それを必要とする対象に有効量の本明細書に開示されるタンパク質又は本明細書に開示される医薬組成物を投与することを含む。

【００４９】

本明細書に開示されるタンパク質のいくつかの実施形態では、タンパク質は、精製タンパク質である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、遠心分離、深層濾過、細胞溶解、均質化、凍結融解、アフィニティー精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、及び混合モードクロマトグラフィーからなる群から選択される方法を使用して精製される。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１】図１は、ヘテロ二量体、多重特異性抗体、例えば、三重特異性結合タンパク質（ＴｒｉＮＫＥＴ）の表現である。各アームは、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン、又はＢＡＦＦ－Ｒ結合ドメインのいずれかを表し得る。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン及びＢＡＦＦ－Ｒ結合ドメインは、共通の軽鎖を共有することができる。

【００５１】

【図２－１】図２Ａ－２Ｅは、多重特異性結合タンパク質、例えば、三重特異性結合タンパク質（ＴｒｉＮＫＥＴ）の５つの例示的なフォーマットを図示する。図２Ａに示されるように、ＮＫＧ２Ｄ－結合ドメイン又はＢＡＦＦ－Ｒ結合ドメインのいずれかは、ｓｃＦｖフォーマット（左アーム）を取ることができる。ＮＫＧ２Ｄ標的化ｓｃＦｖ、ＢＡＦＦ－Ｒ標的化Ｆａｂフラグメント、及びヘテロ二量体化抗体定常領域を含有する抗体は、本明細書ではＦ３－ＴｒｉＮＫＥＴと称される。ＢＡＦＦ－Ｒ標的化ｓｃＦｖ、ＮＫＧ２Ｄ標的化Ｆａｂフラグメント、及びＣＤ１６に結合するヘテロ二量体化抗体定常領域／ドメインを含有する抗体は、本明細書ではＦ３’－ＴｒｉＮＫＥＴと称される（図２Ｅ）。図２Ｂに示されるように、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン及びＢＡＦＦ－Ｒ結合ドメインの両方は

、ｓｃＦｖフォーマットを取ることができる。図２Ｃ～図２Ｄは、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する２つの抗原結合部位と、ヘテロ二量体化抗体定常領域に融合されたＮＫＧ２Ｄ－結合部位とを含む３つの抗原結合部位を有する抗体の図である。これらの抗体フォーマットは、本明細書ではＦ４－ＴｒｉＮＫＥＴと称される。図２Ｃは、２つのＢＡＦＦ－Ｒ結合部位がＦａｂフラグメントフォーマットにあり、ＮＫＧ２Ｄ結合部位がｓｃＦｖフォーマットにあることを例証している。図２Ｄは、ＢＡＦＦ－Ｒ結合部位がｓｃＦｖフォーマットにあり、ＮＫＧ２Ｄ結合部位がｓｃＦｖフォーマットにあることを例証している。図２Ｅは、ＢＡＦＦ－Ｒ標的化ｓｃＦｖ、ＮＫＧ２Ｄ標的化Ｆａｂフラグメント、及びＣＤ１６に結合するヘテロ二量体化抗体定常領域／ドメイン（「ＣＤドメイン」）を含有する三重特異性抗体（ＴｒｉＮＫＥＴ）を表す。抗体フォーマットは、本明細書ではＦ３’－ＴｒｉＮＫＥＴと称される。ある特定の例示的な多重特異性結合タンパク質において、抗体定常領域上のヘテロ二量体化突然変異は、１つの定常ドメイン上のＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗと、反対側の定常ドメイン上のＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ及びＦ４０５Ｔと、を含む（ＣＤドメインにおける三角形の鍵と鍵穴形状として示される）。Ｆａｂフラグメントの重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間の太字のバーは、ジスルフィド結合を表す。

【図２－２】同上。

【図２－３】同上。

【００５２】

【図３】図３は、ＩｇＧ様形状を維持する三官能性、二重特異性抗体であるトリオマブ形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。このキメラは、各々が２つの親抗体に由来する１つの軽鎖及び１つの重鎖を有する２つのハーフ抗体からなる。トリオマブ形態は、ラット抗体の１／２とマウス抗体の１／２とからなるヘテロ二量体構築物であり得る。

【００５３】

【図４】図４は、ノブイントゥホール（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）（ＫＩＨ）技術に関与するＫｉＨ共通軽鎖形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。ＫｉＨは、標的１及び２に結合する２つのＦａｂフラグメントと、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されるＦｃとを含有するヘテロ二量体である。ＫｉＨフォーマットのＴｒｉＮＫＥＴは、２つの異なる重鎖及び両方の重鎖と対合する共通の軽鎖を含有する、標的１及び標的２に結合する２つのＦａｂフラグメントを有するヘテロ二量体構築物であり得る。

【００５４】

【図５】図５は、２つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを可動性の天然に存在するリンカーを介して結合させて、四価のＩｇＧ様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ（商標））形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。ＤＶＤ－Ｉｇ（商標）は、ホモ二量体構築物であり、ここでは、抗原２を標的化すれる可変ドメインが抗原１を標的化するＦａｂフラグメントの可変ドメインのＮ末端に融合している。ＤＶＤ－Ｉｇ（商標）形態は、通常のＦｃを含有する。

【００５５】

【図６】図６は、Ｆｃに融合した標的１及び標的２に結合する２つのＦａｂフラグメントを含有するヘテロ二量体構築物である、直交するＦａｂフラグメント界面（Ｏｒｔｈｏ－Ｆａｂ）形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。軽鎖（ＬＣ）－重鎖（ＨＣ）対合は、直交する界面によって確実になる。ヘテロ二量体化は、Ｆｃ中の突然変異によって確実となる。

【００５６】

【図７】図７は、２－ｉｎ－１ＩｇフォーマットのＴｒｉＮＫＥＴの表現である。

【００５７】

【図８】図８は、Ｆｃに融合した標的１及び標的２に結合する２つの異なるＦａｂフラグメントを含有するヘテロ二量体構築物である、ＥＳ形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。ヘテロ二量体化は、Ｆｃ中の静電的ステアリング突然変異によって確実になる。

【００５８】

【図９】図９は、Ｆａｂアーム交換形態：重鎖及び付属の軽鎖（班分子）を別の分子から

の重鎖－軽鎖対で取り替え、二重特異性抗体をもたらすことによってＦａｂフラグメントを交換する抗体のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。Ｆａｂアーム交換形態（ｃＦａｅ）は、標的１及び２に結合する２つのＦａｂフラグメントと、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたＦｃとを含有するヘテロ二量体である。

【００５９】

【図１０】図１０は、標的１及び２に結合する２つのＦａｂフラグメントと、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたＦｃとを含有するヘテロ二量体である、ＳＥＥＤ形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。

【００６０】

【図１１】図１１は、ロイシンジッパーが２つの異なるＨＣのヘテロ二量体化を誘発させるために使用される、ＬｕＺ－Ｙ形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。ＬｕＺ－Ｙ形態は、Ｆｃに融合した標的１及び標的２に結合する２つの異なるｓｃＦａｂを含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、ＦｃのＣ末端位融合したロイシンジッパーモチーフを通して確実になる。

【００６１】

【図１２】図１２は、Ｃｏｖ－Ｘ体形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。

【００６２】

【図１３－１】図１３Ａ－１３Ｂは、二量体化突然変異によって安定化されたＦｃに融合した２つの異なるＦａｂフラグメントを有するヘテロ二量体構築物であり、抗原１を標的化する１つのＦａｂフラグメントがカッパＬＣを含有し、抗原２を標的化する第２のＦａｂフラグメントがラムダＬＣを含有する、κλ－Ｂｏｄｙ形態のＴｒｉＮＫＥＴの表現である。図１３Ａは、κλ－Ｂｏｄｙの１つの形態の例示的な表現であり、図１３Ｂは、別のκλ－Ｂｏｄｙの例示的な表現である。

【図１３－２】同上。

【００６３】

【図１４】図１４は、標的１に結合するＦａｂフラグメント及び標的２に結合するｓｃＦａｂを含み、これらの両方がＦｃドメインに融合している、ＯＡｓｃ－ＦａｂヘテロＦ二量体構築物の表現である。ヘテロ二量体化は、Ｆｃドメイン中の突然変異によって確実になる。

【００６４】

【図１５】図１５は、抗原１及び２に結合する２つの異なるＦａｂフラグメントとヘテロ二量体化突然変異によって安定化されているＦｃとを含有するヘテロ二量体構築物である、ＤｕｅｔＭａｂの表現である。Ｆａｂフラグメント１及び２は、正確な軽鎖及び重鎖の対合を確実にする差異的Ｓ－Ｓ架橋を含有する。

【００６５】

【図１６】図１６は、標的１及び２に結合する２つの異なるＦａｂフラグメントと、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたＦｃとを有するヘテロ二量体構築物である、ＣｒｏｓｓｍＡｂの表現である。ＣＬ及びＣＨ１ドメインとＶＨ及びＶＬドメインとは交換され、例えば、ＣＨ１がＶＬと一列に融合し、ＣＬがＶＨと一列に融合する。

【００６６】

【図１７】図１７は、抗原２に結合するＦａｂフラグメントが、抗原１に結合するＦａｂフラグメントのＨＣのＮ末端に融合しているホモ二量体構築物である、Ｆｉｔ－Ｉｇの表現である。構築物は野生型Ｆｃを含有する。

【００６７】

【図１８－１】図１８Ａ－１８Ｃは、ｈＣＯＨ－２（図１８Ａ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｈｕ９．１－７３（図１８Ｂ）、及びイアナルマブ（ｉａｎａｌｕｍａｂ）ベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞障害性増強突然変異を含有しない）（図１８Ｃ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ陽性ＲＡＪＩ細胞への結合を示す折れ線グラフである。

【図１８－２】同上。
【００６８】
【図１９－１】図１９Ａ－１９Ｃは、ｈＣＯＨ－２（図１９Ａ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｈｕ９．１－７３（図１９Ｂ）、及びイアナルマブベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞障害性増強突然変異を含有しない）（図１９Ｃ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴの存在下での初代ＮＫ細胞によるＢＡＦＦ－Ｒ陽性ＲＡＪＩ細胞のＮＫ細胞媒介性溶解を示す折れ線グラフである。
【図１９－２】同上。
【００６９】
【図２０－１】図２０Ａ－２０Ｃは、ｈＣＯＨ－２（図２０Ａ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｈｕ９．１－７３（図２０Ｂ）、及びイアナルマブベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞障害増強突然変異を含有しない）（図２０Ｃ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴの存在下でのＫＨＹＧ－ＣＤ１６Ｖ細胞によるＢＡＦＦ－Ｒ陽性ＲＡＪＩ細胞のＮＫ細胞媒介性溶解を示す線グラフである。
【図２０－２】同上。
【００７０】
【図２１】図２１は、示された抗体によるＣＨＯ細胞上で発現されたｈＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合のブロッキングアッセイからの蛍光出力を示すグラフである。
【００７１】
【図２２－１】図２２Ａ－２２Ｄは、ｈＢＡＦＦ－Ｒへの示された抗体の結合を示すＣＨＯ細胞上の結合アッセイからの蛍光出力（図２２Ａ、図２２Ｂ）又は示された抗体によるＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合のブロッキングアッセイの蛍光出力（図２２Ｃ、図２２Ｄ）のグラフである。
【図２２－２】同上。
【００７２】
【図２３－１】図２３Ａ－２３Ｅは、抗原を含まない対照（図２３Ａ）、ｈ－ＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ（図２３Ｂ）、無関係のｈＦｃ（図２３Ｃ）、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ＧＳＴ（図２３Ｄ）、又は無関係のＧＳＴ（図２３Ｅ）への酵母上で発現されたＡＢ０３６９ｓｃＦｖの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。縦軸は、Ｆｌａｇエピトープタグの検出によって測定されたｓｃＦｖ発現を示し、横軸は、ストレプトアビジン－ＰＥの検出によって測定されたＢＡＦＦ－Ｒ構築物のビオチン化対照のｓｃＦｖへの結合を示す。
【図２３－２】同上。
【００７３】
【図２４】図２４Ａ－２４Ｂは、ＡＢ０３６９又は示された対照のヒトＢＡＦＦ－Ｒ（図２４Ａ）への結合又はカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ（図２４Ｂ）への結合を示すグラフである。
【００７４】
【図２５－１】図２５Ａ－２５Ｇは、ＡＢ０３６９に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位との多重特異性結合タンパク質の多特異性アッセイを詳述する。図２５Ａは、アッセイの概略図である。図２５Ｂ－２５Ｇは、多特異性試薬（ＰＳＲ）の不在下での（上部パネル）又はその存在下での（下部パネル）ＡＢ０３６９（左パネル）、トラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）陰性対照（中央パネル）、又はイキセキズマブ（ｉｘｅｋｉｚｕｍａｂ）陽性対照（右パネル）のグラフを示す。
【図２５－２】同上。
【図２５－３】同上。
【００７５】
【図２６】図２６は、ＡＢ０３６９に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位との多重特異性結合タンパク質によって誘導された、Ｒａｍｏｓ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害

性アッセイを示すグラフである。
【００７６】
【図２７】図２７は、ＡＢ０３６９又は示されたものによるＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合の遮断を示す結合アッセイからの蛍光出力を示すグラフである。
【００７７】
【図２８－１】図２８Ａ－２８Ｄは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓの親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖ又は連続した選択ラウンド後の酵母上で発現された親和性成熟によって産生されたライブラリーから選択されたクローンへの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。図２８Ａは、親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖへの結合を示し、図２８Ｂは、クローン選択の第１のラウンドからの試料への結合を示し、図２８Ｃは、クローン選択の第２のラウンドからの試料への結合を示し、図２８Ｄは、クローン選択の第２のラウンドからの出力への結合を示す。
【図２８－２】同上。
【００７８】
【図２９－１】図２９Ａ－２９Ｅは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－ＨｉｓのＡＢ０３６９及び酵母上で発現された親和性成熟されたｓｃＦｖクローンへの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。図２９Ａは親ＡＢ０３６９への結合を示し、図２９ＢはＡＢ０６０５への結合を示し、図２９ＣはＡＢ０６２２への結合を示し、図２９ＤはＡＢ０６２２への結合を示し、図２９Ｅはイアナルマブベースの抗原結合部位への結合を示す。
【図２９－２】同上。
【００７９】
【図３０－１】図３０Ａ－３０Ｃは、ＡＢ０３６９の親和性成熟から開発された多重特異性結合タンパク質のＢＡＦＦ－Ｒ結合及び細胞傷害性を実証するグラフである。図３０Ａは、示されたクローンに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質のＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－Ｒへの結合を示すグラフである。図３０Ｂは、示されたクローンに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質によって誘導された、Ｒａｍｏｓ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。図３０Ｃは、ＡＢ０６２２に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質によって誘導された、Ｒａｍｏｓ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。
【図３０－２】同上。
【００８０】
【図３１－１】図３１Ａ－３１Ｅは、ＡＢ００６０５及びＡＢ０６０６に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質の多特異性アッセイを詳述する。図３１Ａは、アッセイの概略図である。図３１Ｂ～図３１Ｅは、多特異性試薬（ＰＳＲ）の不在での（上部パネル）又は存在下での（下部パネル）ＡＢ０６０５（左パネル）又はＡＢ０６０６（右パネル）のグラフを示す。
【図３１－２】同上。
【図３１－３】同上。
【００８１】
【図３２】図３２Ａ－３２Ｃは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓの親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖ又は選択の連続したラウンド後に親和性成熟によって産生され、酵母上で発現されたライブラリーから選択されたクローンへの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。図３２Ａは、親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖへの結合を示し、図３２Ｂはクローン選択の第１のラウンドからの試料への結合を示し、図３２Ｃはクローン選択の第２のラウンドからの試料への結合を示す。
【００８２】
【図３３－１】図３３Ａ－３３Ｅは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－ＨｉｓのＡＢ０３６９及び酵母上で発現された親和性成熟されたｓｃＦｖクローンへの結合を示すフローサイトメ

トリーのプロットである。図３３Ａは親ＡＢ０３６９への結合を示し、図３３ＢはＡＢ０６７９への結合を示し、図３３ＣはＡＢ０６８１への結合を示し、図３３ＤはＡＢ０６８２への結合を示し、図３３Ｅはイアナルマブベースの抗原結合部位への結合を示す。

【図３３－２】同上。

【００８３】

【図３４－１】図３４Ａ－３４Ｃは、ＡＢ０３６９の親和性成熟から開発された多重特異性結合タンパク質へのＢＡＦＦ－Ｒ結合を実証するグラフである。図３４Ａは、示されたクローンに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質のＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－Ｒへの結合を示すグラフである。図３４Ｂは、示されたクローンに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質のＣＨＯ細胞上で発現されたカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合を示すグラフである。図３４Ｃは、示された抗体によるＣＨＯ細胞上で発現されたＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合の遮断を示す結合アッセイからの蛍光出力を示すグラフである。

【図３４－２】同上。

【００８４】

【図３５】図３５は、ＡＢ０６７９、ＡＢ０５６８、又はＴｏｏｌ－Ｆ３’陽性対照に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。

【００８５】

【図３６－１】図３６Ａ－３６Ｄは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓの選択の連続したラウンド後に酵母上で発現された親和性成熟によって産生されたライブラリーから選択される親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖクローンへの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。図３６Ａは親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖへの結合を示す、図３６Ｂはクローン選択の第１のラウンドからの試料への結合を示し、図３６Ｃはクローン選択の第２のラウンドからの試料への結合を示し、図３６Ｄはクローン選択の第３のラウンドからの試料への結合を示す。

【図３６－２】同上。

【００８６】

【図３７－１】図３７Ａ－３７Ｆは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－ＨｉｓのＡＢ０３６９及び酵母上で発現された親和性成熟されたｓｃＦｖクローンへの結合を示すフローサイトメトリーのプロットである。図３７Ａは親ＡＢ０３６９への結合を示し、図３７ＢはＡＢ０６８２への結合を示し、図３７ＣはＡＢ０８９８への結合を示し、図３７ＤはＡＢ０８９９への結合を示し、図３７ＥはＡＢ０９００への結合を示し、図３７Ｆはイアナルマブベースの抗原結合部位への結合を示す。

【図３７－２】同上。

【００８７】

【図３８】図３８は、ＡＢ０８９８、ＡＢ０８９９、又はＡＢ０９００に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイを示すグラフである。

【００８８】

【図３９】図３９Ａ－３９Ｃは、ＡＢ０８９８（図３９Ａ）、ＡＢ０８９９（図３９Ｂ）、及びＡＢ０９００（図３９Ｃ）の示差走査熱量測定（ＤＳＣ）プロファイルのグラフを示す。

【００８９】

【図４０】図４０は、１ｍＭの非ビオチン化ｈＢＡＦＦＲ－Ｆｃとのインキュベーションによるチャレンジ前（左）及びチャレンジ後（右）の酵母上で発現されたｓｃＦｖクローンのビオチン化ｈＢＡＦＦＲ－Ｆｃへの結合のフローサイトメトリーのプロットを示す。

【００９０】

【図４１－１】図４１Ａ－４１Ｂは、１ｍＭの非ビオチン化ｈＢＡＦＦＲ－Ｆｃとのインキュベーションによるチャレンジ前（図４１Ａ）及びチャレンジ後（図４１Ｂ）の酵母上

で発現されたｓｃＦｖクローンのビオチン化ｈＢＡＦＦＲ－Ｆｃへの結合のフローサイトメトリーのプロットを示す。試験されたクローンは（左から右に向かって）、ＡＢ１０８０、ＡＢ１０８１、ＡＢ１０８４、ＡＢ１０８５、及びイアナルマブである。

【図４１－２】同上。

【図４１－３】同上。

【図４１－４】同上。

【００９１】

【図４２】図４２Ａ－４２Ｂは、示された抗体クローンのヒトＢＡＦＦ－Ｒへの結合（図４２Ａ）又はカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合（図４２Ｂ）を示すグラフである。

【００９２】

【図４３－１】図４３Ａ－４３Ｉは、ＡＢ１０８０又はＡＢ１０８１に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質の多特異性アッセイを詳述する。図４３Ａは、アッセイの概略図である。図４３Ｂ～図４３Ｉは、多特異性試薬（ＰＳＲ）の不在下での（上部パネル）又は存在下での（下部パネル）ＡＢ１０８０（左パネル）、ＡＢ１０８１（中央パネル）、トラスツズマブ陰性対照（中央の右パネル）又はイキセキズマブ陽性対照（右パネル）のグラフを示す。

【図４３－２】同上。

【図４３－３】同上。

【００９３】

【図４４】図４４Ａ－４４Ｂは、Ｔｏｏｌ陽性対照と比較した、ＡＢ１０８０（図４４Ａ）又はＡＢ１０８５（図４４Ｂ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。

【００９４】

【図４５】図４５は、示された抗体クローンによる、ＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合のブロッキングアッセイからの蛍光出力を示すグラフである。

【００９５】

【図４６－１】図４６Ａ－４６Ｄは、ＡＢ１０８０（図４６Ａ）、ＡＢ１０８１（図４６Ｂ）、ＡＢ１０８４（図４６Ｃ）、及びＡＢ１０８５（図４６Ｄ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質のナノデュアル走査蛍光測定（ナノＤＳＦ）分析のグラフを示す。

【図４６－２】同上。

【００９６】

【図４７】図４７は、示された抗体に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を有する多重特異性結合タンパク質の疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）分析のグラフを示す。

【００９７】

【図４８】図４８は、示されたベンチマーク生物製剤と比較したＡＢ１６１２のＨＩＣ分析のグラフを示す。

【００９８】

【図４９】図４９Ａ－４９Ｂは、カニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの（図４９Ａ）又はヒトＢＡＦＦ－Ｒへの（図４９Ｂ）示された抗体クローンの結合を示すグラフである。

【００９９】

【図５０】図５０は、示された抗体による、ＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ－ビオチン結合の遮断を示す結合アッセイからの蛍光出力を示すグラフである。

【０１００】

【図５１】図５１Ａ－５１Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの表面電荷分布を示す。３つの配向性が示されている：両方の面（左パネル：正面図；中心パネル：背面図）並びに抗原誘導性表面（右パネル：上面図）。正

に帯電した領域は青色で着色され、負に帯電した領域は赤色で着色され、疎水性表面は白で着色されている。

【０１０１】

【図５２－１】図５２Ａ－５２Ｅは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの表面パッチ及びＣＤＲ長の評価を示すグラフである。実線及び対応する矢印は、３７７の後期治療用抗体のデータベースを参照したＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの採点法を示す。図５２Ａ及び図５２Ｂにおいて、２本の内側の点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、最も外側の２本の点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。図５２Ｃ～図５２Ｅの各プロットにおいて、２本の点線があり、１本は実線のより近くにあり、他方はより遠くにある。実線により近い点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、実線により遠い点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。

【図５２－２】同上。

【０１０２】

【図５３】図５３Ａ－５３Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ結合アームの表面電荷分布を示す。３つの配向性が示されている：両方の面（左パネル：正面図；中心パネル：背面図）並びに抗原誘導性表面（右パネル：上面図）。正に帯電した領域は青色で着色され、負に帯電した領域は赤色で着色され、疎水性表面は白で着色されている。

【０１０３】

【図５４－１】図５４Ａ－５４Ｅは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ－Ｒ結合アームの表面パッチ及びＣＤＲ長の評価を示すグラフである。実線及び対応する矢印は、３７７の後期治療用抗体のデータベースを参照したＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの採点法を示す。図５４Ａ及び図５４Ｂにおいて、２本の内側の点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、最も外側の２本の点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。図５４Ｃ～図５４Ｅの各プロットにおいて、２本の点線があり、１本は実線のより近くにあり、他方はより遠くにある。実線により近い点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、実線により遠い点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。

【図５４－２】同上。

【０１０４】

【図５５－１】図５５Ａ－５５Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＨＩＣ分析（図５５Ａ）及びアダリムマブ（ａｄａｌｉｍｕｍａｂ）とペムブロリズマブ（ｐｅｍｂｒｏｌｉｚｕｍａｂ）との比較を示すクロマトグラムである（図５５Ｂ）。

【図５５－２】同上。

【０１０５】

【図５６】図５６は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのキャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）プロファイリングを示すグラフである。

【０１０６】

【図５７】図５７Ａ－５７Ｂは、ＰＢＳ　ｐＨ７．４中（図５７Ａ）及びＨＳＴ　ｐＨ６．０中（図５７Ｂ）のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＤＳＣプロファイリングを示すグラフである。

【０１０７】

【図５８】図５８Ａ－５８Ｂは、ＫｉｎｅｘａによるＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ結合細胞ベースのＢＡＦＦ－Ｒのｎ曲線分析（図５８Ａ）及び信頼区間（図５８Ｂ）を示すグラフである。

【０１０８】

【図５９】図５９Ａ－５９Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及び対

応する親ｍＡｂのアイソジェニックヒトＢＡＦＦ－Ｒ－ＣＨＯ細胞（図５９Ａ）並びにカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ－ＣＨＯ細胞（図５９Ｂ）への結合を示すグラフである。

【０１０９】

【図６０】図６０Ａ－６０Ｆは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ＋腫瘍細胞株への結合を示すグラフである。ＢＪＡＢ（図６０Ａ）、Ｒａｊｉ（図６０Ｂ）、ＲＬ（図６０Ｃ）、Ｒｓ４；１１（図６０Ｄ）、Ｊｅｋｏ－１（図６０Ｅ）、ＳＵＤＨＬ－６細胞（図６０Ｆ）の存在下で滴定を行った。ＦＯＢ＝染色された試料対非染色の試料のバックグラウンドに対する倍率。

【０１１０】

【図６１－１】図６１Ａ－６１Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＮＫＧ２Ｄへの結合の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を示すグラフである。色付きの線は生データを表し、黒色トレースは１：１の結合フィットを表す（上部パネル）。対応する定常状態がフィットしている（下部パネル）。垂直線は、定常状態K_Dを意味する。

【図６１－２】同上。

【０１１１】

【図６２－１】図６２Ａ－６２Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＮＫＧ２Ｄへの結合のＳＰＲを示すグラフである。色付きの線は生データを表し、黒色トレースは１：１の結合フィットを表す（上部パネル）。対応する定常状態がフィットしている（下部パネル）。垂直線は、定常状態K_Dを意味する。

【図６２－２】同上。

【０１１２】

【図６３－１】図６３Ａ－６３Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８（上部パネル）又はトラスツズマブ（下部パネル）への結合のＳＰＲを示すグラフである。色付きの線は生データを表し、黒色トレースは１：１結合フィットを表す。

【図６３－２】同上。

【図６３－３】同上。

【図６３－４】同上。

【０１１３】

【図６４－１】図６４Ａ－６４Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）又はトラスツズマブ（下部パネル）のヒトＣＤ１６ａ　Ｆ１５８への結合のＳＰＲを示すグラフである。色付きの線は生データを表し、黒色トレースは１：１の結合フィットを表す（上部パネル）。

【図６４－２】同上。

【図６４－３】同上。

【図６４－４】同上。

【図６４－５】同上。

【図６４－６】同上。

【図６４－７】同上。

【図６４－８】同上。

【０１１４】

【図６５－１】図６５Ａ－６５Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＣＤ１６への結合のＳＰＲを示すグラフである。色付きの線は生データを表し、黒色トレースは１：１の結合フィットを表す（上部パネル）。対応する定常状態がフィットしている（下部パネル）。垂直線は、定常状態K_Dを意味する。

【図６５－２】同上。

【図６５－３】同上。

【図６５－４】同上。

【０１１５】

【図６６】図６６は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ（茶

色）、ＣＤ１６ａ（紫色）、又は混合されたＣＤ１６ａ及びＮＫＧ２Ｄ（青色）表面への結合のＳＰＲを示すグラフである。

【０１１６】

【図６７】図６７Ａ－６７Ｂは、ＢＡＦＦ－Ｒ（８００ｎＭ）の結合、続いてｈＮＫＧ２Ｄ（７μＭ）の捕捉されたＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの結合（図６７Ａ）又はヒトＮＫＧ２Ｄ（７μＭ）との結合、続いてＢＡＦＦ－Ｒ（８００ｎＭ）との結合の標的の逆の順番（図６７Ｂ）を表すセンサーグラムのグラフである。

【０１１７】

【図６８】図６８Ａ－６８Ｂは、ＢＡＦＦ－Ｒ及びＴＡＣＩの固定化されたＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの結合（図６８Ａ）並びに特異的抗ＴＡＣＩｍＡｂへの結合（図６８Ｂ）のＳＰＲ分析を示すグラフである。

【０１１８】

【図６９】図６９Ａ－６９Ｂは、ＢＣＭＡを発現しない親細胞へのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの結合（図６９Ａ）及び対照ｍＡｂ特異的抗ＢＣＭＡと比較したアイソジェニックＢＣＭＡ＋細胞への結合（図６９Ｂ）を示すグラフである。

【０１１９】

【図７０】図７０Ａ－７０Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのアイソジェニックＢＡＦＦＲ＋ＣＨＯ細胞への結合（図７０Ａ）及び親ＣＨＯ株との反応性の欠如（図７０Ｂ）を示すグラフである。

【０１２０】

【図７１－１】図７１Ａ－７１Ｇは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの多特異性アッセイを詳述する。図７１Ａは、アッセイの概略図である。図７１Ｂ～図７１Ｇは、多特異性試薬（ＰＳＲ）の不在下での（上部パネル）又は存在下での（下部パネル）でのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（左パネル）、トラスツズマブ陰性対照（中央パネル）又はイキセキズマブ陽性対照（右パネル）のグラフを示す。

【図７１－２】同上。

【図７１－３】同上。

【０１２１】

【図７２】図７２Ａ－７２Ｃは、３人のドナーからのＮＫ細胞を使用して、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）又は親モノクローナル抗体（赤色）によって誘導されたＲＬ細胞の細胞傷害性アッセイのグラフを示す。

【０１２２】

【図７３】図７３Ａ－７３Ｄは、作用機序を解明するためのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及び対照の概略的表現を示す。

【０１２３】

【図７４】図７４は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＮＫＧ２Ｄ結合を欠くＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（黒色）、若しくはサイレンス化ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃ（赤色）、又はパリビズマブ（ｐａｌｉｖｉｚｕｍａｂ）Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（灰色）によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。

【０１２４】

【図７５－１】図７５Ａ－７５Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のヒトＣＤ６４への結合を示すセンサーグラムのグラフである。生のセンサーグラム（色付き）が、１：１のフィット曲線が重ねられた（黒色）。

【図７５－２】同上。

【図７５－３】同上。

【図７５－４】同上。

【０１２５】

【図７６－１】図７６Ａ－７６Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（

上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のカニクイザルＣＤ６４への結合を示すセンサーグラムのグラフである。生のセンサーグラム（色付き）が、１：１のフィット曲線が重ねられた（黒色）。
【図７６－２】同上。
【図７６－３】同上。
【図７６－４】同上。
【０１２６】
【図７７－１】図７７Ａ－７７Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図７７Ａ～図７７Ｈ）及びトラスツズマブ（図７７Ｉ～図７７Ｐ）のヒトＣＤ３２ａ　Ｈ１３１への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図７７－２】同上。
【図７７－３】同上。
【図７７－４】同上。
【図７７－５】同上。
【図７７－６】同上。
【図７７－７】同上。
【０１２７】
【図７８－１】図７８Ａ－７８Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図７８Ａ～図７８Ｈ）及びトラスツズマブ（図７８Ｉ～図７８Ｐ）のヒトＣＤ３２ａ　Ｒ１３１への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図７８－２】同上。
【図７８－３】同上。
【図７８－４】同上。
【図７８－５】同上。
【０１２８】
【図７９－１】図７９Ａ－７９Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図７９Ａ～図７９Ｈ）及びトラスツズマブ（図７９Ｉ～図７９Ｐ）のヒトＣＤ３２ｂへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図７９－２】同上。
【図７９－３】同上。
【図７９－４】同上。
【０１２９】
【図８０－１】図８０Ａ－８０Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図８０Ａ～図８０Ｈ）及びトラスツズマブ（図８０Ｉ～図８０Ｐ）のヒトＣＤ１６ｂへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図８０－２】同上。
【図８０－３】同上。
【図８０－４】同上。
【０１３０】
【図８１－１】図８１Ａ－８１Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のカニクイザルＣＤ１６への結合を示すセンサーグラムのグラフである。
【図８１－２】同上。
【０１３１】
【図８２－１】図８２Ａ－８２Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図８２Ａ～図８２Ｈ）及びトラスツズマブ（図８２Ｉ～図８２Ｐ）のｐＨ６．０でのヒト

ＦｃＲｎへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図８２－２】同上。
【図８２－３】同上。
【図８２－４】同上。
【０１３２】
【図８３－１】図８３Ａ－８３Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図８３Ａ～図８３Ｈ）及びトラスツズマブ（図８３Ｉ～図８３Ｐ）のｐＨ６．０でのカニクイザルＦｃＲｎへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図８３－２】同上。
【図８３－３】同上。
【図８３－４】同上。
【０１３３】
【図８４－１】図８４Ａ－８４Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のｐＨ７．４でのヒトＦｃＲｎ（左パネル）及びカニクイザルＦｃＲｎ（右パネル）への結合を示す生センサーグラムのグラフである。
【図８４－２】同上。
【図８４－３】同上。
【図８４－４】同上。
【０１３４】
【図８５】図８５は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの２つのロット（青色及び赤色）又はヒトＩｇＧ１ｋ（灰色）によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。
【０１３５】
【図８６－１】図８６Ａは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの２つのロット（青色及び赤色）又はヒトＩｇＧ１ｋ（灰色）によって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。
【０１３６】
【図８６－２】図８６Ｂは、５０％（赤色）、１００％（青色）、及び２００％（緑色）の公称薬物濃度（ＮＤＣ）でＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴによって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。
【０１３７】
【図８７】図８７Ａ－８７Ｂは、ヒスチジン（図８７Ａ）及び酢酸塩（図８７Ｂ）におけるＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＰＥＧ沈殿C_mプロットを示す。
【０１３８】
【図８８】図８８Ａ－８８Ｂは、ヒスチジン（図８８Ａ）及び酢酸塩（図８８Ｂ）におけるアダリムマブのＰＥＧ沈殿C_mプロットを示す。
【０１３９】
【図８９】図８９Ａ－８９Ｃは、酢酸塩（図８９Ａ）、ヒスチジン（図８９Ｂ）、及びリン酸塩（図８９Ｃ）におけるアダリムマブのk_Dプロットを示す。
【０１４０】
【図９０】図９０Ａ－９０Ｃは、酢酸塩（図９０Ａ）、ヒスチジン（図９０Ｂ）、及びリン酸塩（図９０Ｃ）におけるＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのk_Dプロットを示す。
【０１４１】
【図９１】図９１は、２５℃でのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの粘度対濃度のプロットである。

【０１４２】
【図９２】図９２は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）分析のクロマトグラムである。
【０１４３】
【図９３】図９３は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム（ＣＥ－ＳＤＳ）分析のクロマトグラムである。
【０１４４】
【図９４】図９４は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。
【０１４５】
【図９５－１】図９５Ａ－９５Ｃは、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ、ｈＮＫＧ２Ｄ及びｈＣＤ１６ａＶへの結合を示す。図９５Ａは、ＢＪＡＢ細胞（ＢＡＦＦ－Ｒ）への結合を示すグラフであり、図９５Ｂは、ＳＰＲによるｈＮＫＧ２Ｄへの結合を示すセンサーグラムである。図９５Ｃは、ＳＰＲによるｈＣＤ１６ａ　Ｖ１５８への結合を示すセンサーグラムである。色付きのセンサーグラムは生データを表し、黒いオーバーレイは生データの動力学フィットを表す。
【図９５－２】同上。
【０１４６】
【図９６】図９６は、対照（青色）と比較したＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて１週間後（赤色）、２週間後（緑色）、３週間後（紫色）にＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴによって誘導された、ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフを示す。
【０１４７】
【図９７】図９７Ａ－９７Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの表面チャージ分布を示す。３つの配向性が示されている：両方の面（左パネル：正面図；中心パネル：背面図）並びに抗原誘導性表面（右パネル：上面図）。正に帯電した領域は青色で着色され、負に帯電した領域は赤色で着色され、疎水性表面は白で着色されている。
【０１４８】
【図９８－１】図９８Ａ－９８Ｅは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの表面パッチ及びＣＤＲ長の評価を示すグラフである。実線及び対応する矢印は、３７７の後期治療用抗体のデータベースを参照したＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの採点法を示す。図９８Ａ及び図９８Ｂにおいて、２本の内側の点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、最も外側の２本の点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。図９８Ｃ～図９８Ｅの各プロットにおいて、２本の点線があり－一方は実線により近く、他方は実線により遠い。実線により近い点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、実線により遠い点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。
【図９８－２】同上。
【０１４９】
【図９９】図９９Ａ－９９Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ結合アームの表面電荷分布を示す。３つの配向性が示されている：両方の面（左パネル：正面図；中心パネル：背面図）並びに抗原誘導性表面（右パネル：上面図）。正に帯電した領域は青色で着色され、負に帯電した領域は赤色で着色され、疎水性表面は白で着色されている。
【０１５０】

【図１００－１】図１００Ａ－１００Ｅは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ－Ｒ結合アームの表面パッチ及びＣＤＲ長の評価を示すグラフである。実線及び対応する矢印は、３７７の後期治療用抗体のデータベースを参照したＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの採点法を示す。図１００Ａ及び図１００Ｂにおいて、２本の内側の点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、最も外側の２本の点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。図１００Ｃ～図１００Ｅの各プロットにおいて、２本の点線があり－一方は実線により近く、他方は実線により遠い。実線により近い点線は、２標準偏差（この領域内の参照分子の＞９５％）を示し、一方、実線により遠い点線は、３標準偏差（この領域内の参照分子の＞９９．７％）を示す。

【図１００－２】同上。

【０１５１】

【図１０１】図１０１Ａ－１０１Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの３つのロットのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。

【０１５２】

【図１０２】図１０２は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの３つのロットのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。

【０１５３】

【図１０３－１】図１０３Ａ－１０３Ｂは、　図１０３Ａは、示されたベンチマーク市販抗体と比較したＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＨＩＣ分析のグラフである。図１０３Ｂは、ＤＳＣによるＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの熱安定性分析のグラフである。

【図１０３－２】同上。

【０１５４】

【図１０４】図１０４Ａ－１０４Ｂは、Ｆｃ中の操作されたジスルフィド対（非還元型及び還元型）についての抽出イオンクロマトグラム（ＸＩＣ）及びそのペプチド対について最も強い荷電状態を示す。

【０１５５】

【図１０５－１】図１０５Ａ－１０５Ｂは、ｓｃＦｖ中の操作されたジスルフィド対（非還元型及び還元型）についてのＸＩＣ及びそのペプチド対についての最も強い荷電状態を示す。

【図１０５－２】同上。

【０１５６】

【図１０６】図１０６Ａ－１０６Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、親ｍＡｂ、及びＦ４－パリビズマブのヒトＢＡＦＦ－Ｒ＋アイソジェニックＣＨＯ細胞への結合（図１０６Ａ）並びにカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ＋アイソジェニックＣＨＯ細胞への結合（図１０６Ｂ）を示すグラフである。

【０１５７】

【図１０７－１】図１０７Ａ－１０７Ｌは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＮＫＧ２Ｄの結合のＳＰＲのセンサーグラムのグラフである。

【図１０７－２】同上。

【図１０７－３】同上。

【図１０７－４】同上。

【０１５８】

【図１０８－１】図１０８Ａ－１０８Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１０８Ａ～図１０８Ｈ）及びトラスツズマブ（図１０８Ｉ～図１０８Ｐ）のヒトＣＤ３２ａ　Ｒ１３１への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。

【図１０８－２】同上。

【図１０８－３】同上。

【図１０８－４】同上。
【０１５９】
【図１０９－１】図１０９Ａ－１０９Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１０９－２】同上。
【０１６０】
【図１１０－１】図１１０Ａ－１１０Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１０－２】同上。
【０１６１】
【図１１１－１】図１１１Ａ－１１１Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のヒトＣＤ６４への結合を示すセンサーグラムのグラフである。生のセンサーグラム（色付き）が、１：１のフィット曲線が重ねられた（黒色）。
【図１１１－２】同上。
【０１６２】
【図１１２－１】図１１２Ａ－１１２Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のカニクイザルＣＤ６４への結合を示すセンサーグラムのグラフである。生のセンサーグラム（色付き）が、１：１のフィット曲線が重ねられた（黒色）。
【図１１２－２】同上。
【０１６３】
【図１１３－１】図１１３Ａ－１１３Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１１３Ａ～図１１３Ｈ）及びトラスツズマブ（図１１３Ｉ～図１１３Ｐ）のヒトＣＤ３２ａ　Ｈ１３１への結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１３－２】同上。
【図１１３－３】同上。
【図１１３－４】同上。
【０１６４】
【図１１４－１】図１１４Ａ－１１４Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１１４Ａ～図１１４Ｈ）及びトラスツズマブ（図１１４Ｉ～図１１４Ｐ）のヒトＣＤ３２ｂへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１４－２】同上。
【図１１４－３】同上。
【図１１４－４】同上。
【０１６５】
【図１１５－１】図１１５Ａ－１１５Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１１５Ａ～図１１５Ｈ）及びトラスツズマブ（図１１５Ｉ～図１１５Ｐ）のヒトＣＤ１６ｂへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１５－２】同上。
【図１１５－３】同上。
【図１１５－４】同上。
【０１６６】

【図１１６－１】図１１６Ａ－１１６Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１１６Ａ～図１１６Ｈ）及びトラスツズマブ（図１１６Ｉ～図１１６Ｐ）のｐＨ６．０でのヒトＦｃＲｎへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１６－２】同上。
【図１１６－３】同上。
【図１１６－４】同上。
【０１６７】
【図１１７－１】図１１７Ａ－１１７Ｐは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（図１１７Ａ～図１１７Ｈ）及びトラスツズマブ（図１１７Ｉ～図１１７Ｐ）のｐＨ６．０でのカニクイザルＦｃＲｎへの結合を示すセンサーグラムのグラフである。各分子について、上部パネルは生センサーグラムを表し、下部パネルは定常状態親和性フィットを表す。
【図１１７－２】同上。
【図１１７－３】同上。
【図１１７－４】同上。
【０１６８】
【図１１８－１】図１１８Ａ－１１８Ｈは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（上部パネル）及びトラスツズマブ（下部パネル）のｐＨ７．４でのヒトＦｃＲｎ（左パネル）及びカニクイザルＦｃＲｎ（右パネル）への結合を示す生センサーグラムのグラフである。
【図１１８－２】同上。
【０１６９】
【図１１９】図１１９は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ（茶色）、ＣＤ１６ａ（紫色）、又は混合されたＣＤ１６ａ及びＮＫＧ２Ｄ（青色）表面への結合のＳＰＲを示すグラフである。
【０１７０】
【図１２０】図１２０Ａ－１２０Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴによるＢＡＦＦ－Ｒ及びＮＫＧ２Ｄの逐次飽和を示すグラフである。
【０１７１】
【図１２１－１】図１２１Ａ－１２１Ｉは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの多特異性アッセイを詳述する。図１２１Ａは、アッセイの概略図である。図１２１Ｂ～図１２１Ｉは、多特異性試薬（ＰＳＲ）の不在下での（上部パネル）又は存在下での（下部パネル）ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（左パネル）、トラスツズマブ（中央左パネル）、リツキシマブ（中央右パネル）、又はイキセキズマブ（右パネル）のグラフを示す。
【図１２１－２】同上。
【０１７２】
【図１２２】図１２２は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及びヒトＩｇＧ１ｋ（灰色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０１７３】
【図１２３】図１２３は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及び親ｍＡｂ（赤色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞の休止ｈＮＫ誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０１７４】
【図１２４】図１２４は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。
【０１７５】
【図１２５】図１２５は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後

のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。

【０１７６】

【図１２６】図１２６は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。

【０１７７】

【図１２７】図１２７は、対照と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合を示すグラフである。

【０１７８】

【図１２８】図１２８Ａ－１２８Ｂは、対照（図１２８Ａ）と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中で４０℃にて４週間後のｈＣＤ１６ａＶのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの結合（図１２８Ｂ）のＳＰＲを示すセンサーグラムのグラフである。

【０１７９】

【図１２９】図１２９は、対照（青色）と比較した、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中４０℃にて４週間後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０１８０】

【図１３０】図１３０は、対照と比較した、強制酸化後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。

【０１８１】

【図１３１】図１３１は、対照と比較した、強制酸化後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析のクロマトグラムである。

【０１８２】

【図１３２】図１３２は、強制酸化後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合を示すグラフである。

【０１８３】

【図１３３】図１３３Ａ－１３３Ｂは、ｈＣＤ１６ａＶのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ対照への結合（図１３３Ａ）及び強制酸化後（図１３３Ｂ）のＳＰＲを示すセンサーグラムのグラフである。

【０１８４】

【図１３４】図１３４は、強制酸化後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）及び対照（青色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０１８５】

【図１３５】図１３５は、対照と比較した、長期低ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。

【０１８６】

【図１３６】図１３６は、対照と比較した、長期低ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。

【０１８７】

【図１３７】図１３７は、対照と比較した、長期低ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。

【０１８８】

【図１３８】図１３８は、対照と比較した、長期低ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合を示すグラフである。

【０１８９】

【図１３９】図１３９Ａ－１３９Ｂは、対照（図１３９Ａ）と比較した、長期低ｐＨストレス後のｈＣＤ１６ａＶのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの結合（図

１３９Ｂ）のＳＰＲを示すセンサーグラムのグラフである。
【０１９０】
【図１４０】図１４０は、長期低ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）及び対照（青色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０１９１】
【図１４１】図１４１は、対照と比較した、長期高ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。
【０１９２】
【図１４２】図１４２は、対照と比較した、長期高ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。
【０１９３】
【図１４３】図１４３は、対照と比較した、長期高ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。
【０１９４】
【図１４４】図１４４は、対照（青色）と比較した、長期高ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合（赤色）を示すグラフである。
【０１９５】
【図１４５】図１４５Ａ－１４５Ｂは、対照（図１４５Ａ）と比較した、長期高ｐＨストレス後のｈＣＤ１６ａＶのＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの結合のＳＰＲ（図１４５Ｂ）を示すセンサーグラムのグラフである。
【０１９６】
【図１４６】図１４６は、長期高ｐＨストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）及び対照（青色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０１９７】
【図１４７】図１４７は、対照と比較した、６回の凍結／融解サイクル後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。
【０１９８】
【図１４８】図１４８は、対照と比較した６回の凍結／融解サイクル後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。
【０１９９】
【図１４９】図１４９は、対照（青色）と比較した、６回の凍結／融解サイクル後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合（赤色）を示すグラフである。
【０２００】
【図１５０】図１５０は、６回の凍結／融解サイクル後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）及び対照（青色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０２０１】
【図１５１】図１５１は、対照と比較した、撹拌ストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣ分析のクロマトグラムである。
【０２０２】
【図１５２】図１５２は、対照と比較した、撹拌ストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。
【０２０３】
【図１５３】図１５３は、対照（青色）と比較した、撹拌ストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合（赤色）を示すグラフである。

【０２０４】
【図１５４】図１５４は、撹拌ストレス後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）及び対照（青色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０２０５】
【図１５５－１】図１５５Ａ－１５５Ｂは、低ｐＨ保持前（図１５５Ａ）及び低ｐＨ保持後（図１５５Ｂ）のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴプロテインＡ溶出液のＳＥＣ分析のクロマトグラムである。
【図１５５－２】同上。
【０２０６】
【図１５６】図１５６は、対照と比較した、低ｐＨ保持後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイリングを示すグラフである。
【０２０７】
【図１５７】図１５７は、対照と比較した、低ｐＨ保持後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの還元ＣＥ－ＳＤＳ分析を示すグラフである。
【０２０８】
【図１５８】図１５８は、対照（赤色）と比較した、低ｐＨ保持後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合（青色）を示すグラフである。
【０２０９】
【図１５９】図１５９は、低ｐＨ保持後のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（緑色）及び対照（赤色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０２１０】
【図１６０】図１６０Ａ－１６０Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、及び親ｍＡｂ（黒色）のＫＨＹＧ－１（図１６０Ａ）及びＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ（図１６０Ｂ）細胞株への結合を示すグラフである。
【０２１１】
【図１６１】図１６１Ａ－１６１Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、及び親ｍＡｂ（黒色）に曝露されたＲＬ細胞上のＢＡＦＦ－Ｒの表面保持率（図１６１Ａ）並びにＩＬ－２による活性化（図１６１Ｂ）を示すグラフである。
【０２１２】
【図１６２】図１６２は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、及び親ｍＡｂ（黒色）に曝露されたＲａｊｉ細胞上のＢＡＦＦ－Ｒの表面保持率を示すグラフである。
【０２１３】
【図１６３】図１６３は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、親ｍＡｂ（黒色）、及びヒトＩｇＧ１ｋ（灰色）とのインキュベーション後のＲＬ細胞の休止ヒトＮＫ細胞誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。
【０２１４】
【図１６４】図１６４Ａ－１６４Ｂは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、Ｆ３’対照（黒色）、及びＦ４対照（灰色）とのインキュベーション後のＲＬ細胞の休止ヒトＮＫ細胞誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。細胞は、対照（図１６４Ａ）又はＩＬ－２（図１６４Ｂ）と共培養された。
【０２１５】
【図１６５】図１６５は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、Ｎ

ＫＧ２Ｄ結合を欠くＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（黒色）、若しくはＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃサイレンス化（赤色）、又はパリビズマブＦ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（灰色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０２１６】

【図１６６】図１６６は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＮＫＧ２Ｄ結合を欠くＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（黒色）、若しくはＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃサイレンス化（赤色）、又はパリビズマブＦ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（灰色）によって誘導されたＢＪＡＢ細胞の休止ヒトＮＫ細胞誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０２１７】

【図１６７】図１６７は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴプラス可溶型ＭＩＣＡ（黒色）、及びＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴプラス可溶型ＭＩＣＡ（灰色）とのインキュベーション後のＲＬ細胞の休止ヒトＮＫ細胞誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０２１８】

【図１６８】図１６８は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴプラスＢＡＦＦ（黒色）、及びＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴプラスＢＡＦＦ（灰色）とのインキュベーション後のＲＬ細胞の休止ヒトＮＫ細胞誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０２１９】

【図１６９】図１６９は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、親ｍＡｂ（黒色）、Ｆ３’－パリビズマブ（薄い灰色）、及びＦ４－パリビズマブ（濃い灰色）とのインキュベーション後のＢＪＡＢ細胞によるインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）及びＣＤ１０７ａの産生のグラフである。

【０２２０】

【図１７０】図１７０は、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（赤色）、親ｍＡｂ（黒色）、及びＦｃ－サイレンス化ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（桃色）とのインキュベーション後のＭ０マクロファージによるＢＪＡＢ細胞の食作用のグラフである。

【０２２１】

【図１７１】図１７１は、リツキシマブ（黒色）、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）、又はＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴとのインキュベーション後のＲａｊｉ細胞のヒト血清誘導細胞傷害性アッセイのグラフである。

【０２２２】

【図１７２】図１７２Ａ－１７２Ｅは、ＰＢＭＣ中のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及びＦ３’－パリビズマブ（赤色）の示されたＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合のフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。

【０２２３】

【図１７３－１】図１７３Ａ－１７３Ｆは、ヒト血液中のＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及びＦ３’－パリビズマブ（赤色）の示された細胞型への結合のフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。

【図１７３－２】同上。

【０２２４】

【図１７４】図１７４Ａ－１７４Ｃは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及びＦ３’－パリビズマブ（赤色）のヒト赤血球への結合のフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。

【０２２５】
【図１７５】図１７５Ａ－１７５Ｆは、（左から右に向かって）ＡＢ１４２４／１６１２Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、Ｆ３’－パリビズマブ、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、Ｆ４－パリビズマブ、及びリツキシマブの示されたヒトドナーＰＢＭＣへの結合のフローサイトメトリー分析を示すグラフである。
【０２２６】
【図１７６】図１７６Ａ－１７６Ｆは、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（青色）及びＦ３’－パリビズマブ（赤色）のカニクイザル全血ドナーＣＹＮ３１７０６０からの示されたＰＢＭＣへの結合のフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。
【０２２７】
【図１７７】図１７７Ａ－１７７Ｆは、（左から右に向かって）ＡＢ１４２４／１６１２Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、Ｆ３’－パリビズマブ、ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、Ｆ４－パリビズマブ、及びリツキシマブの示されたヒトドナーＰＢＭＣへの結合のフローサイトメトリー分析を示すグラフである。
【０２２８】
【図１７８】図１７８は、カニクイザル全血ドナーＣＹＮ３１７０６０からのＰＢＭＣとのＢＪＡＢ細胞の共培養におけるＣＤ１６＋ＣＤ８＋ＮＫ細胞のＣＤ１０７ａ陽性を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【０２２９】
本出願は、ナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＣＤ１６受容体、並びに癌細胞又はＢ細胞上のＢＡＦＦ－Ｒに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位を更に含む。本出現はまた、そのような多重特異性結合タンパク質を含む医薬組成物、並びにそのような多重特異性結合タンパク質及び医薬組成物を自己免疫性疾患及び癌を治療するような目的で使用する治療法も提供する。本出願に記載される多重特異性結合タンパク質の様々な態様が以下のセクションに記載されるが、１つの特定のセクションに記載される多重特異性結合タンパク質の態様は、いずれかの特定のセクションに限定されるべきではない。
【０２３０】
本出願の理解を容易にするために、多数の用語及び語句が、以下で定義される。
【０２３１】
本明細書で使用される「ａ」及び「ａｎ」という用語は「１つ以上」を意味し、文脈が不適切でない限り、複数を含む。
【０２３２】
本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分を指す。ヒト抗体において、抗原結合部位は、重（「Ｈ」）鎖及び軽（「Ｌ」）鎖のＮ末端可変（「Ｖ」）領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖及び軽鎖のＶ領域内の３つの高度に分岐したストレッチは「超可変領域」と称され、これらは「フレームワーク領域」、又は「ＦＲ」としても知られる、より保存された隣接するストレッチの間に挟まれている。したがって、「ＦＲ」という用語は、免疫グロブリンにおける超可変領域の間で、且つそれに隣接して、天然に見出されるアミノ酸配列を指す。ヒト抗体分子において、軽鎖の３つの超可変領域及び重鎖の３つの超可変領域は、３次元空間中に互いに対して配置され、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合した抗原の３次元表面に対して相補的であり、重鎖及び軽鎖の各々の３つの超可変領域は、「相補性決定領域」、又は「ＣＤＲ」と称される。ラクダ及び軟骨魚類などの特定の動物では、抗原結合部位は、「シングルドメイン抗体」を提供する一本鎖抗体によって形成される。抗原結合部位は、単一ポリペプチド中で重鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインに連結するためにペプチドリンカーを使用して、インタクトな抗体中に抗原結合表面を保持する抗体

の抗原結合フラグメント中に、又はｓｃＦｖなどの組換えポリペプチド中に存在し得る。
【０２３３】
本明細書で使用される「腫瘍関連抗原」という用語は、限定されないが、癌に関連するタンパク質、糖タンパク質、ガングリオシド、炭水化物、又は脂質が挙げられる任意の抗原を意味する。そのような抗原は、悪性細胞上で、又は腫瘍関連血管、細胞外マトリックス、間葉系間質細胞、若しくは免疫浸潤物などの腫瘍微小環境内で発現され得る。本開示のある特定の実施形態では、「腫瘍関連抗原」という用語はＢＡＦＦ－Ｒを指し、ＢＡＦＦ－Ｒは、本開示の多重特異性結合タンパク質中に存在する第２の、及び／又は追加の抗原結合部位によって標的化される。しかしながら、ＢＡＦＦ－Ｒはまた、腫瘍又は癌ではない疾患及び障害とも関連していることが理解される。
【０２３４】
本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書に記載の方法及び組成物によって治療される生物を指す。そのような生物としては、好ましくは、限定されないが、哺乳動物（例えば、ネズミ、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）が挙げられ、好ましくはヒトが挙げられる。
【０２３５】
本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、利益又は所望の結果をもたらすのに十分な化合物（例えば、本出願の化合物）の量を指す。有効量は、１回以上の投与、適用又は投与量で投与することができ、特定の製剤又は投与経路に限定されることを意図していない。本明細書で使用される場合、「治療すること」という用語は、状態、疾患、障害などの向上をもたらす任意の効果、例えば、減少させること、調節すること、改善すること、又は排除すること、或いはそれらの症状を改善することを含む。
【０２３６】
本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、組成物をインビボ若しくはエクスビボでの診断的又は治療的使用に特に好適なものにする活性薬剤と、不活性若しくは活性な担体との組み合わせを指す。
【０２３７】
本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン（例えば、油／水又は水／油エマルジョンなど）、及び様々なタイプの湿潤剤などの標準的医薬担体のいずれかを指す。組成物はまた、安定剤及び防腐剤を含むことができる。担体、安定剤及びアジュバントの例については、例えば、Ｍａｒｔｉｎ，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１５ｔｈ　Ｅｄ．，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌ．Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ［１９７５］を参照されたい。
【０２３８】
本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、対象への投与時に、本出願に記載される化合物又はその活性代謝物若しくは残留物を提供することができる本出願に記載される化合物の任意の薬学的に許容される塩（例えば、酸又は塩基）を指す。当業者に既知であるように、本出願に記載される化合物の「塩」は、無機又は有機酸及び塩基から誘導され得る。例示的な酸としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン－ｐ－スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン－２－スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが挙げられるが、これらに限定されない。シュウ酸などの他の酸は、それら自体が薬学的に許容されないが、本出願に記載される化合物及びそれらの薬学的に許容される酸添加塩を得る上で、中間体として有用な塩の調製で使用されてもよい。
【０２３９】
例示的な塩基としては、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）水酸化物、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）水酸化物、アンモニア、及び式NW_4^+（式中、Ｗは$C_{1\sim4}$アルキルである）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４０】
例示的な塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが挙げられるが、これらに限定されない。塩の他の例には、Na^+、NH_4^+、及びNW_4^+（式中、Ｗは$C_{1\sim4}$アルキル基である）などの好適なカチオンと組み合わせた本出願に記載される化合物のアニオンが挙げられる。

【０２４１】
治療上の使用に関して、本出願に記載される化合物の塩は、薬学的に許容されるものとして企図される。しかしながら、薬学的に許容されない酸及び塩基の塩にも、例えば、薬学的に許容される化合物の調製又は精製における使用を見出すことができる。

【０２４２】
本明細書で使用される場合、ＢＡＦＦ－Ｒ（ＢＡＦＦ受容体、Ｂ細胞活性化因子受容体、ＢＲ３、ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１３Ｃ、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー１３Ｃ、ＣＤ２６８、及びＢＬｙＳ受容体３としても知られる）は、Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｑ９６ＲＪ３のタンパク質及び関連するアイソフォーム及びオルソログを指す。

【０２４３】
本明細書の全体を通して、組成物が特定の成分を有する、含む、又は構成するものとして記載されている場合、又はプロセス及び方法が特定の工程を有する、含む、又は構成するものとして記載されている場合、更に列挙された成分から本質的になるか、又は列挙された成分からなる本出願に記載される組成物が存在することが企図され、また列挙された処理工程から本質的になるか、又はそれからなる本出願に従うプロセス及び方法が存在することが企図される。

【０２４４】
一般的な問題として、パーセンテージを指定する組成物は、別段の指定がない限り重量による。更に、変数が定義を伴わない場合、変数の以前の定義に従う。

【０２４５】
Ｉ．タンパク質
本出願は、ナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＣＤ１６受容体、並びに癌細胞上ＢＡＦＦ－Ｒに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載の医薬組成物及び治療方法において有用である。多重特異性結合タンパク質のナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＣＤ１６受容体への結合は、ナチュラルキラー細胞のＢＡＦＦ－Ｒ抗原を発現する腫瘍細胞の破壊に対する活性を増強させる。多重特異性結合タンパク質のＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞への結合は、癌細胞をナチュラルキラー細胞と近接させ、これはナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞の直接的及び間接的な破壊を促進する。ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１６、及び別の標的に結合する多重特異性結合タンパク質は、国際公開第２０１８１４８４４５号パンフレット及び同第２０１９１５７３６６号パンフレットに開示されている（これらは、参照により本明細書に組み込まれない）。いくつかの例示的な多重特異性結合タンパク質の更なる説明が、以下に提供される。

【０２４６】
多重特異性結合タンパク質の第１の成分は、ＮＫＧ２Ｄ受容体発現細胞に結合する抗原結合部位であり、ＮＫＧ２Ｄ受容体発現細胞としては、限定されないが、ＮＫ細胞、γδ

Ｔ細胞及びＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞を挙げることができる。ＮＫＧ２Ｄ結合時に、多重特異性結合タンパク質は、ＵＬＢＰ６及びＭＩＣＡなどの天然リガンドがＮＫＧ２Ｄに結合し、ＮＫ細胞を活性化することをブロックし得る。

【０２４７】

多重特異性結合タンパク質の第２の成分は、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位である。ＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞は、例えば、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）において、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性Ｂ大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（ＭＡＬＴ）リンパ腫、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）など、及び自己免疫性炎症性疾患において見出すことができる。

【０２４８】

多重特異性結合タンパク質の第３の成分は、抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６を発現する細胞に結合する抗原結合部位、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、マスト細胞、及び濾胞樹状細胞を含む白血球の表面上のＦｃ受容体である。

【０２４９】

多重特異性結合タンパク質の追加の抗原結合部位は、ＢＡＦＦ－Ｒに結合し得る。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の追加の抗原結合部位は各々Ｆａｂフラグメントである。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位は各々ｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はＦａｂフラグメントであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の追加の抗原結合部位は各々ｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位はＦａｂであり、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の追加の抗原結合部位は各々Ｆａｂフラグメントである。

【０２５０】

本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、様々なフォーマットを取ることができる。例えば、１つのフォーマットは、第１の免疫グロブリン重鎖、第１の免疫グロブリン軽鎖、第２の免疫グロブリン重鎖及び第２の免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体の多重特異性抗体である（図１）。第１の免疫グロブリン重鎖は、第１のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメイン、第１の重鎖可変ドメイン及び任意選択で第１のＣＨ１重鎖ドメインを含む。第１の免疫グロブリン軽鎖は、第１の軽鎖可変ドメイン及び任意選択で第１の軽鎖定常ドメインを含む。第１の免疫グロブリン軽鎖は、第１の免疫グロブリン重鎖と一緒になって、ＮＫＧ２Ｄに結合する抗原結合部位を形成する。第２の免疫グロブリン重鎖は、第２のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン及び任意選択で第２のＣＨ１重鎖ドメインを含む。第２の免疫グロブリン軽鎖は、第２の軽鎖可変ドメイン及び任意選択で第２の軽鎖定常ドメインを含む。第２の免疫グロブリン軽鎖は、第２の免疫グロブリン重鎖と一緒になって、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位を形成する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメインと第２のＦｃドメインとは一緒になって、ＣＤ１６に結合することができる（図１）。いくつかの実施形態では、第１の免疫グロブリン軽鎖は、第２の免疫グロブリン軽鎖と同一である。

【０２５１】

抗原結合部位は、抗体重鎖可変ドメイン及び抗体軽鎖可変ドメインを各々組み込んでもよく（例えば、抗体で見られるように配置されるか、若しくは一緒に融合してｓｃＦｖを形成する）、又は抗原結合部位の１つ以上は、ラクダ科抗体のような$V_{H}H$抗体若しくは軟骨魚類で見られるもののようなV_{NAR}抗体などのシングルドメイン抗体であってもよい。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位は、第１の抗原結合部位中に存在する軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを組み込

む。

【０２５３】

別の例示的なフォーマットは、第１の免疫グロブリン重鎖、第２の免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体の多重特性抗体を伴う（例えば、図２Ａ）。いくつかの実施形態では、第１の免疫グロブリン重鎖は、リンカー又は抗体ヒンジのいずれかを介してＮＫＧ２Ｄと対合し、それに結合するか、又はＢＡＦＦ－Ｒに結合する重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとから構成される一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）に融合された第１のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第２の免疫グロブリン重鎖は、第２のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメイン、第２の重鎖可変ドメイン及びＣＨ１重鎖ドメインを含む。免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第２の免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリン重鎖と対合し、ＮＫＧ２Ｄに結合するか又はＢＡＦＦ－Ｒに結合するが、但し第１のＦｃドメインがＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖに融合している場合、免疫グロブリン軽鎖と対合した第２の免疫グロブリン重鎖がＢＡＦＦ－Ｒに結合するが、ＮＫＧ２Ｄには結合しないことを条件とし、逆もまた同様である。いくつかの実施形態では、第１の免疫グロブリン重鎖中のｓｃＦｖはＢＡＦＦ－Ｒに結合し、第２の免疫グロブリン重鎖中の重鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン軽鎖中の軽鎖可変ドメインは、対合する場合、ＮＫＧ２Ｄに結合する（例えば、図２Ｅ）。いくつかの実施形態では、第１の免疫グロブリン重鎖中のｓｃＦｖはＮＫＧ２Ｄに結合し、第２の免疫グロブリン重鎖中の重鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン軽鎖中の軽鎖可変ドメインは、対合する場合、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメインは一緒になって、ＣＤ１６に結合することができる（例えば、図２Ａ）。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメインは一緒になって、ＣＤ１６に結合することができる（例えば、図２Ａ）。

【０２５４】

別の例示的なフォーマットは、第１の免疫グロブリン重鎖、及び第２の免疫グロブリン重鎖を含むヘテロ二量体の多重特異性抗体を伴う（例えば、図２Ｂ）。いくつかの実施形態では、第１の免疫グロブリン重鎖はＮＫＧ２Ｄに対合し、それに結合するか、又はＢＡＦＦ－Ｒに結合する重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとから構成された一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にリンカー又は抗体ヒンジのいずれかを介して融合された第１のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第２の免疫グロブリン重鎖はＮＫＧ２Ｄに対合し、それと結合するか、又はＢＡＦＦ－Ｒに結合する重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとから構成される一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にリンカー又は抗体ヒンジのいずれかを介して融合された第２のＦｃ（ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）ドメインを含み、但し第１のＦｃドメインがＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖに融合する場合、ｓｃＦｖに融合した第２のＦｃドメインはＢＡＦＦ－Ｒに結合するが、ＮＫＧ２Ｄには結合せず、逆もまた同様であることを条件とする。いくつかの実施形態では、第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメインは一緒になって、ＣＤ１６に結合することができる（例えば、図２Ｂ）。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、上述した一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）は、ヒンジ配列を介して、抗体定常ドメインに連結される。いくつかの実施形態では、ヒンジは、アミノ酸Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジは、アミノ酸Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒを含む。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ（例えば、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ又はＢＡＦＦ－Ｒに結合するｓｃＦｖ）と抗体重鎖定常ドメインを接続させるヒンジは、アミノ酸Ａｌａ－Ｓｅｒを含む。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ（例えば、ＮＫＧ２Ｄに結合するｓｃＦｖ又はＢＡＦＦ－Ｒに結合するｓｃＦｖ）と抗体重鎖定常ドメインを接続させるヒンジは、アミノ酸Ｇｌｙ－Ｓｅｒを含む。いくつかの他の実施形態では、ヒンジは、アミノ酸Ａｌａ－Ｓｅｒ及びＴｈｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙを含む。ヒンジ配列は、標的抗原への結合の柔軟性、及び柔軟性と最適形状

との間のバランスを提供し得る。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、上述した一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインとのジスルフィド架橋を形成し、ｓｃＦｖの安定性を向上させる。例えば、ジスルフィド架橋は、重鎖可変ドメインのＣ４４残基と軽鎖可変ドメインのＣ１００残基との間で形成され得る（アミノ酸位置は、Ｋａｂａｔにより番号付けされる）。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、可動性リンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結されている。任意の好適なリンカーを使用することができ、例えば、$(G_4S)_4$リンカー（$(GlyGlyGlyGlySer)_4$（配列番号１１９））である。ｓｃＦｖのいくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＮ末端に位置付けられる。ｓｃＦｖのいくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインのＣ末端に位置付けられる。

【０２５７】

本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、１つ以上の追加の抗原結合部位を更に含むことができる。追加の抗原結合部位は、任意選択でリンカー配列を介して、定常領域ＣＨ２ドメインのＮ末端に、又は定常領域ＣＨ３ドメインのＣ末端に融合され得る。ある特定の実施形態では、追加の抗原結合部位は、任意選択でジスルフィド安定化されている一本鎖可変領域（ｓｃＦｖ）の形態を取り、四価又は三価の多重特異性結合タンパク質をもたらす。例えば、多重特異性結合タンパク質は、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位、及びＣＤ１６に結合するのに十分な抗体定常領域若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する第４の抗原結合部位を含む。これらの抗原結合部位のうちのいずれか１つは、Ｆａｂフラグメント又はｓｃＦｖ、例えば、上述したｓｃＦｖの形態のいずれかを取ることができる。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位とは異なるＢＡＦＦ－Ｒのエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位と同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位と同じ重鎖及び軽鎖ＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位と同じ重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位と同じアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位の重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列とは異なる重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態では、追加の抗原結合部位は、第２の抗原結合部位の配列とは異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位は、異なる腫瘍関連抗原に結合する。いくつかの実施形態では、第２の抗原結合部位及び追加の抗原結合部位は、異なる抗原に結合する。例示的なフォーマットが、図２Ｃ及び図２Ｄに示されている。したがって、多重特異性結合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒの二価のエンゲージメントを提供し得る。多重特異性タンパク質によるＢＡＦＦ－Ｒの二価のエンゲージメントは、腫瘍細胞表面上のＢＡＦＦ－Ｒを安定化させ、腫瘍細胞に対するＮＫ細胞の細胞傷害性を増強させることができる。多重特異性タンパク質によるＢＡＦＦ－Ｒの二価のエンゲージメントは、多重特異性タンパク質の腫瘍細胞へのより強力な結合を付与することができ、それによって、腫瘍細胞に対する、特に低レベルのＢＡＦＦ－Ｒを発現する腫瘍細胞に対するＮＫ細胞のより強い細胞傷害性応答を促進する。

【０２５９】

多重特異性結合タンパク質は、追加のフォーマットを取ることができる。いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ＩｇＧ様形状を維持する三官能性の二重特異性抗体であるトリオマブ形態におけるものである。このキメラは、各々が２つの親抗体に由来する１つの軽鎖及び１つの重鎖を有する２つのハーフ抗体からなる。

【０２６０】
いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ノブイントゥホール（ＫｉＨ）技術を組み込むＫｉＨ共通軽鎖（ＬＣ）形態におけるものである（例えば、図２１で表示される多重特異性結合タンパク質）。ＫｉＨ共通ＬＣ形態は、第１の標的に結合するＦａｂ、第２の標的に結合するＦａｂ、及びヘテロ二量体化突然変異によって安定化されるＦｃドメインを含むヘテロ二量体である。２つのＦａｂは、それぞれ重鎖及び軽鎖を含み、各Ｆａｂの重鎖は互いに異なり、各それぞれの重鎖と対合する軽鎖は、両方のＦａｂに共通である。
【０２６１】
いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質はＫＩＨ形態であり、これはノブイントゥホール（ＫｉＨ）技術を伴う。ＫｉＨは、$C_{H}3$ドメインを操作して、各重鎖中に「ノブ」又は「ホール」のいずれかを作り出し、ヘテロ二量体化を促進することを伴う。「ノブイントゥホール（ＫｉＨ）」Ｆｃ技術の背後にある概念は、小さな残基の嵩高な残基による置換によって、「ノブ」を１つのＣＨ３ドメイン（ＣＨ３Ａ）中に導入することである（例えば、ＥＵナンバリングにおけるＴ３６６W_{CH3A}）。「ノブ」を収容するために、ノブに最も近い隣接する残基をより小さな残基で置き換えることによって、相補的な「ホール」表面が他のＣＨ３ドメイン（ＣＨ３Ｂ）上に作り出された（例えば、Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７V_{CH3B}）。「ホール」突然変異は、構造に指南されたファージライブラリースクリーニングによって最適化された（Ａｔｗｅｌｌ Ｓ，Ｒｉｄｇｗａｙ ＪＢ，Ｗｅｌｌｓ ＪＡ，Ｃａｒｔｅｒ Ｐ．，Ｓｔａｂｌｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｓ ｆｒｏｍ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｍａｉｎ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｏｆ ａ ｈｏｍｏｄｉｍｅｒ ｕｓｉｎｇ ａ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｌｉｂｒａｒｙ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９７）２７０（１）：２６－３５）。ＫｉＨ ＦｃバリアントのＸ線結晶構造（Ｅｌｌｉｏｔｔ ＪＭ，Ｕｌｔｓｃｈ Ｍ，Ｌｅｅ Ｊ，Ｔｏｎｇ Ｒ，Ｔａｋｅｄａ Ｋ，Ｓｐｉｅｓｓ Ｃ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｐａｒａｌｌｅｌ ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ｋｎｏｂ ａｎｄ ｈｏｌｅ ａｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ ｈａｌｆ－ａｎｔｉｂｏｄｙ ｈｏｍｏｄｉｍｅｒｓ ｉｓ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｂｙ ａ ＣＨ２－ＣＨ３ ｈｙｄｒｏｐｈｏｂｉｃ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２０１４）４２６（９）：１９４７－５７；Ｍｉｍｏｔｏ Ｆ，Ｋａｄｏｎｏ Ｓ，Ｋａｔａｄａ Ｈ，Ｉｇａｗａ Ｔ，Ｋａｍｉｋａｗａ Ｔ，Ｈａｔｔｏｒｉ Ｋ．Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ａ ｎｏｖｅｌ ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｆｃ ｖａｒｉａｎｔ ｗｉｔｈ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｆｏｒ ＦｃγＲｓ．Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０１４）５８（１）：１３２－８）は、ヘテロ二量体化がＣＨ３間ドメインコア界面での立体相補性により引き起こされる疎水性相互作用によって熱力学的に好まれるが、一方でノブ－ノブとホール－ホールの界面は、それぞれ立体障害と好ましい相互作用の破壊によりホモ二量体化を好まないことを実証した。
【０２６２】
いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、可動性の天然に存在するリンカーを介して、２つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせて、四価のＩｇＧ様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ（商標））形態におけるものである。
【０２６３】
いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、直交性Ｆａｂ界面（オルト－Ｆａｂ）形態による。オルト－Ｆａｂ ＩｇＧアプローチ（Ｌｅｗｉｓ ＳＭ，Ｗｕ Ｘ，Ｐｕｓｔｉｌｎｉｋ Ａ，Ｓｅｒｅｎｏ Ａ，Ｈｕａｎｇ Ｆ，Ｒｉｃｋ ＨＬ，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ａｎ ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ Ｆａｂ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１４）３２（２）：１９１－８）では、構造に基づく領域デザインにより、一方のＦａｂに

おけるＬＣ及びＨＣ$_{VH-CH1}$の界面にのみ相補的突然変異が導入され、他方のＦａｂフラグメントには、いかなる変化も行われない。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、２－ｉｎ－１　Ｉｇフォーマットにおけるものである。いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Ｆｃに融合した標的１及び標的２に結合する２つの異なるＦａｂを含有するヘテロ二量体化構築物であるＥＳ形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、Ｆｃ中の静電的ステアリング突然変異によって確実になる。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたＦｃに融合した２つの異なるＦａｂフラグメントを有するヘテロ二量体構築物であるκλ－Ｂｏｄｙ形態におけるものである。抗原１を標的とするＦａｂフラグメント１は、カッパＬＣを含有し、抗原２を標的とするＦａｂフラグメント２は、ラムダＬＣを含有する。図１３Ａは、κλ－Ｂｏｄｙの１つの形態の例示的な表現であり、図１３Ｂは、別のκλ－Ｂｏｄｙの例示的な表現である。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Ｆａｂアーム交換形態（重鎖及び結合した軽鎖（半分子）を別の分子の重鎖－軽鎖対とスワップすることにより、Ｆａｂフラグメントアームを交換した結果、二重特異性抗体となった抗体）である。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ＳＥＥＤ　Ｂｏｄｙ形態におけるものである。ストランド交換操作ドメイン（ＳＥＥＤ）プラットフォームは、天然抗体の治療用途を広げる可能性がある非対象且つ二重特異性抗体様の分子を生成するためにデザインされた。このタンパク質工学操作プラットフォームは、保存されたＣＨ３ドメイン内の免疫グロブリンの構造的に関連した配列の交換に基づいている。ＳＥＥＤデザインは、ＡＧ及びＧＡ　ＳＥＥＤ　ＣＨ３ドメインのホモ二量体化を回避しつつ、ＡＧ／ＧＡヘテロ二量体の効果的な生成を可能にする（Ｍｕｄａ　Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．（２０１１，２４（５）：４４７－５４））。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、２つの異なるＨＣのヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーを使用する、ＬｕＺ－Ｙ形態におけるものである（Ｗｒａｎｉｋ，ＢＪ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２０１２），２８７：４３３３１－９）。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Ｃｏｖ－Ｘ－Ｂｏｄｙ形態におけるものである。二重特異性ＣｏｖＸ－Ｂｏｄｙでは、分枝状のアゼチジノンリンカーを使用して、２つの異なるペプチドを１つに結合させ、温和な条件下にてスキャフォールド抗体に部位特異的様式で融合させる。機能的活性に関与するのはファルマコホア（ｐｈａｒｍａｃｏｐｈｏｒｅｓ）であるが、抗体スキャフォールドは長い半減期及びＩｇ様の分布をもたらす。最適化された、又は独自の二重特異性抗体を生成するために、ファルマコホアは化学的に最適化されるか、又は他のファルマコホアに置き換えることができる（Ｄｏｐｐａｌａｐｕｄｉ　ＶＲ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ（２０１０），１０７（５２）；２２６１１－２２６１６）。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Ｆｃに融合した、標的１に結合するＦａｂと、標的２に結合するｓｃＦａｂとを含む、ＯＡｓｃ－Ｆａｂヘテロ二量体形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、Ｆｃ中の突然変異によって確実となる。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原１及び２に結合する２つの異なるＦａｂフラグメント、並びにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたＦｃ

を含有するヘテロ二量体構築物である、ＤｕｅｔＭａｂ形態におけるものである。Ｆａｂフラグメント１及び２は、ＬＣ及びＨＣの正確な対合を確実にする差異的なＳ－Ｓ架橋を含有する。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化によって安定化されたＦｃに融合した、標的１及び２に結合する２つの異なるＦａｂフラグメントを有するヘテロ二量体構築物である、ＣｒｏｓｓｍＡｂ形態におけるものである。ＣＬドメイン及びＣＨ１ドメインとＶＨドメイン及びＶＬドメインとが切り換わっており、例えば、ＣＨ１はＶＬとインフレームで融合しており、ＣＬはＶＨとインフレームで融合している。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原２に結合するＦａｂフラグメントが、抗原１に結合するＦａｂフラグメントのＨＣのＮ末端に融合しているホモ二量体構築物である、Ｆｉｔ－Ｉｇ形態におけるものである。構築物は野生型Ｆｃを含有する。

【０２７４】

多重特異性結合タンパク質の個々の成分は、以下により詳細に記載される。

【０２７５】

ＮＫＧ２Ｄ結合部位

ナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＣＤ１６受容体、並びにＢＡＦＦ－Ｒへの結合時に、多重特異性結合タンパク質は、２種以上のＮＫ活性化受容体に関与することができ、天然リガンドのＮＫＧ２Ｄへの結合をブロックし得る。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいて、ＮＫ細胞をアゴナイズすることができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいて、及び齧歯類並びにカニクイザルなどの他の種において、ＮＫ細胞をアゴナイズすることができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいて、及びカニクイザルなどの他の種において、ＮＫ細胞をアゴナイズすることができる。

【０２７６】

表１は、組み合わせて、ＮＫＧ２Ｄに結合することができる重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのペプチド配列を列挙する。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、Ｆａｂフォーマットで配置されている。いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとは一緒に融合されて、ｓｃＦｖを形成する。

【０２７７】

表１に列挙されるＮＫＧ２Ｄ結合部位は、ＮＫＧ２Ｄに対するそれらの結合親和性が変化し得るが、それにもかかわらず、それらは全てヒトＮＫ細胞を活性化する。

【０２７８】

別途記載のない限り、表１に提供されるＣＤＲ配列は、Ｋａｂａｔナンバリングで決定される。

【表１】

表 1

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1) CDR1 (配列番号 2) – GSFSGYYWS CDR2 (配列番号 3) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (配列番号 4) – ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYNSYPITF GGGTKVEIK (配列番号 5)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF GGGTKVEIK (配列番号 6)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYHSFYTF GGGTKVEIK (配列番号 7)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQSNSYYTF GGGTKVEIK (配列番号 8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYNSYPTF GGGTKVEIK (配列番号 9)

【表２】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWGFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 10)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRT SQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTF GQGTKLEIK (配列番号 11)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYGSFPITF GGGTKVEIK (配列番号 12)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPW TFGQGTKVEIK (配列番号 13)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYNSFPTFG GGTKVEIK (配列番号 14)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDIYPTFG GGTKVEIK (配列番号 15)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDSYPTF GGGTKVEIK (配列番号 16)

【表３】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYGSFPTFG GGTKVEIK (配列番号 17)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYQSFPTFG GGTKVEIK (配列番号 18)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYSSFSTFG GGTKVEIK (配列番号 19)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYESYSTFG GGTKVEIK (配列番号 20)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDSFITFG GGTKVEIK (配列番号 21)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYQSYPTF GGGTKVEIK (配列番号 22)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYHSFPTFG GGTKVEIK (配列番号 23)

【表４】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYELYSYTF GGGTKVEIK (配列番号 24)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQYDTFITFG GGTKVEIK (配列番号 25)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGD SSIRHAYYYYGMDVWGQGTTVTVS S (配列番号 26) CDR1– GTFSSYAIS (非 Kabat) (配列番号 27)又は SYAIS (配列番号 28) CDR2 (配列番号 29) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 – ARGDSSIRHAYYYYGMDV (非 Kabat) (配列番号 30)又は GDSSIRHAYYYYGMDV (配列番号 31)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS SQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPITFGGGTKVEIK (配列番号 32) CDR1 (配列番号 33) – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (配列番号 34) – WASTRES CDR3 (配列番号 35) – QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGS DRFHPYFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 36) CDR1– GSISSSSYYWG (非 Kabat) (配列番号 37)又は SSSYYWG (配列番号 38) CDR2 (配列番号 39) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 – ARGSDRFHPYFDY (非 Kabat) (配列番号 40)又は GSDRFHPYFDY (配列番号 41)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPPTFG GGTKVEIK (配列番号 42) CDR1 (配列番号 43) – RASQSVSRYLA CDR2 (配列番号 44) – DASNRAT CDR3 (配列番号 45) – QQFDTWPPT

【表５】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCEQYDSYPTFG GGTKVEIK (配列番号 46)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRG RKASGSFYYYYGMDVWGQGTTVT VSS (配列番号 47) CDR1 (配列番号 27) – GTFSSYAIS CDR2 (配列番号 29) – GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (配列番号 48) – ARRGRKASGSFYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCES SQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQ PPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND YSYPYTFGQGTKLEIK (配列番号 49) CDR1 (配列番号 50) – ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (配列番号 34) – WASTRES CDR3 (配列番号 51) – QNDYSYPYT
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RGAPNYGDTTHDYYYMDVWGKG TTVTVSS (配列番号 52) CDR1 (配列番号 53) – YTFTSYYMH (非 Kabat)又は SYYMH (配列番号 54) CDR2 (配列番号 55) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 – ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (非 Kabat) (配列番号 56)又は GAPNYGDTTHDYYYMDV (配列番号 57)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYDDWPFTF GGGTKVEIK (配列番号 58) CDR1 (配列番号 59) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 60) - GASTRAT CDR3 (配列番号 61) - QQYDDWPFT

【表６】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 62) CDR1 - YTFTGYYMH (非 Kabat) (配列番号 63)又は GYYM11 (配列番号 64) CDR2 (配列番号 65) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 – ARDTGEYYDTDDHGMDV (非 Kabat) (配列番号 66)又は DTGEYYDTDDHGMDV (配列番号 67)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (配列番号 68) CDR1 (配列番号 59) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 60) - GASTRAT CDR3 (配列番号 69) - QQDDYWPPT
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTVSS (配列番号 70) CDR1– FTFSSYAMS (非 Kabat) (配列番号 71)又は SYAMS (配列番号 115) CDR2 (配列番号 72) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 - AKDGGYYDSGAGDY (非 Kabat) (配列番号 73)又は DGGYYDSGAGDY (配列番号 74)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (配列番号 75) CDR1 (配列番号 76) - RASQGIDSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 78) - QQGVSYPRT

【表７】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 79) CDR1 - FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2 (配列番号 82) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3– ARGAPMGAAAGWFDP (配列番号 83) (非 Kabat)又は GAPMGAAAGWFDP (配列番号 84)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT
	VH 中の Q44C 及び VL 中の G100C を有する scFv(VL-VH)、リンカーは斜体表示される: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGCGTK VEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 88)	
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA REGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT TVTVSS (配列番号 89) CDR1 – YTFTSYYMH (配列番号 53) (非 Kabat)又は SYYMH (配列番号 54) CDR2 (配列番号 55) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 – AREGAGFAYGMDYYYMDV (配列番号 90) (非 Kabat)又は EGAGFAYGMDYYYMDV (配列番号 91)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQSDNWPFTF GGGTKVEIK (配列番号 92) CDR1 (配列番号 93) - RASQSVSSYLA CDR2 (配列番号 44) - DASNRAT CDR3 (配列番号 94) - QQSDNWPFT

【表８】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 95) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (配列番号 96) (非 Kabat)又は GAPIGAAAGWFDP (配列番号 97)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT
	VH 中の Q44C 及び VL 中の G100C を有する scFv(VL-VH)、リンカーは斜体表示される: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGCGTK VEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 275)	
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APQGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 98) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3 - ARGAPQGAAAGWFDP (配列番号 99) (非 Kabat)又は GAPQGAAAGWFDP (配列番号 100)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT

【表９】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APLGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 101) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3 – ARGAPLGAAAGWFDP (配列番号 102) (非 Kabat)又は GAPLGAAAGWFDP (配列番号 103)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APFGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 104) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3 - ARGAPFGAAAGWFDP (配列番号 105) (非 Kabat)又は GAPFGAAAGWFDP (配列番号 106)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG APVGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 107) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3– ARGAPVGAAAGWFDP (配列番号 108) (非 Kabat)又は GAPVGAAAGWFDP (配列番号 109)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRT FGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT

【表１０】

クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
A49-コンセンサス	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPXGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS、式中Xは M、L、I、V、Q、又はFである (配列番号 110) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 80) (非 Kabat)又は SYSMN (配列番号 81) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 82) CDR3– ARGAPXGAAAGWFDP (配列番号 111) (非 Kabat)又は GAPXGAAAGWFDP (配列番号 112)、式中 X は M、L、I、V、Q、又は F である	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (配列番号 85) CDR1 (配列番号 86) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 77) - AASSLQS CDR3 (配列番号 87) - QQGVSFPRT
米国特許第 9,273,136 号明細書における NKG2D バインダー	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGTTVTVSS (配列番号 113)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL (配列番号 114)
米国特許第 7,879,985 号明細書における NKG2D バインダー	QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVSS (配列番号 116)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (配列番号 117)

【０２７９】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄ（例えば、ヒトＮＫＧ２Ｄ）に結合する第１の抗原結合部位は、表１に開示される抗体のＶＨと少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、表１に開示される同じ抗体のＶＬと少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａを参照）、Ｃｈｏｔｈｉａ（例えば、Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ ＆ Ｌｅｓｋ Ａ Ｍ，（１９８７），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７を参照）、ＭａｃＣａｌｌｕｍ（ＭａｃＣａｌｌｕｍ Ｒ Ｍ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５を参照）、又は当該技術分野において既知の任意の他のＣＤＲ決定法の下で決定される、表１に開示される抗体のＶＨ及びＶＬ配列の重鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と

、軽鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と、を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、表１に開示される抗体の重鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と、軽鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と、を含む。

【０２８０】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、例えば、配列番号１と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を有することによって、及び／又は配列番号１のＣＤＲ１（配列番号２）、ＣＤＲ２（配列番号３）、及びＣＤＲ３（配列番号４）と同一のアミノ酸配列を組み込むことによって、配列番号１に由来する重鎖可変ドメインを含む。配列番号１に関連する重鎖可変ドメインは、様々な軽鎖可変ドメインと結合して、ＮＫＧ２Ｄ結合部位を形成することができる。例えば、配列番号１に関連する重鎖可変ドメインを組み込む第１の抗原結合部位は、配列番号５、６、７、８、９、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、及び４６に由来する配列から選択される軽鎖可変ドメインを更に組み込むことができる。例えば、第１の抗原結合部位は、配列番号１と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインと、配列番号５、６、７、８、９、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、及び４６から選択される配列のいずれか１つと少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインとを組み込む。

【０２８１】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号２６のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号３２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２７若しくは２８、２９、及び３０若しくは３１（例えば、それぞれ配列番号２７、２９、及び３０、又はそれぞれ配列番号２８、２９、及び３１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号３３、３４、及び３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２７若しくは２８、２９、及び３０若しくは３１（例えば、それぞれ配列番号２７、２９、及び３０、又はそれぞれ配列番号２８、２９、及び３１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号３３、３４、及び３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８２】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号３６のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号４２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号３７若しくは３８、３９、及び４０若しくは４１（例えば、それぞれ配列番号３７、３９、及び４０、又はそれぞれ配列番号３８、３９、及び４１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号４３、４４、及び４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号３７若しくは３８、３９、及び４０若しくは４１（例えば、それぞれ配列番号３７、３９、及び４０、又はそれぞれ配列番号３８、３９、及び４１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号４３、４４、及び４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８３】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号４７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号４９と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２７、２９、及び４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号５０、３４、及び５１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２７、２９、及び４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号５０、３４、及び５１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８４】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号５８と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号５３若しくは５４、５５、及び５６若しくは５７（例えば、それぞれ配列番号５３、５５、及び５６、又はそれぞれ配列番号５４、５５、及び５７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号５９、６０、及び６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号５３若しくは５４、５５、及び５６若しくは５７（例えば、それぞれ配列番号５３、５５、及び５６、又はそれぞれ配列番号５４、５５、及び５７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号５９、６０、及び６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８５】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号６８と少なくとも９０％（例えば、少なくとも９１％、少なくとも９

２％、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号６３若しくは６４、６５、及び６６若しくは６７（例えば、それぞれ配列番号６３、６５、及び６６、又はそれぞれ配列番号６４、６５、及び６７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号５９、６０、及び６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号６３若しくは６４、６５、及び６６若しくは６７（例えば、それぞれ配列番号６３、６５、及び６６、又はそれぞれ配列番号６４、６５、及び６７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号５９、６０、及び６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８６】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号９２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号５３若しくは５４、５５、及び９０若しくは９１（例えば、それぞれ配列番号５３、５５、及び９０、又はそれぞれ配列番号５４、５５、及び９１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号９３、４４、及び９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号５３若しくは５４、５５、及び９０若しくは９１（例えば、それぞれ配列番号５３、５５、及び９０、又はそれぞれ配列番号５４、５５、及び９１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号９３、４４、及び９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８７】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号７５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号７１若しくは１１５、７２、及び７３若しくは７４（例えば、それぞれ配列番号７１、７２、及び７３、又はそれぞれ配列番号１１５、７２、及び７４）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号７６、７７、及び７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号７１若しくは１１５、７２、及び７３若しくは７４（例えば、それぞれ配列番号７１、７２、及び７３、又はそれぞれ配列番号１１５、７２、及び７４）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号７６、７７、及び７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８８】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号７９

のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び８３若しくは８４（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び８３、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び８４）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び８３若しくは８４（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び８３、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び８４）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２８９】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号９５のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び９６若しくは９７（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び９６、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び９７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び９６若しくは９７（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び９６、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び９７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９０】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号９８のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び９９若しくは１００（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び９９、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１００）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び９９若しくは１００（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び９９、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１００）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤ

Ｒ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９１】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０２若しくは１０３（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０２、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０３）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０２若しくは１０３（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０２、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０３）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９２】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１０４のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０５若しくは１０６（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０５、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０６）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０５若しくは１０６（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０５、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０６）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９３】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１０７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０８若しくは１０９（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０８、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０９）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配

列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１０８若しくは１０９（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１０８、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１０９）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９４】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１１１若しくは１１２（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１１１、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１１２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第１の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号８０若しくは８１、８２、及び１１１若しくは１１２（例えば、それぞれ配列番号８０、８２、及び１１１、又はそれぞれ配列番号８１、８２、及び１１２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号８６、７７、及び８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０２９５】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１１３のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１１４と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。

【０２９６】

ある特定の実施形態では、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位は、配列番号１１６のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１１７と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。

【０２９７】

多重特異性結合タンパク質は、限定されないが、ＮＫ細胞、γδＴ細胞及びＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞が挙げられるＮＫＧ２Ｄ発現細胞に結合することができる。ＮＫＧ２Ｄ結合時に、多重特異性結合タンパク質は、ＵＬＢＰ６及びＭＩＣＡなどの天然リガンドがＮＫＧ２Ｄに結合し、ＮＫ細胞を活性化することをブロックし得る。

【０２９８】

多重特異性結合タンパク質は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、マスト細胞、及び濾胞樹状細胞を含む白血球の表面上のＦｃ受容体であるＣＤ１６を

発現する細胞に結合する。本開示のタンパク質は、２ｎＭ～１２０ｎＭ、例えば、２ｎＭ～１１０ｎＭ、２ｎＭ～１００ｎＭ、２ｎＭ～９０ｎＭ、２ｎＭ～８０ｎＭ、２ｎＭ～７０ｎＭ、２ｎＭ～６０ｎＭ、２ｎＭ～５０ｎＭ、２ｎＭ～４０ｎＭ、２ｎＭ～３０ｎＭ、２ｎＭ～２０ｎＭ、２ｎＭ～１０ｎＭ、約１５ｎＭ、約１４ｎＭ、約１３ｎＭ、約１２ｎＭ、約１１ｎＭ、約１０ｎＭ、約９ｎＭ、約８ｎＭ、約７ｎＭ、約６ｎＭ、約５ｎＭ、約４．５ｎＭ、約４ｎＭ、約３．５ｎＭ、約３ｎＭ、約２．５ｎＭ、約２ｎＭ、約１．５ｎＭ、約１ｎＭ、約０．５ｎＭ～約１ｎＭ、約１ｎＭ～約２ｎＭ、約２ｎＭ～３ｎＭ、約３ｎＭ～４ｎＭ、約４ｎＭ～約５ｎＭ、約５ｎＭ～約６ｎＭ、約６ｎＭ～約７ｎＭ、約７ｎＭ～約８ｎＭ、約８ｎＭ～約９ｎＭ、約９ｎＭ～約１０ｎＭ、約１ｎＭ～約１０ｎＭ、約２ｎＭ～約１０ｎＭ、約３ｎＭ～約１０ｎＭ、約４ｎＭ～約１０ｎＭ、約５ｎＭ～約１０ｎＭ、約６ｎＭ～約１０ｎＭ、約７ｎＭ～約１０ｎＭ、又は約８ｎＭ～約１０ｎＭのK_Dの親和性でＮＫＧ２Ｄに結合する。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄ結合部位は、１０～６２ｎＭのK_DでＮＫＧ２Ｄに結合する。

【０２９９】

ＢＡＦＦ－Ｒ結合部位

本明細書に開示される多重特異性結合タンパク質のＢＡＦＦ－Ｒ部位は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含む。

【０３００】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のＮＫＧ２Ｄ受容体及びＣＤ１６受容体、並びにＢＡＦＦ－Ｒに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表２は、組み合わせてＢＡＦＦ－Ｒに結合することができる重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのいくつかの例示的な配列を列挙する。

【０３０１】

ＣＤＲ配列は、別段の指示がない限り、Ｃｈｏｔｈｉａナンバリング下で特定される。

【表１１】

表 2

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
イアナルマブ (MorphoSys/ Novartis)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLE WLGRIYYRSKWYNSYAVSVKSRITI NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCARYQWVPKIGVFDSWGQGTLV TVSS (配列番号 145) CDR1: SNSAAWG (配列番号 157) (Kabat)又は SSNSAAWG (配列番号 135) CDR2: RIYYRSKWYNSYAVSVKS (配列番号 158) (Kabat)又は WLGRIYYRSKWYNS (配列番号 136) CDR3: YQWVPKIGVFDS (配列番号 159) (Kabat)又は ARYQWVPKIGVFD (配列番号 137)	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLI YGSSSRATGVPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTF GQGTKVEIK (配列番号 146) CDR1: RASQFILPEYLS (配列番号 160) (Kabat) CDR2: GSSSRAT (配列番号 161) (Kabat) CDR3: QQFYSSPLT (配列番号 162) (Kabat)

【表１２】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
イアナルマブに由来するscFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号207) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGS SSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGCGTK VEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISG DSVSSNSAAWGWIRQSPGRCLEWLGRIYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYQWVPKIGVFDSWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号138) QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRCLEWL GRIYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR YQWVPKIGVFDSWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*DIVLTQ SPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATG VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGCGTKVEIK	
V3-46s (Genentech) (国際公開第2006073941号パンフレット)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTISSSSIIIWVRQAPGKGLEWVA WVLPSVGFTDYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA RRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGT LVTVSS (配列番号147) CDR1: TISSSS (配列番号163) (Kabat) CDR2: AWVLPSVGFTD (配列番号164) (Kabat) CDR3: RVCYNRLGVCAGG (配列番号165) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGQ GTKVEIK (配列番号148) CDR1: QDVSTA (配列番号166) (Kabat) CDR2: YSASFLY (配列番号167) (Kabat) CDR3: CQQSQIS (配列番号168) (Kabat)
V3-46sに由来するscFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号139) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKV EIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPSVGFTDYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号140) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAW VLPSVGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRV CYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIK	

【表１３】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
V3-46s-42 (Genentech) (国際公開第2006073941号パンフレット)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVAWVLPSVGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSS (配列番号147) CDR1: TISSSS (配列番号163) (Kabat) CDR2: AWVLPSVGFTD (配列番号164) (Kabat) CDR3: RVCYNRLGVCAGG (配列番号165) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGQGTKVEIK (配列番号150) CDR1: EDISTA (配列番号169) (Kabat) CDR2: YAASFLY (配列番号170) (Kabat) CDR3: CQQSQIS (配列番号168) (Kabat)
V3-46s-42に由来するscFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号141) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPSVGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号142) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPSVGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIK	
11u9.1-73 (Genentech) (国際公開第2006073941号パンフレット)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKGLEWVGFIRDKANGYTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGTLVTVSS (配列番号151) CDR1: GFYTS (配列番号171) (Kabat) CDR2: FIRDKANGYTTEYNPSVKG (配列番号172) (Kabat) CDR3: VRRALDY (配列番号173) (Kabat)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQHLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGQGTKVEIK (配列番号152) CDR1: KSSQSLLYSSNQNNYLA (配列番号174) (Kabat) CDR2: WAQHLDS (配列番号175) (Kabat) CDR3: QQYYTYPYT (配列番号176) (Kabat)

【表１４】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
Hu9.1-73 に由来する scFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号 143) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQHLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGCGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKCLEWVGFIRDKANGYTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号 144) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKCLEWVGFIRDKANGYTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQHLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGCGTKVEIK	
ヒト化 mAb hCOH-1 (City of Hope) (国際公開第 2017214170 号パンフレット)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS (配列番号 153) CDR1: GDSITSGY (非 Kabat) (配列番号 177)又は SGYWN (配列番号 178) (Kabat) CDR2: ISYSGST (非 Kabat) (配列番号 179)又は YISYSGSTYYNPSLKS (配列番号 180) (Kabat) CDR3: ASPNYPFYAMDY (非 Kabat) (配列番号 181)又は PNYPFYAMDY (配列番号 182) (Kabat)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK (配列番号 154) CDR1: ESVDNYGISF (非 Kabat) (配列番号 183)又は RASESVDNYGISFLN (配列番号 184) (Kabat) CDR2: AAS (配列番号 185) (非 Kabat)又は AASNRAT (配列番号 186) (Kabat) CDR3: QQSKEVPWT (配列番号 187) (Kabat)

【表１５】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
hCOH-1 に由来する scFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号 149) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号 190) QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK	
ヒト化 mAb hCOH-2 (City of Hope) (国際公開第 2017214170 号パンフレット)	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS (配列番号 155) CDR1: GDSITSGY (非 Kabat) (配列番号 177)又は SGYWN (配列番号 178) (Kabat) CDR2: ISYSGST (非 Kabat) (配列番号 179)又は YISYSGSTYYNPSLKS (配列番号 180) (Kabat) CDR3: ASPNYPFYAMDY (非 Kabat) (配列番号 181)又は PNYPFYAMDY (配列番号 182) (Kabat)	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK (配列番号 156) CDR1: ESVDNYGISF (非 Kabat) (配列番号 183)又は RASESVDNYGISFMN (配列番号 188) (Kabat) CDR2: AAS (非 Kabat) (配列番号 185)又は AASNRAT (配列番号 186) (Kabat) CDR3: QQSKEVPWT (配列番号 187) (Kabat)
hCOH-2 に由来する scFv (リンカーは斜体表示される)	VL-VH (配列番号 191) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS VH-VL (配列番号 192) EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIK	

【表１６】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
1129_A01 (AB0369 scFv)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGLIIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 310) CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGLIIEDYGMDV (配列番号 216)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
1203_A01	CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGVFIEDYGMDV (配列番号 219)	CDR1: RASQSVSSNLA (配列番号 59) CDR2: GASTRAT (配列番号 60) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
1203_A02	CDR1: GFTFSTY (配列番号 220) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RNTMVRGVIIEDYGMDV (配列番号 221)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSSPLT (配列番号 222)
AB0605scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGQYIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 277) CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGQYIEDYGMDV (配列番号 223)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)

【表１７】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
AB0606scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGWYIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 278) CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (配列番号 224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB0622scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGWIIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 279) CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGWIIEDYGMDV (配列番号 225)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
コンセンサス 1 (AB0605, AB0606, AB0622)	CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRG**X_1X_2**IEDYGMDV **式中 X_1 は Q 又は W であり、X_2 は I 又は Y である**(配列番号 226)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB0679scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGWYIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 280) CDR1: GFPFSSY (配列番号 227) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (配列番号 224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)

【表１８】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
AB0681scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGEWFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGWIIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 281) CDR1: GEWFSSY (配列番号 228) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTHLRGWIIEDYGMDV (配列番号 229)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB0682scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTMLRGWYIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 282) CDR1: GFTFSSS (配列番号 230) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (配列番号 224)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
コンセンサス 2 (AB0679, AB0681, AB0682)	CDR1: G**X_1X_2**FSSX_3 式中 **X_1** は F 又は E であり、**X_2** は T、P、又は W であり、**X_3** は Y 又は S である(配列番号 231) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFT**X_1**LRGW**X_2**IEDYGMDV 式中 X_1 は M 又は H であり、X_2 は I 又は Y である(配列番号 232)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB0898	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTRLRGWYIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 283) CDR1: GFTFSSS (配列番号 230) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (配列番号 242)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)

【表１９】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
AB0899	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTYLRGWYIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 284) CDR1: GFTFSSS (配列番号 230) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTYLRGWYIEDYGLDV (配列番号 234)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB0900	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTSLRGWYIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 285) CDR1: GFTFSSS (配列番号 230) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTSLRGWYIEDYGLDV (配列番号 235)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIK (配列番号 276) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
コンセンサス 3 (AB0898, AB0899, AB0900)	CDR1: GFTFSSS (配列番号 230) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTXLRGWYIEDYGLDV 式中 X は R、Y、又は S である(配列番号 236)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSTPLT (配列番号 218)
AB1080scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGWYIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 286) CDR1: GFTFSSY (配列番号 214) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTHLRGWYIEDYGLDV (配列番号 237)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTKVEIK (配列番号 253) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSIPLT (配列番号 249)

【表２０】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
AB1081scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDESNKYYGDSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTNLRGWIIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 287) CDR1: GFAFSSY (配列番号 238) CDR2: WYDESN (配列番号 239) CDR3: RFTNLRGWIIEDYGLDV (配列番号 240)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTKVEIK (配列番号 253) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSIPLT (配列番号 249)
AB1084scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSMYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTRLRGWYIEDYGLDVWGQGTTVTVSS (配列番号 288) CDR1: GFTFSMY (配列番号 241) CDR2: WYDASN (配列番号 233) CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (配列番号 242)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTKVEIK (配列番号 253) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSIPLT (配列番号 249)
AB1085scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 289) CDR1: GFTFGSY (配列番号 243) CDR2: WYDGSN (配列番号 215) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGMDV (配列番号 244)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGCGTKVEIK (配列番号 253) CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 5) CDR3: QQSYSIPLT (配列番号 249)
コンセンサス 4 (AB1080, AB1081, AB1084, AB1085)	CDR1: GFX_1FX_2X_3Y 式中 X_1 は T 又は A であり、X_2 は S 又は G であり、X_3 は S 又は M である(配列番号 245) CDR2: WYDXSN 式中 X は G、A、又は E である(配列番号 246) CDR3: RFTX_1LRGX_2X_3IEDYGX_4DV 式中 X_1 は H、N、又は R であり、X_2 は W 又は Q であり、X_3 は I 又は Y であり、X_4 は M 又は L である(配列番号 247)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYSXPLT 式中 X は T 又は I である(配列番号 259)

【表２１】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
AB1424/ AB1612	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAA S**GFTFSSY**GMHWVRQAPGK**G**LE WVAVI**WYDASN**KYYGDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAV YYCAR**RFTHLRGQYIEDYGLDV** WGQGTTVTVSS (**配列番号** 250) CDR1: GFTFSSY (**配列番号** 214) CDR2: WYDASN (**配列番号** 233) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (**配列番号** 248)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RA** **SQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY **AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC**QQSYSIPLT**F G**G**GTKVEIK (**配列番号** 251) CDR1: RASQSISSYLN (**配列番号** 217) CDR2: AASSLQS (**配列番号** 77) CDR3: QQSYSIPLT (**配列番号** 249)
AB1424/1612 (**ジスルフィド架橋形成のためのシステインヘテロ二量体化突然変異を有する**)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAA S**GFTFSSY**GMHWVRQAPGK**C**LEW VAVI**WYDASN**KYYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVY YCAR**RFTHLRGQYIEDYGLDV**W GQGTTVTVSS (**配列番号** 252) CDR1: GFTFSSY (**配列番号** 214) CDR2: WYDASN (**配列番号** 233) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (**配列番号** 248)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RA** **SQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY **AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC**QQSYSIPLT**F G**C**GTKVEIK (**配列番号** 253) CDR1: RASQSISSYLN (**配列番号** 217) CDR2: AASSLQS (**配列番号** 77) CDR3: QQSYSIPLT (**配列番号** 249)
AB1424/1612 scFv (VH-VL)	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSY**GMHWVRQAPGK**C**LEWV AVI**WYDASN**KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCA R**RFTHLRGQYIEDYGLDV**WGQGTTVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGG GS*EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY **AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSIPLT**FG**C**G TKVEIK (**配列番号** 254)	
AB 1424/1612 scFv (VL-VH)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AA** **SSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSIPLT**FG**C**GTK VEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS **GFTFSSY**GMHWVRQAPGK**C**LEWVAVI**WYDASN**KYYGDSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR**RFTHLRGQYIEDYGLDV**WGQGT TVTVSS (**配列番号** 255)	

【表２２】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
コンセンサス 5 (AB0369, AB1080, AB1085, AB1424/AB1612)	CDR1: GFTFXSY 式中 X は S 又は G である(配列番号 256) CDR2: WYDXSN 式中 X は G 又は A である(配列番号 257) CDR3: RFT**X_1**LRG**X_2X_3**IEDYG**X_4**DV 式中 X_1 は M 又は H であり、X_2 は L、W、又は Q であり、X_3 は I 又は Y であり、X_4 は M 又は L である(配列番号 258)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYS**X**PLT 式中 X は T 又は I である(配列番号 259)
コンセンサス 6 (マスターコンセンサス)	CDR1: G**X_1X_2**F**$X_3X_4X_5$** 式中 X_1 は F 又は E であり、X_2 は T、P、W、又は A であり、X_3 は S 又は G であり、X_4 は S 又は M であり、X_5 は Y 又は S である(配列番号 260) CDR2: WYD**X**SN 式中 X は G、A、又は E である(配列番号 249) CDR3: RFT**X_1**LRG**X_2X_3**IEDYG**X_4**DV 式中 X_1 は M、H、N、R、Y、又は S であり、X_2 は L、Q、又は W であり、X_3 は I 又は Y であり、X_4 は M 又は L である(配列番号 261)	CDR1: RASQSISSYLN (配列番号 217) CDR2: AASSLQS (配列番号 77) CDR3: QQSYS**X**PLT 式中 X は T 又は I である(配列番号 259)
3A1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA**SGYTFTSY**WMHWVKQRPGQGLE WIGEI**DPFDSY**TNYNQNFKGKATL TVDKSSSTAYMLLSSLTSDDSAVYY CAR**ERLRLWSYYFDY**WGQGTTLT VSS (配列番号 263) CDR1: GYTFTSY (配列番号 291) CDR2: DPFDSY (配列番号 292) CDR3: ERLRLWSYYFDY (配列番号 293)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**R SSQSIVHSNGNTYLE**WYLQKPGQ SPKLLIY**KVSNRLS**GVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQ GSHDPFT**FGSGTKLEIK (配列番号 264) CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE (配列番号 294) CDR2: KVSNRLS (配列番号 295) CDR3: FQGSHDPFT (配列番号 296)
7G4	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA**SGYTFTSY**WMHWVKQRPGQGLE WIGEV**DPSDSY**TNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYILLSNLTSDDSAVYY CAR**ERVRLWSYFFDY**WGQGTTLT VSS (配列番号 265) CDR1: GYTFTSY (配列番号 291) CDR2: DPSDSY (配列番号 297) CDR3: ERVRLWSYFFDY (配列番号 298)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**R SSQSIVHSNGNTYLE**WYLQKPGQ SPKLLIY**KVSNRLS**GVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQ GSHDPFT**FGSGTKLEIK (配列番号 266) CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE (配列番号 294) CDR2: KVSNRLS (配列番号 295) CDR3: FQGSHDPFT (配列番号 296)

【表２３】

供給源	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
1B3-A7	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCVV**SGFTFSNY**AMSWVRQTPEKRLEW VATIS**DGGGY**TYYPDSVKGRFTISR DNAKNNLYLQMSHLKSEDTAIYYC AR**DDLGGGNYVSSYFDV**WGTGT TVTVSS (配列番号 267) CDR1: GFTFSNY (配列番号 299) CDR2: DGGGY (配列番号 300) CDR3: DDLGGGNYVSSYFDV (配列番号 301)	DVVMTQTPLSLPVSPGDQASISC**R SSQSLVHSNGNTYLY**WYLQKPGQ SPKLLIY**RVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKINRVEAEDLGVYFC**FQG THVPLT**FGSGTKLELK (配列番号 268) CDR1: RSSQSLVHSNGNTYLY (配列番号 302) CDR2: RVSNRFS (配列番号 303) CDR3: FQGTHVPLT (配列番号 304)
10H7-C5	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAA **SGFSFSRY**AMSWVRQTPEKRLEW VATIS**DGGSY**THYRDNVKGRFTISR DNAKNNLNLQMSHLKSEDTAIYY CAR**NEMGLYFDYDVYAMDY**WG QGTSVTVSS (配列番号 269) CDR1: GFSFSRY (配列番号 305) CDR2: DGGSY (配列番号 306) CDR3: NEMGLYFDYDVYAMDY (配列番号 307)	DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISC**RS SQSLLHSNGNTYLY**WYLQKPGQS PKLLIH**RVSNRFS**GVPDRFGGSGS GTDFTLKIIRVEAEDLGVYFC**FQG THVPWT**FGGGTKLEIK (配列番号 262) CDR1: RSSQSLLHSNGNTYLY (配列番号 308) CDR2: RVSNRFS (配列番号 303) CDR3: FQGTHVPWT (配列番号 309)

【０３０２】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒ（例えば、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ）に結合する第２の抗原結合部位は、表２に開示される抗体のＶＨと少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、表２に開示される同じ抗体のＶＬと少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａを参照）、Ｃｈｏｔｈｉａ（例えば、Ｃｈｏｔｈｉａ Ｃ ＆ Ｌｅｓｋ Ａ Ｍ，（１９８７），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７を参照）、ＭａｃＣａｌｌｕｍ（ＭａｃＣａｌｌｕｍ Ｒ Ｍ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５を参照）、又は当該技術分野において既知の任意の他のＣＤＲ決定法の下で決定される、表２に開示される抗原結合部位のＶＨ及びＶＬ配列の重鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と、軽鎖ＣＨＲ１、ＣＨＲ２、及びＣＨＲ３と、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、表２に開示される抗体の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。

【０３０３】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１４５のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１４６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１５７若しくは１３５、１５８若しくは１３６、及び１５９若しくは１３７（例えば、それぞれ配列番号１５７、１５８、及び１５９、又はそれぞれ配列番号１３５、１３６、及び１３７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１６０、１６１、及び１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１５７若しくは１３５、１５８若しくは１３６、及び１５９若しくは１３７（例えば、それぞれ配列番号１５７、１５８、及び１５９、又はそれぞれ配列番号１３５、１３６、及び１３７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１６０、１６１、及び１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号２０７又は１３８と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０４】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１４７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１４８と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１６３、１６４、及び１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１６６、１６７、及び１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１６３、１６４、及び１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１６６、１６７、及び１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号１３９又は１４０と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０５】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１４７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１５０と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１６３、１６４、及び１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を

含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１６９、１７０、及び１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１６３、１６４、及び１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１６９、１７０、及び１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号１４１又は１４２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０６】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１５２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１７１、１７２、及び１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１７４、１７５、及び１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１７１、１７２、及び１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１７４、１７５、及び１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号１４３又は１４４と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０７】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１５３のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１５４と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１７７若しくは１７８、１７９若しくは１８０、及び１８１若しくは１８２（例えば、それぞれ配列番号１７７、１７９、及び１８１、又はそれぞれ配列番号１７８、１８０、及び１８２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１８３若しくは１８４、１８５若しくは１８６、及び１８７（例えば、それぞれ配列番号１８３、１８５、及び１８７、又はそれぞれ配列番号１８４、１８６、及び１８７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１７７若しくは１７８、１７９若しくは１８０、及び１８１若しくは１８２（例えば、それぞれ配列番号１７７、１７９、及び１８１、又はそれぞれ配列番号１７８、１８０、及び１８２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１８３若しくは１８４、１８５若しくは１８６、及び１８７（例え

ば、それぞれ配列番号１８３、１８５、及び１８７、又はそれぞれ配列番号１８４、１８６、及び１８７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号１４９又は１９０と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０８】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１５５のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号１５６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号１７７若しくは１７８、１７９若しくは１８０、及び１８１若しくは１８２（例えば、それぞれ配列番号１７７、１７９、及び１８１、又はそれぞれ配列番号１７８、１８０、及び１８２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号１８３若しくは１８８、１８５若しくは１８６、及び１８７（例えば、それぞれ配列番号１８３、１８５、及び１８７、又はそれぞれ配列番号１８８、１８６、及び１８７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号１７７若しくは１７８、１７９若しくは１８０、及び１８１若しくは１８２（例えば、それぞれ配列番号１７７、１７９、及び１８１、又はそれぞれ配列番号１７８、１８０、及び１８２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号１８３若しくは１８８、１８５若しくは１８６、及び１８７（例えば、それぞれ配列番号１８３、１８５、及び１８７、又はそれぞれ配列番号１８８、１８６、及び１８７）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは配列番号１９１又は１９２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３０９】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２６０、２４９、及び２６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２６０、２４９及び２６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１０】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号３１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１１】

ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号５９、６０、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号５９、６０、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１２】

ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２２０、２１５、及び２２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２２０、２１５、及び２２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１３】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１４】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２７７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１５】
ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２７８のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１６】
ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２１５、及び２２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１７】
ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２３１、２１５、及び２３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３１、２１５、及び２３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１８】
ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号

２２７、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２２７、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３１９】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２２８、２１５、及び２２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２２８、２１５、及び２２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２０】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２３０、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３０、２１５、及び２２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２１】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２２】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２

８３のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２３】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８４のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２４】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８５のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２７６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３０、２３３、及び２３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２５】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２４５、２４６、及び２４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部

位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２４５、２４６、及び２４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２６】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８６のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２７】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２３８、２３９、及び２４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２３８、２３９、及び２４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２８】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８８のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５３と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２４１、２３３、及び２４２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２４１、２３３、及び２４２のアミノ

酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３２９】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２８９と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２４３、２１５、及び２４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２４３、２１５、及び２４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３０】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＨは、それぞれ配列番号２５６、２５７及び２５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位のＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２５６、２５７及び２５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３１】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２５０又は２５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２５１又は２５３と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２１４、２３３、及び２４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２１７、７７、及び２４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位はｓｃＦｖとして存在し、ｓｃＦｖは、配列番号２５４又は２５５と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。

【０３３２】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２

６３のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２６４と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２９１、２９２、及び２９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２９４、２９５、及び２９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２９１、２９２、及び２９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２９４、２９５、及び２９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３３】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２６５のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２６６と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２９１、２９７、及び２９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号２９４、２９５、及び２９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２９１、２９７、及び２９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号２９４、２９５、及び２９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３４】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２６７のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２６８と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号２９９、３００、及び３０１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号３０２、３０３、及び３０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号２９９、３００、及び３０１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号３０２、３０３、及び３０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３５】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、配列番号２６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＨと、配列番号２６２と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含むＶＬと、を含む。ある特定の実施形態では、ＶＨは、それぞれ配列番号３０５、３０６、及び３０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、ＶＬは、それぞれ配列番号３０８、３０３、及び３０９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、（ａ）それぞれ配列番号３０５、３０６、及び３０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＨと、（ｂ）それぞれ配列番号３０８、３０３、及び３０９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むＶＬと、を含む。

【０３３６】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する第２の抗原結合部位は、ｓｃＦｖである。例えば、ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、配列番号２０７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４９、１９０、１９１、１９２、２５４又は２５５のアミノ酸配列を含む。

【０３３７】

或いは、ＢＡＦＦ－Ｒに結合することができる新規の抗原結合部位は、配列番号１８９で定義されるアミノ酸配列への結合によって定義されるアミノ酸配列、そのバリアント、その成熟細胞外フラグメント又はＢＡＦＦ－Ｒのドメインを含有するフラグメントへの結合をスクリーニングすることによって同定することができる。

配列番号１８９

【化１】

MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQP
QESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAP
DGDKDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKT
AGPEQQ

【０３３８】

ｓｃＦｖにおいて、ＶＨとＶＬとは、リンカー、例えば、（ＧｌｙＧｌｙＧｌｙＧｌｙＳｅｒ）$_4$、すなわち（Ｇ４Ｓ）$_4$リンカー（配列番号１１９）によって接続することができることが企図される。当業者は、他の開示されるリンカーのいずれか（例えば、表１０を参照）が、本明細書に開示されるＶＨ及びＶＬ配列を有するｓｃＦｖにおいて使用されてもよいことを理解するであろう（例えば、表２中）。

【０３３９】

前述の実施形態の各々において、ＢＡＦＦ－Ｒに結合するｓｃＦｖのＶＨ及び／又はＶＬ配列は、それらのＢＡＦＦ－Ｒに対する能力に影響を及ぼすことなく、ＶＨ及び／又はＶＬのフレームワーク領域において、アミノ酸改変（例えば、少なくとも１、２、３、４、５又は１０個のアミノ酸置換、欠失、又は付加）を含有してもよいことが本明細書で企図される。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒに結合するｓｃＦｖのＶＨ及び／又はＶＬ配列は、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を促進するシステインヘテロ二量体化突然変異を含有してもよいことが本明細書で企図される。

【０３４０】

ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、ＢＡＦＦ－Ｒへの結合に対して、上述した対応する抗原結合部位と競合する。

【０３４１】

ある特定の実施形態では、第２の抗原結合部位は、ＢＡＦＦ－ＲとＢＡＦＦリガンドと

の相互作用をブロックする。
【０３４２】
Ｆｃドメイン
Ｆｃドメイン内では、ＣＤ１６の結合は、ヒンジ領域及びＣＨ２ドメインによって媒介される。例えば、ヒトＩｇＧ１内では、ＣＤ１６との相互作用は主に、アミノ酸残基Ａｓｐ２６５－Ｇｌｕ２６９、Ａｓｎ２９７－Ｔｈｒ２９９、Ａｌａ３２７－Ｉｌｅ３３２、Ｌｅｕ２３４－Ｓｅｒ　２３９、及びＣＨ２ドメイン中の炭水化物残基Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミンに集中している（Ｓｏｎｄｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４０６（６７９３）：２６７－２７３を参照されたい）。既知のドメインに基づいて、ファージディスプレイライブラリー若しくは酵母表面ディスプレイｃＤＮＡライブラリーを使用することによってなど、ＣＤ１６に対する結合親和性を増強又は減少させるように選択することができるか、又は相互作用の既知の３次元構造に基づいて設計することができる。したがって、ある特定の実施形態では、抗体Ｆｃドメイン又はその一部は、ヒンジ及びＣＨ２ドメインを含む。
【０３４３】
ヘテロ二量体抗体重鎖の組み立ては、同じ細胞中で２つの異なる抗体重鎖配列を発現させることによって達成することができ、これは各抗体重鎖のホモ二量体の組み立て、並びにヘテロ二量体の組み立てをもたらし得る。ヘテロ二量体の優先的組み立てを推進することは、米国特許出願公開第１３／４９４８７０号明細書、同第１６／０２８８５０号明細書、同第１１／５３３７０９号明細書、同第１２／８７５０１５号明細書、同第１３／２８９９３４号明細書、同第１４／７７３４１８号明細書、同第１２／８１１２０７号明細書、同第１３／８６６７５６号明細書、同第１４／６４７４８０号明細書、同第１３／６４２２５３、及び同第１４／８３０３３６号明細書に示されるように、各抗体重鎖定常領域のＣＨ３ドメイン中に異なる突然変異を組み込むことによって達成することができる。例えば、突然変異は、ヒトＩｇＧ１に基づくＣＨ３ドメイン中で作製することができ、第１のポリペプチド及び第２のポリペプチド内にアミノ酸置換の別個の対を組み込み、これら２つの鎖が互いに選択的にヘテロ二量体化することを可能にする。以下に例示されるアミノ酸置換の位置は、ＫａｂａｔによるＥＵインデックス（全体が参照により組み込まれる、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ）に従って全て番号付けされている。抗体の分野における当業者は、これらの規則（コンベンション）が免疫グロブリン配列の特定の領域における非連続的な番号付けからなり、免疫グロブリンファミリーにおける保存された位置への標準化された参照を可能にすることを理解されるであろう。したがって、ＥＵインデックスによって、又はＫａｂａｔナンバリングスキームによって定義される任意の所与の免疫グロブリンの位置は、必ずしもその連続的な配列に対応するとは限らない。
【０３４４】
Ｋａｂａｔ又はＥＵインデックスナンバリングによる残基番号の知識を備えた上で、当業者は、本発明の範囲内のアミノ酸配列修飾を一般的に使用される任意のナンバリング規則に従って同定するために、当該技術分野の教示を適用することができる。配列番号は、所与のポリペプチド内のアミノ酸の連続的なナンバリングを提供し、したがって、Ｋａｂａｔ又はＥＵインデックスによって提供されるような対応するアミノ酸番号とは一致しない場合があることが理解される。
【０３４５】
１つのシナリオでは、第１のポリペプチド中のアミノ酸置換は、元のアミノ酸を、アルギニン（Ｒ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）又はトリプトファン（Ｗ）から選択されるより大きなアミノ酸に置き換え、第２のポリペプチド中の少なくとも１つのアミノ酸置換は、元のアミノ酸を、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、又

はバリン（Ｖ）から選択されるより小さなアミノ酸に置き換え、それによって、より大きなアミノ酸置換（突起）がより小さなアミノ酸置換（空洞）に嵌まり込む。例えば、１つのポリペプチドは、Ｔ３６６Ｗ置換を組み込むことができ、他のポリペプチドは、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含む３つの置換を組み込むことができる。

【０３４６】

本出願に記載の抗体重鎖可変ドメインは、任意選択で、抗体定常領域、例えば、ヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３ドメイン（ＣＨ１ドメインを有するか、又は有さない）を含むＩｇＧ定常領域と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列に結合することができる。いくつかの実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ヒト抗体定常領域、例えば、ヒトＩｇＧ１定常領域、ＩｇＧ２定常領域、ＩｇＧ３定常領域、又はＩｇＧ４定常領域と少なくとも９０％同一である。一実施形態では、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン又はその一部は、野生型ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ配列

【化２】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号
118)

と少なくとも９０％（例えば、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％、又は１００％）同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの他の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、別の哺乳動物、例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、又はウマに由来の抗体定常領域と少なくとも９０％同一である。

【０３４７】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖ又はＦａｂフラグメントに連結する抗体定常ドメインは、ＣＤ１６に結合することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、抗体Ｆｃドメインの一部（例えば、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメインの一部）を組み込み、ここでは抗体Ｆｃドメインは、ヒンジ及びＣＨ２ドメイン（例えば、ヒトＩｇＧ１抗体のヒンジ及びＣＨ２ドメイン）、並びに／又はヒトＩｇＧ抗体のアミノ酸配列２３４～３３２と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む。

【０３４８】

ヒトＩｇＧ１定常領域と比較して、１つ以上の突然変異を、例えば、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１及び／又はＫ４３９において、定常領域に組み込むことができる。例示的な置換としては、例えば、Ｑ３４７Ｅ、Ｑ３４７Ｒ、Ｙ３４９Ｓ、Ｙ３４９Ｋ、Ｙ３４９Ｔ、Ｙ３４９Ｄ、Ｙ３４９Ｅ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｋ、Ｌ３５１Ｄ、Ｌ３５１Ｙ、Ｓ３５４Ｃ、Ｅ３５６Ｋ、Ｅ３５７Ｑ、Ｅ３５７Ｌ、Ｅ３５７Ｗ、Ｋ３６０Ｅ、Ｋ３６０Ｗ、Ｑ３６２Ｅ、Ｓ３６４Ｋ、Ｓ３６４Ｅ、Ｓ３６４Ｈ、Ｓ３６４Ｄ、Ｔ３６６Ｖ、Ｔ３６６Ｉ、Ｔ３６６Ｌ、Ｔ３６６Ｍ、Ｔ３６６Ｋ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ｅ、Ｌ３６８Ａ、Ｌ３６８Ｄ、Ｋ３７０Ｓ、Ｎ３９０Ｄ、Ｎ３９０Ｅ、Ｋ３９２Ｌ、Ｋ３９２Ｍ、Ｋ３９２Ｖ、Ｋ３９２Ｆ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｗ、Ｄ３９９Ｒ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｖ、Ｓ４００Ｋ、Ｓ４００Ｒ、Ｄ４０１Ｋ、Ｆ４０５Ａ、Ｆ４０５Ｔ、Ｆ４０５Ｌ、Ｙ４０７Ａ、Ｙ４０７Ｉ、Ｙ４０７Ｖ、Ｋ４０９Ｆ、Ｋ４０９Ｗ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ４０９Ｒ、Ｔ４１１Ｄ、Ｔ４１１Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、及びＫ４３９Ｅが挙げられる。

【０３４９】

ある特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１定常領域のＣＨ１に組み込むことができる突然変異は、アミノ酸Ｖ１２５、Ｆ１２６、Ｐ１２７、Ｔ１３５、Ｔ１３９、Ａ１４０、Ｆ１７０、Ｐ１７１、及び／又はＶ１７３におけるものであり得る。ある特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１定常領域のＣκに組み込むことができる突然変異は、アミノ酸Ｅ１２３、Ｆ１１６、Ｓ１７６、Ｖ１６３、Ｓ１７４、及び／又はＴ１６４におけるものであり得る。

【０３５０】

或いは、アミノ酸置換は、表３に示される以下の置換のセットから選択され得る。

【表２４】

表3		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	S364E/F405A	Y349K/T394F
セット2	S364H/D401K	Y349T/T411E
セット3	S364H/T394F	Y349T/F405A
セット4	S364E/T394F	Y349K/F405A
セット5	S364E/T411E	Y349K/D401K
セット6	S364D/T394F	Y349K/F405A
セット7	S364H/F405A	Y349T/T394F
セット8	S364K/E357Q	L368D/K370S
セット9	L368D/K370S	S364K
セット10	L368E/K370S	S364K
セット11	K360E/Q362E	D401K
セット12	L368D/K370S	S364K/E357L
セット13	K370S	S364K/E357Q
セット14	F405L	K409R
セット15	K409R	F405L

【０３５１】

或いは、アミノ酸置換は、表４に示される以下の置換のセットから選択され得る。

【表２５】

表4		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	K409W	D399V/F405T
セット2	Y349S	E357W
セット3	K360E	Q347R
セット4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

【０３５２】
或いは、アミノ酸置換は、表５に示される以下の置換のセットから選択され得る。
【表２６】

表5		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	T366K/L351K	L351D/L368E
セット2	T366K/L351K	L351D/Y349E
セット3	T366K/L351K	L351D/Y349D
セット4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
セット5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
セット6	E356K/D399K	K392D/K409D

【０３５３】
或いは、各ポリペプチド鎖中の少なくとも１つのアミノ酸置換は、表６から選択され得る。
【表２７】

表6	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D 及び T411E

【０３５４】
或いは、少なくとも１つのアミノ酸置換は、表７中の以下の置換のセットから選択する

ことができ、ここでは、第１のポリペプチドの欄において示される位置は、任意の既知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、第２のポリペプチドの欄において示される位置は、任意の既知の正に帯電したアミノ酸によって置き換えられる。

【表２８】

表7	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
K392, K370, K409, 又はK439	D399, E356, 又はE357

【０３５５】

或いは、少なくとも１つのアミノ酸置換は、表８中の以下のセットから選択することができ、ここでは、第１のポリペプチドの欄において示される位置は、任意の既知の正に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、第２のポリペプチドの欄において示される位置は、任意の既知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられる。

【表２９】

表8	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
D399, E356, 又はE357	K409, K439, K370, 又はK392

【０３５６】

或いは、アミノ酸置換は、表９における以下のセットから選択され得る。

【表３０】

表9	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
T350V, L351Y, F405A, 及びY407V	T350V, T366L, K392L, 及びT394W

【０３５７】

或いは、又は加えて、ヘテロ多量体タンパク質の構造安定性は、第１又は第２のポリペプチド鎖のいずれかにＳ３５４Ｃを導入し、反対側のポリペプチド鎖にＹ３４９Ｃを導入し、これが２つのポリペプチドの界面内に人工的ジスルフィド架橋を形成することによって増加させることができる。

【０３５８】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とはＴ３６６位で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６、Ｌ３６８、及びＹ４０７からなる群から選択される１つ以上の位置において異なる。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６、Ｌ３６８及びＹ４０７からなる群から選択される１つ以上の位置において異なり、並びに抗体定常領域

の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とはＴ３６６位で異なる。

【０３６０】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｔ３９４、Ｄ４０１、Ｆ４０５、及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９、Ｅ３５７、Ｓ３６４、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｔ３９４、Ｄ４０１、Ｆ４０５及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９、Ｅ３５７、Ｓ３６４、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｔ３９４、Ｄ４０１、Ｆ４０５及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｔ３９４、Ｄ４０１、Ｆ４０５、及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６２】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｌ３５１、Ｄ３９９、Ｓ４００及びＹ４０７からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｋ４０９及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６３】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｋ４０９及びＴ４１１からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｌ３５１、Ｄ３９９、Ｓ４００及びＹ４０７からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６４】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｋ３６０、及びＫ４０９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｑ３４７、Ｅ３５７、Ｄ３９９及びＦ４０５からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６５】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｑ３４７、Ｅ３５７、Ｄ３９９及びＦ４０５からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９、Ｋ３６０、Ｑ３４７及びＫ４０９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６６】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｋ３７０、Ｋ３９２、Ｋ４０９及びＫ４３９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常

領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｄ３５６、Ｅ３５７及びＤ３９９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６７】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｄ３５６、Ｅ３５７及びＤ３９９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｋ３７０、Ｋ３９２、Ｋ４０９及びＫ４３９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６８】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｌ３５１、Ｅ３５６、Ｔ３６６及びＤ３９９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｌ３６８、Ｋ３９２及びＫ４０９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３６９】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｌ３６８、Ｋ３９２及びＫ４０９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｌ３５１、Ｅ３５６、Ｔ３６６及びＤ３９９からなる群から選択される１つ以上の位置で異なる。

【０３７０】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｓ３５４Ｃ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９Ｃ置換によって異なる。

【０３７１】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｙ３４９Ｃ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｓ３５４Ｃ置換によって異なる。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｋ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｑ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ及びＦ４０５Ｔ置換によって異なる。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｑ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ及びＦ４０５Ｔ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｋ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換によって異なる。

【０３７４】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６Ｗ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば

、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６Ｓ、Ｔ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖ置換によって異なる。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６Ｓ、Ｔ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３６６Ｗ置換によって異なる。

【０３７６】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、及びＹ４０７Ｖ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ、及びＴ３９４Ｗ置換によって異なる。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ、及びＴ３９４Ｗ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、及びＹ４０７Ｖ置換によって異なる。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域の１つのポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｆ４０５Ｌ置換によって異なり、並びに抗体定常領域の他のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、ＩｇＧ１（例えば、ヒトＩｇＧ１）定常領域のアミノ酸配列とは、Ｋ４０９Ｒ置換によって異なる。

【０３７９】

例示的な多重特異性結合タンパク質

以下に列挙されるのは、各々が抗体定常領域に連結するＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位とＮＫＧ２Ｄに結合する抗原結合部位とを含むＴｒｉＮＫＥＴの例であり、抗体定常領域は、２つのＦｃ鎖のヘテロ二量体化を可能にする突然変異を含む。

【０３８０】

例示的なＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴは、Ｆ３’、Ｆ４’、及び２－Ｆａｂフォーマットで企図される。上述したように、Ｆ３’フォーマットでは、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位はｓｃＦｖであり、ＮＫＧ２Ｄに結合する抗原結合部位はＦａｂである。Ｆ４フォーマットでは、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位はＦａｂフラグメントであり、ＮＫＧ２Ｄに結合する抗原結合部位はｓｃＦｖである。各ＴｒｉＮＫＥＴにおいて、ｓｃＦｖは、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含むことができ、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。２－Ｆａｂフォーマットにおいて、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗原結合部位及びＮＫＧ２Ｄに結合する抗原結合部位の両方がＦａｂである。

【０３８１】

ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとは、リンカー、例えば、ペプチドリンカーを介して接続され得る。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、可動性リンカーである。リンカーのアミノ酸組成に関しては、ペプチドは可動性を付与し、本出願に記載のタンパク質の他のドメインの構造及び機能を妨げず、プロテアーゼからの切断に対抗する特性で選択される。例えば、グリシン及びセリン残基は、一般的にプロテアーゼ耐性を提供する。ある特定の実施形態では、ＶＬは、$(GlyGlyGlyGlySer)_4$（$(G4S)_4$）リンカー（配列番号１１９）を介してＶＨのＮ末端又はＣ末端に連結される。

【０３８２】

リンカー（例えば、可動性）の長さは「短い」、例えば０、１、２、３、４、５、６、

７、８、９、１０、１１又は１２個のアミノ酸残基であり得るか、又は「長い」、例えば、少なくとも１３個のアミノ酸残基であり得る。ある特定の実施形態では、リンカーは、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２５、１０～２０、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、１５～２０、２０～５０、２０～４０、２０～３０、又は２０～２５個のアミノ酸残基の長さである。

【０３８３】

ある特定の実施形態では、リンカーは、（ＧＳ）$_n$（配列番号１２０）、（ＧＧＳ）$_n$（配列番号１２１）、（ＧＧＧＳ）$_n$（配列番号１２２）、（ＧＧＳＧ）$_n$（配列番号１２３）、（ＧＧＳＧＧ）$_n$（配列番号１２４）、及び（ＧＧＧＧＳ）$_n$（配列番号１２５）を含むか、又はこれらからなり、式中ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０である。ある特定の実施形態では、リンカーは、表１０に列挙されるように、配列番号１１９及び配列番号１２６～１３４から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はそれらからなる。

【表３１】

表 10	
配列番号	アミノ酸配列
配列番号126	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
配列番号127	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
配列番号128	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
配列番号129	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
配列番号130	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
配列番号131	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号119	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号132	GGGGSGGGGSGGGGS
配列番号133	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号134	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
配列番号274	SGSGGGGS

【０３８４】

Ｆ３’－ＴｒｉＮＫＥＴにおいて、ＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖは、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーを介してＦｃのＮ末端に連結される。Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーは、可動性と最適な形状との間のバランスをとるために、エルボーヒンジ領域配列に含まれる。ある特定の実施形態では、追加のアミノ酸配列Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙが、ヒンジにおいて、Ａｌａ－Ｓｅｒ又はＧｌｙ－Ｓｅｒ配列に対してＮ末端又はＣ末端に付加され得る。Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴにおいて、ＮＫＧ２Ｄ結合ｓｃＦｖは、アミノ酸配列ＳＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）を含む短いリンカーを介して、ＦｃのＣ末端に連結される。

【０３８５】
これらの例示的なＴｒｉＮＫＥＴを説明するために、本明細書で使用される場合、Ｆｃは抗体ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む。各例示的なＴｒｉＮＫＥＴにおいて、ｓｃＦｖに連結されたＦｃドメインは、Ｑ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔの突然変異を含み、Ｆａｂに連結されたＦｃドメインは、ヘテロ二量体を形成するためにマッチする突然変異Ｋ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗを含む。ｓｃＦｖに連結するＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ置換を更に含み、これはＦａｂに連結したＦｃ上のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。これらの置換は、このサブセクションに記載される配列において、太字で表示されている。

【０３８６】
例えば、本開示に記載のＴｒｉＮＫＥＴは、イアナルマブ－Ｆ３’である。イアナルマブ－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結された、表２に記載のイアナルマブのＶＨ及びＶＬを、ＶＨがＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で含むＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ－結合Ｆａｂフラグメントとを含む。イアナルマブ－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－イアナルマブ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９３）、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）を含む。

ｓｃＦｖ－イアナルマブ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９３）（「Ｓ鎖」）
【化３】

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRCLEWLGR
IYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYQWVPKIGVF
DSWGQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）（「Ｈ鎖」）
【化４】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC
TLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSW
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号：１９５）（「Ｌ鎖」）

【化５】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３８７】

ｓｃＦｖ－イアナルマブ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９３）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは、配列番号２０７のアミノ酸配列を有し、これは（G_4S）$_4$リンカーを介して、イアナルマブの軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたイアナルマブの重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＱ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０３８８】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－イアナルマブ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－イアナルマブ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０３８９】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０３９０】

本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、イアナルマブ－２－Ｆａｂである。イアナルマブ－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、表２に記載されるイアナルマブのＶＨ配列及びＶＬ配列を含むＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている（これは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞傷害性増強突然変異を含まない）、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントとを含む。イアナルマブ－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：イアナルマブ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、イアナルマブ－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ－Ｇｅｎｍａｂを含む。

イアナルマブ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号１９６）

【化６】

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWLGRIYYRSKW
YNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYQWVPKIGVFDSWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

イアナルマブ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９７）

【化７】

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFILPEYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQFYSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ＡＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）

【化８】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ＡＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）

【化９】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３９１】

イアナルマブ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号１９６）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合イアナルマブの重鎖可変ドメイン（配列番号１４５）及びＣＨ１ドメインを含む。イアナルマブ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ

－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。

【０３９２】

イアナルマブ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９７）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合イアナルマブ（配列番号１４６）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０３９３】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むイアナルマブ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。

【０３９４】

上述したように、Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。

【０３９５】

本開示に記載の別の例示的なＴｒｉＮＫＥＴは、ｈＣＯＨ－１－Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴである。ｈＣＯＨ－１－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結されたＶＨが、ＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向での、表２のｈＣＯＨ－１に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖ配列と、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントと、を含む。ｈＣＯＨ－１－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９８）（「Ｓ鎖」）

【化１０】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIG
YISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYW
GQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

【０３９６】

ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９８）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結したＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは配列番号１４９のアミノ配列を有し、これは$(G_4S)_4$リンカーを介してｈＣＯＨ－１の軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたｈＣＯＨ－１の重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＧ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０３９７】
上述したように、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインはＣＨ３ドメイン中のＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。
【０３９８】
上述したように、Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。
【０３９９】
本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、ｈＣＯＨ－１－２－Ｆａｂである。ｈＣＯＨ－１－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、ｈＣＯＨ－１に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合フラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントとを含む。ｈＣＯＨ－１－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：ｈＣＯＨ－１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。
ｈＣＯＨ－１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０８）
【化１１】
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYN
PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０９）
【化１２】
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４００】
ｈＣＯＨ－１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０８）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｈＣＯＨ－１の重鎖可変ドメイン（配列番号１５３）及びＣＨ１ドメインを含む。ｈＣＯＨ－１－Ｖ

Ｈ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。

【０４０１】

ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０９）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合ｈＣＯＨ－１の軽鎖可変ドメイン（配列番号１５４）及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４０２】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むｈＣＯＨ－１－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。

【０４０３】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。

【０４０４】

本開示に記載される別の例示的なＴｒｉＮＫＥＴは、ｈＣＯＨ－２－Ｆ３’である。ｈＣＯＨ－２－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結されたＶＨがＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で、表２のｈＣＯＨ－２に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントとを含む。ｈＣＯＨ－２－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２１０）（「Ｓ鎖」）

【化１３】

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKCLEYIGYI
SYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQ
GTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

【０４０５】

ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２１０）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結したＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは、配列番号１９１のアミノ酸配列を含み、これは$(G_4S)_4$リンカーを介して、ｈＣＯＨ－２の軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたｈＣＯＨ－２の重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＧ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み

、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０４０６】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインはＣＨ３ドメイン中のＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４０７】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４０８】

本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、ｈＣＯＨ－２－２－Ｆａｂである。ｈＣＯＨ－２－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、ｈＣＯＨ－２に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメント、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントと、を含む。ｈＣＯＨ－２－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：ｈＣＯＨ－２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

ｈＣＯＨ－２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号１９９）

【化１４】

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYN
PSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２００）

【化１５】

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４０９】

ｈＣＯＨ－２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号１９９）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｈＣＯＨ－２の重鎖可変ドメイン（配列番号１５５）及びＣＨ１ドメインを含む。ｈＣＯＨ－２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。

【０４１０】

ｈＣＯＨ－２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２００）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合ｈＣＯＨ－２の軽鎖可変ドメイン（配列番号１５６）及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４１１】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号９５）の重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメインとを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むｈＣＯＨ－２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。

【０４１２】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。

【０４１３】

本開示に記載される別の例示的なＴｒｉＮＫＥＴは、Ｖ３－４６ｓ－Ｆ３’である。Ｖ３－４６ｓ－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結されたＶＨがＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で、表２のＶ３－４６ｓに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖ配列と、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントとを含む。Ｖ３－４６ｓ－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－ｈＣＯＨ－１－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２０１）（「Ｓ鎖」）

【化１６】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPS
VGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGM
DYWGQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG

【０４１４】

ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２０１）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖ

は、配列番号１３９のアミノ酸配列を有し、これは（Ｇ$_4$Ｓ）$_4$リンカーを介してＶ３－４６ｓの軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたＶ３－４６ｓの重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＱ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０４１５】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中のＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４１６】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４１７】

本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、Ｖ３－４６ｓ－２－Ｆａｂである。Ｖ３－４６ｓ－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分を含む、Ｖ３－４６ｓに由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントと、を含む。Ｖ３－４６ｓ－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：Ｖ３－４６ｓ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

Ｖ３－４６ｓ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０２）

【化１７】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVAWVLPSVGFTD
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０３）

【化１８】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４１８】

Ｖ３－４６ｓ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０２）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｖ３－４６ｓの重鎖可変ドメイン（配列番号１４７）及びＣＨ１ドメインを含む。Ｖ３－４６ｓ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。

【０４１９】

Ｖ３－４６ｓ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０３）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｖ３－４６ｓの軽鎖可変ドメイン（配列番号１４８）及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４２０】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むＶ３－４６ｓ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。

【０４２１】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。

【０４２２】

本開示に記載される別の例示的なＴｒｉＮＫＥＴは、Ｖ３－４６ｓ－４２－Ｆ３’である。Ｖ３－４６ｓ－４２－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結したＶＨがＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で、表２のＶ３－４６ｓ－４２に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖ配列と、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントと、を含む。Ｖ３－４６ｓ－４２－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２０４）（「Ｓ鎖」）

【化１９】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLYSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKCLEWVAWVLPS
VGFTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGM
DYWGQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG

【０４２３】

ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２０４）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは配列番号１４１のアミノ酸配列を有し、これは（Ｇ$_4$Ｓ）$_4$リンカーを介してＶ３－４６ｓ－４２の軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたＶ３－４６ｓ－４２の重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＱ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０４２４】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４２５】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４２６】

本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、Ｖ３－４６ｓ－４２－２－Ｆａｂである。Ｖ３－４６ｓ－４２－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ｖ３－４６ｓ－４２に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含むＡ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、Ｃｈ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントとを含む。Ｖ３－４６ｓ－４２－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０２）
【化２０】
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKGLEWVAWVLPSVGFTD
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVCYNRLGVCAGGMDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０６）
【化２１】
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDISTAVAWYQQKPGKAPKLLIYAASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSQISPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４２７】
Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２０５）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これは、Ｆｃドメインに接続された、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｖ３－４６ｓ－４２（配列番号１４７）の重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む。Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。
【０４２８】
Ｖ３－４６ｓ－４２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０６）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｖ３－４６ｓ－４２（配列番号１５０）の軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。
【０４２９】
Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むＶ３－４６ｓ－４２－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。
【０４３０】
Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。
【０４３１】
本開示に記載される別の例示的なＴｒｉＮＫＥＴは、Ｈｕ９．１－７３－Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴである。Ｈｕ９．１－７３－Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、（ａ）Ｆｃドメインに連結されたＶＨが、ＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で、表２のＨｕ９．１－７３に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖ配列と、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦ

ｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合ＦａｂフラグメントＨｕ９．１－７３－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。ｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２１１）（「Ｓ鎖」）

【化２２】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQH
LDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGCGTKVEIKGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKC
LEWVGFIRDKANGYTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVR
RALDYWGQGTLVTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

【０４３２】

ｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号２１１）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介して、Ｆｃドメインに連結されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは配列番号１４３のアミノ酸配列を有し、これは$(G_4S)_4$リンカーを介して、ｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３の軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３の重鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＱ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０４３３】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインはＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ置換を含み、これはｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４３４】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４３５】

本開示に記載される別のＴｒｉＮＫＥＴは、Ｈｕ９．１－７３－２－Ｆａｂである。Ｈｕ９．１－７３－２－Ｆａｂは、（ａ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ｈｕ９．１－７３に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって

、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合ＦａｂフラグメントＨｕ９．１－７３－２－Ｆａｂは、４つのポリペプチド：Ｈｕ９．１－７３－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＣＬ、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬを含む。

Ｈｕ９．１－７３－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１２）

【化２３】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPMAGFYTSWVRQAPGKGLEWVGFIRDKANG
YTTEYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAQVRRALDYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０５）

【化２４】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAQH
LDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３６】

Ｈｕ９．１－７３－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１２）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｈｕ９．１－７３の重鎖可変ドメイン（配列番号１５１）及びＣＨ１ドメインを含む。Ｈｕ９．１－７３－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、Ｋ４０９Ｒ置換を含むＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＦ４０５Ｌ置換を含む。

【０４３７】

Ｈｕ９．１－７３－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２０５）は、ＢＡＦＦ－Ｒ－結合Ｈｕ９．１－７３の軽鎖可変ドメイン（配列番号１５２）及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４３８】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ（配列番号２１３）は、Ｆｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃドメインは、Ｆ４０５Ｌ置換を含むＨｕ９．１－７３－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ－Ｇｅｎｍａｂ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ４０９Ｒ置換を含む。

【０４３９】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列番号８５）及び軽鎖定常ドメインを含む。

【０４４０】

本開示に記載されるＴｒｉＮＫＥＴの別の例は、ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ３’である。ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ３’は、（ａ）Ｆｃドメインに連結したＶＨが、ＶＬに

対してＮ末端に位置付けられる配向で、表２のＡＢ１４２４／１６１２（ジスルフィド架橋形成のためのシステインヘテロ二量体化突然変異を用いて）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖ配列と、（ｂ）重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖部分と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、Ａ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントと、を含む。ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ３’は、３つのポリペプチド：ｓｃＦｖ－ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ（配列番号１９３）、Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）、及びＡ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）を含む。

ｓｃＦｖ－ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＶＬ－Ｆｃ（配列番号２７０）（「Ｓ鎖」）

【化２５】

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASN
KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDV
WGQGTTVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI
SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSYSIPLTFGCGTKVEIKGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）（「Ｈ鎖」）

【化２６】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC
TLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSW
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号：１９５）（「Ｌ鎖」）

【化２７】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４４１】

ｓｃＦｖ－ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＶＬ－Ｆｃ（配列番号２７０）は、Ａｌａ－Ｓｅｒを含むヒンジを介してＦｃドメインに連結したＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖの完全配列を表す。ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、

Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるＡ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＹ３４９Ｃ置換とジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。ｓｃＦｖは、配列番号２５４のアミノ酸配列を有し、これは（$Ｇ_4Ｓ$）$_4$リンカーを介して、ＡＢ１４２４／１６１２の軽鎖可変ドメインのＣ末端に接続されたＡＢ１４２４／１６１２の軽鎖可変ドメインを含む。ｓｃＦｖは、Ｇ４４及びＧ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中にシステインの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。

【０４４２】

Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ（配列番号１９４）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中のＹ３４９Ｃ置換を含み、ｓｃＦｖ－ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃにおいて、Ｆｃドメインはまた、ｓｃＦｖ－ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＶＨ－Ｆｃ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４４３】

Ａ４９ＭＩ－ＶＬ－ＣＬ（配列番号１９５）は、ＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩ（配列番号８５）の軽鎖可変ドメインと軽鎖定常ドメインとを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４４４】

本開示に記載されるＴｒｉＮＫＥＴの別の例は、ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ４である。ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ４は、（ａ）各々が、重鎖可変ドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖と、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分とを含む、表２のＡＢ１４２４／１６１２に由来する２つのＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントであって、ＣＨ１ドメインがＦｃドメインに接続されている２つのＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントと、（ｂ）ＶＨがＶＬに対してＣ末端に位置付けられる配向で、ＦｃドメインのＣ末端に連結したＡ４９ＭＩに由来するＮＫＧ２Ｄ結合ｓｃＦｖ配列と、を含む。ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ４は、４つのポリペプチド：ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ（配列番号２７１）を含む第１のポリペプチド、ＡＢ－１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３（配列番号２７２）を含む第２のポリペプチド、並びに各々がＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２７３）を含む第３及び第４のポリペプチドを含む。

ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ（配列番号２７１）（「Ｍ」鎖）

【化２８】

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDASN
KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVS
DGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*SGSGGGGS*DIQM
TQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSS
YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWG
QGTLVTVSS

ＡＢ－１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３（配列番号２７２）（「Ｈ」鎖）

【化２９】

EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDASN
KYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHLRGQYIEDYGLDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVIITFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIIKPSNTKVDKKVLPKSCDKTII
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２７３）（「Ｌ」鎖）

【化３０】

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４４５】

ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ（配列番号２７１）は、Ｆａｂ断片の重鎖部分を表し、これは、Ｆｃドメインに接続され、ｓｃＦｖに更に接続された、ＢＡＦＦ－Ｒ結合ＡＢ１４２４／１６１２の重鎖可変ドメイン（配列番号２５０）及びＣＨ１ドメインを含む。ｓｃＦｖは配列番号２７５のアミノ酸配列を有し、これは（Ｇ$_4$Ｓ）$_4$リンカーを介して、Ａ４９ＭＩの軽鎖可変ドメイン（配列

番号８５）のＣ末端に接続されたＮＫＧ２Ｄ結合Ａ４９ＭＩの重鎖可変ドメイン（配列番号９５）を含む。ｓｃＦｖはまた、Ｇ４４及びＧ１００において、ＶＨ及びＶＬ領域中のＣｙｓの置換を含み、ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のジスルフィド架橋の形成を容易にする。ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖのｓｃＦｖは、短いＳＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２７４）リンカーによってＣＨ３ドメインのＣ末端に連結される。ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ中のＦｃドメインは、ヘテロ二量体化のためのＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含み、以下に記載されるように、ＡＢ－１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３中のＹ３４９Ｃ置換とのジスルフィド結合を形成するためのＳ３５４Ｃ置換を含む。

【０４４６】

ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３（配列番号２７２）はＦａｂフラグメントの重鎖部分を表し、これはＦｃドメインに接続されたＢＡＦＦ－Ｒ結合ＡＢ１４２４／１６１２の重鎖可変ドメイン（配列番号２５０）及びＣＨ１ドメインを含む。Ａ４９ＭＩ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｆｃ中のＦｃドメインは、ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ置換を含み、これはＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ中のＦｃ上のＳ３５４Ｃ置換とジスルフィド結合を形成する。ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３において、Ｆｃドメインはまた、ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ中のＦｃとのヘテロ二量体化のためのＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含む。

【０４４７】

ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２７３）は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合ＡＢ１４２４／１６１２の軽鎖可変ドメイン（配列番号２５１）及び軽鎖定常ドメインを含むＦａｂフラグメントの軽鎖部分を表す。

【０４４８】

ある特定の実施形態では、本開示に記載されるＦ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、（ａ）ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントに連結するＦｃドメインが、ヘテロ二量体化のためのＣＨ３ドメイン中にＱ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、及びＦ４０５Ｔ置換を含むこと、並びにＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインが、ＣＨ３ドメイン中にマッチするＫ３６０Ｅ及びＫ４０９Ｗ置換を含むこと、及び／又は（ｂ）ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントに連結したＦｃドメインが、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ置換を含むこと、並びにＢＡＦＦ－Ｒ結合ｓｃＦｖに連結したＦｃドメインが、ジスルフィド結合を形成するためのＣＨ３ドメイン中のマッチするＹ３４９Ｃ置換を含むことを除いては、上述した例示的なＴｒｉＮＫＥＴのうちの１つと同一である。

【０４４９】

ある特定の実施形態では、本開示に記載される２－Ｆａｂ　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂフラグメントに連結したＦｃドメインが、ヘテロ二量体化のためのＣＨ３ドメイン中のＦ４０５Ｌ置換を含むこと、並びにＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｆａｂフラグメントに連結したＦｃドメインが、ＣＨ３ドメイン中のマッチするＫ４０９Ｒ置換を含むことを除いては、上述した例示的なＴｒｉＮＫＥＴのうちの１つと同一である。

【０４５０】

当業者は、タンパク質の製造及び／又は保管中に、Ｎ末端のグルタミン酸（Ｅ）又はグルタミン（Ｑ）が環化されてラクタムを形成することができる（例えば、自発的に若しくは製造及び／又は保管中に存在する酵素によって触媒される）ことを理解するであろう。したがって、ポリペプチドのアミノ酸配列のＮ末端残基がＥ又はＱであるいくつかの実施形態では、ピログルタミン酸に置き換えられたＥ又はＱと対応するアミノ酸配列も本明細書で企図される。

【０４５１】

当業者はまた、タンパク質製造及び／又は保管中に、タンパク質のＣ末端のリジン（Ｋ）が除去され得る（例えば、自発的に若しくは製造及び／又は保管中に存在する酵素によ

って触媒される）ことも理解するであろう。そのようなＫの除去は、多くの場合、Ｆｃドメインをそのｃ末端に含むタンパク質で観察される。したがって、ポリペプチドのアミノ酸配列（例えば、Ｆｃドメイン配列）のＣ末端残基がＫであるいくつかの実施形態では、Ｋが除去された対応するアミノ酸配列も本明細書で企図される。

【０４５２】

上述した多重特異性タンパク質は、当業者に周知の組換えＤＮＡ技術を使用して作製することができる。例えば、第１の免疫グロブリン重鎖をコードする第１の核酸配列は、第１の発現ベクター中にクローニングされることができ、第２の免疫グロブリン重鎖をコードする第２の核酸配列は、第２の発現ベクター中にクローニングされることができ、免疫グロブリン軽鎖をコードする第３の核酸配列は、第３の発現ベクター中にクローニングされることができ、第１、第２、及び第３の発現ベクターは、宿主細胞中に一緒に安定してトランスフェクトされ、多量体タンパク質を産生することができる。

【０４５３】

多重特異性タンパク質の最高の収率を達成するために、第１、第２、及び第３の発現ベクターの様々な比率が探索され、宿主細胞へのトランスフェクションのために最適な比率を決定することができる。トランスフェクション後に、限界希釈法、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、顕微鏡法、又はＣｌｏｎｅｐｉｘ技術などの当該技術分野において既知の方法を使用して、単一のクローンが細胞バンク生成のために単離され得る。

【０４５４】

クローンは、バイオリアクタースケールアップに好適な条件下で培養され、多重特異性タンパク質の発現を維持することができる。多重特異性タンパク質は、遠心分離、深層濾過、細胞溶解、均質化、凍結融解、親和性精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、及び混合モードクロマトグラフィーを含む当該技術分野において既知の方法を使用して単離及び精製することができる。

【０４５５】

ＩＩ．　多重特異性タンパク質の特性

本明細書に記載の多重特異性タンパク質は、ＮＫＧ２Ｄ結合部位と、ＢＡＦＦ－Ｒ結合部位と、ＣＤ１６に結合するのに十分な抗体Ｆｃドメイン若しくはその一部、又はＣＤ１６に結合する抗原結合部位と、を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、Ｆ４－ＴｒｉＮＫＥＴフォーマットで例示されるような（例えば、図２Ｃ及び２Ｄ）、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位を含有する。

【０４５６】

いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するモノクローナル抗体、すなわち、多重特異性タンパク質中に組み込まれたものと同じＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を含有するモノクローナル抗体と同様な熱安定性を示す。

【０４５７】

いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、ＮＫ細胞などのＮＫＧ２Ｄ及び／又はＣＤ１６を発現する細胞、及びある特定の腫瘍細胞などのＢＡＦＦ－Ｒを発現する細胞に同時に結合する。多重特異性タンパク質のＮＫ細胞への結合は、ＮＫ細胞がＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ発現腫瘍細胞）の破壊に向かう活性を増強することができる。ＮＫ細胞がストレス状態にある標的細胞に対してより強力な細胞傷害性を呈することが報告されている（Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１４）Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　Ｄｉｆｆｅｒ．２１（１）：５－１４）を参照されたい）。理論によって束縛されることを望むものではないが、ＮＫ細胞がＴｒｉＮＫＥＴによって細胞の集団と関与する場合、ＮＫ細胞はストレス状態にある標的細胞（例えば、悪性細胞及び腫瘍微小環境中の細胞）を選択的に殺傷し得るという仮説が立てられている。このメカニズムは、ＴｒｉＮＫＥＴの増加した特異性及び減少した毒性に寄与することができ、ＢＡＦＦ－Ｒの発現が所望の標的細胞に限定されない場合であっても、ストレスを受けた細胞を選択的に除去することを可能にする。

【０４５８】

いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する抗ＢＡＦＦ－Ｒモノクローナル抗体（すなわち、多重特異性タンパク質中に組み込まれたものと同じＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を含有するモノクローナル抗体）に対する同様な親和性でＢＡＦＦ－Ｒに結合する。いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するモノクローナル抗体よりもＢＡＦＦ－Ｒを発現する腫瘍細胞の殺傷において、より効果的である。

【０４５９】

ある特定の実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに対する結合部位を含む、本明細書に記載の多重特異性タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒを発現する細胞と共培養すると、ヒト初代ＮＫ細胞を活性化する。ＮＫ細胞活性化は、ＣＤ１０７ａ脱顆粒及びＩＦＮ－γサイトカインの産生における増加によって特徴付けられる。更に、対応する抗ＢＡＦＦ－Ｒモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒを発現する細胞の存在下で、ヒトＮＫ細胞の優れた活性化を示すことができる。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに対する結合部位を含む本明細書に記載の多重特異性タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒを発現する細胞と共培養すると、休止期及びＩＬ－２活性化ヒトＮＫ細胞の活性化を増強させる。

【０４６１】

いくつかの実施形態では、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する対応するモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、中レベル及び低レベルのＢＡＦＦ－Ｒを発現する腫瘍細胞を標的化する上で利点をもたらす。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、ＴｒｉＮＫＥＴの二価Ｆ４フォーマット（すなわち、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する追加の抗原結合部位を含むＴｒｉＮＫＥＴ）は、ＴｒｉＮＫＥＴがＢＡＦＦ－Ｒに結合する結合能（ａｖｉｄｉｔｙ）を改善し、この効果は、腫瘍細胞の表面上の高レベルのＢＡＦＦ－Ｒの発現及び維持を安定化させる。いくつかの実施形態では、Ｆ４－ＴｒｉＮＫＥＴは、対応するＦ３－ＴｒｉＮＫＥＴ又はＦ３’－ＴｒｉＮＫＥＴよりも腫瘍細胞のより強力な殺傷を媒介する。

【０４６３】

ＩＩＩ．　治療用途

本出願はまた、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質を使用して、自己免疫性疾患若しくは癌を治療するための方法及び／又は本明細書に記載の医薬組成物も記載する。本方法は、ＢＡＦＦ－Ｒを発現する様々な癌又は自己免疫性疾患を治療するために使用され得る。

【０４６４】

治療法は、治療される癌に応じて特性化することができる。治療される癌は、癌細胞の表面上に発現される特定の抗原、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの存在に応じて特性化することができる。

【０４６５】

ＢＡＦＦ－Ｒの発現によって特性化される癌としては、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）、例えば、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性Ｂ大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（ＭＡＬＴ）リンパ腫、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、並びに自己免疫性炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４６６】

本開示に記載のタンパク質、コンジュゲート、細胞、及び／又は医薬組成物が、様々な癌、限定されないが、癌細胞又は癌微小環境中の細胞がＢＡＦＦ－Ｒを発現する癌を治療するために使用され得ることが企図される。

【０４６７】

ある特定の実施形態では、癌は、固形腫瘍である。ある特定の他の実施形態では、癌は

、脳癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝臓癌、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、胃癌、精巣癌、又は子宮癌である。更に他の実施形態では、癌は、血管新生腫瘍、扁平細胞上皮癌、腺癌、小細胞癌、メラノーマ、神経膠腫、神経芽腫、肉腫（例えば、血管肉腫又は軟骨肉腫）、喉頭癌、耳下腺癌、胆管癌、甲状腺癌、末端黒子型メラノーマ、光線角化症、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、肛門管癌、肛門癌、肛門直腸癌、星細胞系腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、胆道癌、骨癌、骨髄癌、気管支癌、気管支腺癌、カルチノイド、胆管細胞癌、軟骨肉腫、脈絡叢乳頭腫／細胞腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、明細胞癌、結合組織癌、嚢胞腺腫、消化器系癌、十二指腸癌、内分泌系癌、卵黄嚢腫癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、内皮細胞癌、上皮癌、上皮細胞癌、ユーイング肉腫、眼及び眼窩の癌、女性性器癌、限局性結節性過形成、胆嚢癌、胃噴門癌、胃底部癌、ガストリン産生腫瘍、神経膠芽腫、グリカゴン産生腫瘍、心臓癌、血管芽種、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝胆道癌、肝細胞癌、ホジキン病、回腸癌、インスリノーマ、上皮内新生物、上皮間扁平細胞新生物、肝内胆管癌、浸潤性扁平上皮癌、空腸癌、関節癌、カポジ肉腫、骨盤癌、大細胞癌、大腸癌、平滑筋肉腫、悪性黒子由来メラノーマ、リンパ腫、男性生殖器癌、悪性メラノーマ、悪性中皮腫、髄芽腫、髄上皮癌、髄膜癌、中皮癌、転移性癌、口癌、粘表皮癌、多発性骨髄腫、筋肉癌、鼻腔癌、神経系癌、神経上皮腺癌結節性メラノーマ、非上皮性皮膚癌、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起膠細胞癌、口腔癌、骨肉腫、漿液性乳頭腺癌、陰茎癌、咽頭癌、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、直腸癌、腎細胞癌、呼吸器系癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性細胞腫、副鼻腔癌、皮膚癌、小細胞癌、小腸癌、平滑筋癌、軟部組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、脊椎癌、扁平上皮癌、横紋筋癌、中皮下癌、表在拡大型メラノーマ、Ｔ細胞白血病、舌癌、未分化癌、尿管癌、尿道癌、膀胱癌、泌尿器系癌、子宮頸部癌、子宮体癌、ぶどう膜メラノーマ、膣癌、疣状癌、ＶＩＰ産生腫瘍、外陰部癌、高分化癌、又はウィルムス腫瘍である。

【０４６８】

ある特定の実施形態では、癌は、悪性血液疾患である。ある特定の実施形態では、悪性血液疾患は、白血病である。ある特定の実施形態では、これは、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、骨髄異形成、骨髄異形成症候群、Ｔリンパ芽急性白血病、又は急性前骨髄球性白血病、慢性骨髄単球性白血病、又は慢性骨髄性白血病の骨髄性型急性転化からなる群から選択される。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、本出願は、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質及び／又は本明細書に記載の医薬組成物を使用して、自己免疫性炎症性疾患を治療するための方法を提供する。本方法は、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、グレーブス病、橋本甲状腺炎、関節リウマチ、炎症性腸疾患、Ｉ型糖尿病、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、乾癬、重症筋無力症、及び血管炎が挙げられるが、これらに限定されない様々なＢＡＦＦ－Ｒ発現Ｂ細胞関連自己免疫性炎症性疾患を治療するために使用され得る。

【０４７０】

ＩＶ．　併用療法

本開示の別の態様は、併用療法を提供する。本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、自己免疫性疾患を治療するために、又は癌を治療するために追加の治療薬と組み合わせて使用することができる。

【０４７１】

自己免疫性炎症性疾患を治療する際の併用療法の一部として使用され得る例示的な治療薬は、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｆｒｏｎｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，８：４６０に記載されており、例えば、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）（例えば、ＣＯＸ－２阻害剤）、グルココルチコイド（例えば、プレドニゾン／プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、並びにデキサメタゾン及びベタメタゾンなどのフッ素化グルココルチコイド

）、疾患修飾性抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤ）（例えば、メトトレキサート、レフルノミド、金化合物、スルファサラジン、アザチオプリン、シクロホスファミド、抗マラリア薬、Ｄ－ペニシラミン、及びシクロスポリン）、抗ＴＮＦ生物製剤（例えば、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴル、及びそれらのバイオシミラー）、並びにＣＴＬＡ－４（例えば、アバタセプト）、ＩＬ－６受容体（例えば、トシリズマブ）、ＩＬ－１（例えば、アナキンラ）、Ｔｈ１免疫反応（ＩＬ－１２／ＩＬ－２３）（例えば、ウステキヌマブ）、Ｔｈ１７免疫反応（ＩＬ－１７）（例えば、セクキヌマブ）及びＣＤ２０（例えば、リツキシマブ）を標的とする他の生物製剤が挙げられる。

【０４７２】

癌を治療する際の併用療法の一部として使用され得る例示的な治療薬としては、例えば、放射線、マイトマイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ビンクリスチン、エトポシド、クラドリビン、ミトブロニトール、メトトレキサート、ドキソルビシン、カルボコン、ペントスタチン、ニトラクリン、ジノスタチン、セトロレリクス、レトロゾール、ランチトレキセド、ダウノルビシン、ファドロゾール、フォテムスチン、チマルファシン、ソブゾキサン、ネダプラチン、シタラビン、ビカルタミド、ビノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリプチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトレチナート、イソトレチノン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、ブトシン、カルモフール、ラゾキサン、シゾフィラン、カルボプラチン、ミトラクトール、テガフール、イホスファミド、プレドニムスチン、ピシバニール、レバニゾール、テニポシド、インプロスルファン、エノシタビン、リスリド、オキシメトロン、タモキシフェン、プロゲステロン、メピチオスタン、エピチオスタノール、ホルメスタン、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－２アルファ、インターフェロン－ベータ、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）、コロニー刺激因子－１、コロニー刺激因子－２、デニロイキンジフチトクス、インターロイキン－２、黄体形成ホルモン放出因子、並びにその同種受容体に対して特異な結合、及び増加した又は減少した血清半減期を示し得る上述の薬剤の変形型が挙げられる。

【０４７３】

癌を治療する際の併用療法の一部として使用され得る薬剤の追加のクラスは、免疫チェックポイント阻害剤である。例示的な免疫チェックポイント阻害剤としては、（ｉ）細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４（ＣＴＬＡ４）、（ｉｉ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ１）、（ｉｉｉ）ＰＤＬ１、（ｉｖ）ＬＡＧ３、（ｖ）Ｂ７－Ｈ３、（ｖｉ）Ｂ７－Ｈ４、及び（ｖｉｉ）ＴＩＭ３のうちの１つ以上を阻害する薬剤が挙げられる。ＣＴＬＡ４阻害剤であるイピリムマブは、メラノーマを治療するために、米国食品医薬品局（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されている。

【０４７４】

癌を治療する際に、併用療法の一部として使用され得る更に他の薬剤は、非チェックポイント標的を標的とするモノクローナル抗体薬剤（例えば、ハーセプチン）及び非細胞傷害剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）である。

【０４７５】

抗癌剤の更に他のカテゴリーには、例えば、（ｉ）ＡＬＫ阻害剤、ＡＴＲ阻害剤、Ａ２Ａアンタゴニスト、塩基除去修復阻害剤、Ｂｃｒ－Ａｂｌチロシンキナーゼ阻害剤、ブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤、ＣＤＣ７阻害剤、ＣＨＫ１阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤、ＤＮＡ－ＰＫ及びｍＴＯＲの両方の阻害剤、ＤＮＭＴ１阻害剤、ＤＮＭＴ１阻害剤＋２－クロロ－デオキシアデニン、ＨＤＡＣ阻害剤、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤、ＩＤＯ阻害剤、ＪＡＫ阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、ＭＥＬＫ阻害剤、ＭＴＨ１阻害剤、ＰＡＲＰ阻害剤、ホスホイノシチド３－キナーゼ阻害剤、ＰＡＲＰ１及びＤＨＯＤＨの両方の阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼ－ＩＩ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、ＶＥＧＦＲ阻害剤、並びにＷＥＥ

１阻害剤から選択される阻害剤；（ｉｉ）ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＣＤ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＨＶＥＭ、ＴＮＦＲＳＦ２５、又はＩＣＯＳのアゴニスト；並びに（ｉｉｉ）ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＧＭ－ＣＳＦ、及びＧ－ＣＳＦから選択されるサイトカインが挙げられる。

【０４７６】

本出願のタンパク質はまた、原発病巣の外科的除去の補助として使用され得る。

【０４７７】

多重特異性結合タンパク質及び追加の治療薬の量、並びに投与の相対的タイミングは、所望の併用療法効果を達成するために選択され得る。例えば、そのような投与を必要とする患者に併用療法を投与する場合、組み合わせる治療薬、又は治療薬を含む医薬組成物は、例えば、連続的に、併せて、一緒に、同時になどの任意の順序で投与され得る。更に、例えば、多重特異性結合タンパク質は、追加の治療薬がその予防効果又は治療効果を発揮する時間の間投与されてもよく、又はその逆であってもよい。

【０４７８】

Ｖ．医薬組成物

本開示はまた、治療有効量の本明細書に記載のタンパク質を含有する医薬組成物も記載する。組成物は、種々の薬物送達システムで使用されるように製剤化することができる。適切な製剤のために、１つ以上の生理学的に許容される賦形剤又は担体を組成物に含めることもできる。本開示で使用するために好適な製剤は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，Ｐａ．，１７ｔｈ ｅｄ．，１９８５に見出される。薬物送達のための方法に関する簡潔な概説については、例えば、Ｌａｎｇｅｒ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３，１９９０）を参照されたい。

【０４７９】

本出願に記載の静脈内薬物送達製剤は、バッグ、ペン、又は注射器に含有されてもよい。ある特定の実施形態では、バッグは、チューブ及び／又は針を含むチャネルに接続されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は、凍結乾燥製剤又は液体製剤であってもよい。ある特定の実施形態では、製剤は、フリーズドライ（凍結乾燥）されてもよく、約１２～６０個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤はフリーズドライされてもよく、４５ｍｇのフリーズドライされた製剤が１個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、約４０ｍｇ～約１００ｍｇのフリーズドライされた製剤が、１個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、１２、２７、又は４５個のバイアルからのフリーズドライされた製剤は、静脈内薬物製剤中に治療用量のタンパク質を得るために組み合わされてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約２５０ｍｇ／バイアル～約１０００ｍｇ／バイアルとして保存されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約６００ｍｇ／バイアルとして保存されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約２５０ｍｇ／バイアルとして保存されてもよい。

【０４８０】

タンパク質は、製剤を形成する緩衝溶液中に治療有効量のタンパク質を含む液体水性医薬製剤中に存在することができる。

【０４８１】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌されてもよく、又は濾過滅菌されてもよい。得られた水溶液は、そのままで使用するためにパッケージ化されてもよく、又は凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥された調製物は投与前に滅菌水性担体と組み合わされる。調製物のｐＨは、典型的には、３～１１、例えば、５～９又は６～８であり、ある特定の実施形態では、７～８、例えば、７～７．５である。得られた固形の組成物は、複数の単回用量単位でパッケージ化されてもよく、各々は、一定量の上述の薬剤を含有する。固形の組成物はまた、柔軟な量のための容器にパッケージ化されてもよい。

【０４８２】

ある特定の実施形態では、本出願は、マンニトール、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム、ポリソルベート８０、水、及び水酸化ナトリウムと組み合わせて、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質を含む、延長された貯蔵寿命を有する製剤を記載する。

【０４８３】

ある特定の実施形態では、ｐＨ緩衝溶液中に本開示のタンパク質を含む水性製剤が調製される。製剤の緩衝液は、約４～約８、例えば、約４．５～約６．０、又は約４．８～約５．５の範囲のｐＨを有してもよく、又は約５．０～約５．２のｐＨを有してもよい。上記に列挙したｐＨの中間の範囲も、本開示の一部であることが意図される。例えば、上限及び／又は下限として、上記に列挙した値のいずれかの組み合わせを使用する値の範囲が含まれることが意図される。ｐＨをこの範囲内に制御する緩衝液の例には、酢酸塩（例えば、酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（コハク酸ナトリウムなど）、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩及び他の有機酸緩衝液が挙げられる。

【０４８４】

ある特定の実施形態では、製剤は、ｐＨを約４～約８の範囲に維持するために、クエン酸塩及びリン酸塩を含有する緩衝系を含む。ある特定の実施形態では、ｐＨの範囲は、約４．５～約６．０、又は約ｐＨ４．８～約５．５、又は約５．０～約５．２のｐＨの範囲であってもよい。ある特定の実施形態では、緩衝系には、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物、及び／又はリン酸二水素ナトリウム二水和物が挙げられる。ある特定の実施形態では、緩衝系は、約１．３ｍｇ／ｍＬのクエン酸（例えば、１．３０５ｍｇ／ｍＬ）、約０．３ｍｇ／ｍＬのクエン酸ナトリウム（例えば、０．３０５ｍｇ／ｍＬ）、約１．５ｍｇ／ｍＬのリン酸二ナトリウム二水和物（例えば、１．５３ｍｇ／ｍＬ）、約０．９ｍｇ／ｍＬのリン酸二水素ナトリウム二水和物（例えば、０．８６ｍｇ／ｍＬ）、及び約６．２ｍｇ／ｍＬの塩化ナトリウム（例えば、６．１６５ｍｇ／ｍＬ）を含む。ある特定の実施形態では、緩衝系は、約１～約１．５ｍｇ／ｍＬのクエン酸、約０．２５～約０．５ｍｇ／ｍＬのクエン酸ナトリウム、約１．２５～約１．７５ｍｇ／ｍＬのリン酸二ナトリウム二水和物、約０．７～約１．１ｍｇ／ｍＬのリン酸二水素ナトリウム二水和物、及び約６．０～約６．４ｍｇ／ｍＬの塩化ナトリウムを含む。ある特定の実施形態では、製剤のｐＨは、水酸化ナトリウムを用いて調整される。

【０４８５】

トニシファイヤー（ｔｏｎｉｃｉｆｉｅｒ）として作用し、抗体を安定化させることができるポリオールも、製剤に含めることができる。ポリオールは、製剤の所望の等張性に関して変化し得る量で製剤に添加される。ある特定の実施形態では、水性製剤は、等張性であってもよい。添加されるポリオールの量も、ポリオールの分子量に関して変化し得る。例えは、二糖（トレハロースなど）と比較して、少量の単糖（例えば、マンニトール）が添加されてもよい。ある特定の実施形態では、等張化剤として製剤に使用され得るポリオールは、マンニトールである。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約５～約２０ｍｇ／ｍＬであってもよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約７．５～約１５ｍｇ／ｍＬであってもよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約１０～約１４ｍｇ／ｍＬであってもよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約１２ｍｇ／ｍＬであってもよい。ある特定の実施形態では、ポリオールソルビトールを製剤に含めることができる。

【０４８６】

洗剤又は界面活性剤もまた、製剤に添加してもよい。例示的な洗剤としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート２０、８０など）又はポロキサマー（例えば、ポロキサマー１８８）などの非イオン性洗剤が挙げられる。添加される洗剤の量は、製剤化された抗体の凝集を低減させ、且つ／又は製剤中の微粒子の形成を最低限に抑え、且つ／又は吸着を低減させるようなものである。ある特定の実施形態では、製剤は、ポリソルベートである界面活性剤を含み得る。ある特定の実施形態では、製剤は、洗剤のポリソルベート８０又はＴｗｅｅｎ８０を含有し得る。Ｔｗｅｅｎ８０は、ポリオキシエチレン（２０）ソ

ルビタンモノオレエートを表すために使用される用語である（Ｆｉｅｄｌｅｒ，Ｌｅｘｉｋｏｎ　ｄｅｒ　Ｈｉｆｓｓｔｏｆｆｅ，Ｅｄｉｔｉｏ　Ｃａｎｔｏｒ　Ｖｅｒｌａｇ　Ａｕｌｅｎｄｏｒｆ，４ｔｈ　ｅｄ．，１９９６を参照されたい）。ある特定の実施形態では、製剤は、約０．１ｍｇ／ｍＬ～約１０ｍｇ／ｍＬのポリソルベート８０、又は約約０．５ｍｇ／ｍＬ～約約５ｍｇ／ｍＬのポリソルベート８０を含有し得る。ある特定の実施形態では、約０．１％のポリソルベート８０が製剤に添加され得る。

【０４８７】

実施形態では、本出願に記載される多重特異性結合タンパク質は、液体製剤として製剤化される。液体製剤はゴム栓で閉じ、アルミニウムクリンプシールクロージャで密封した、ＵＳＰ／Ｐｈ　Ｅｕｒいずれかのタイプ　Ｉ　５０Ｒバイアルにおいて、１０ｍｇ／ｍＬの濃度で提供され得る。栓は、ＵＳＰ及びＰｈ　Ｅｕｒに準拠したエラストマーから作製されてもよい。ある特定の実施形態では、６０ｍＬの採取容量を可能にするために、バイアルに６１．２ｍＬのタンパク質産物溶液が充填され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、０．９％の生理食塩水で希釈され得る。

【０４８８】

ある特定の実施形態では、本出願に記載される液体製剤は、安定化レベルで糖と組み合わせた１０ｍｇ／ｍＬの濃度溶液として調製され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、水性担体中で調製され得る。ある特定の実施形態では、安定剤は、静脈内投与に望ましくない又は不適切な粘度をもたらし得る量以下で添加され得る。ある特定の実施形態では、糖は、二糖、例えば、スクロースであり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、及び保存剤のうちの１つ以上を含み得る。

【０４８９】

ある特定の実施形態では、液体製剤のｐＨは、薬学的に許容される酸及び／又は塩基の添加によって設定され得る。ある特定の実施形態では、薬学的許容される酸は、塩酸であり得る。ある特定の実施形態では、塩基は水酸化ナトリウムである。

【０４９０】

凝集に加えて、脱アミドは、発酵、採取／細胞清澄化、精製、薬物物質／薬物製品貯蔵の間及び試料分析の間に発生し得るペプチド及びタンパク質の一般的な産物のバリアントである。脱アミドは、加水分解を受け得るスクシンイミド中間体を形成するタンパク質からのNH_3の喪失である。スクシンイミド中間体は、親ペプチドの１７ダルトンの質量減少をもたらす。その後の加水分解は、１８ダルトンの質量増加をもたらす。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下での不安定性に起因して困難である。したがって、脱アミドは、典型的に１ダルトンの質量増加として検出可能である。アスパラギンの脱アミドは、アスパラギン酸又はイソアスパラギン酸のいずれかを生じる。脱アミドの速度に影響を及ぼすパラメータには、ｐＨ、温度、溶媒誘電率、イオン強度、一次配列、局所ポリペプチド立体配座及び三次構造が挙げられる。ペプチド鎖におけるＡｓｎに隣接するアミノ酸残基は、脱アミド化速度に影響を及ぼす。タンパク質配列におけるＡｓｎに続くＧｌｙ及びＳｅｒは、脱アミドに対してより高い感受性をもたらす。

【０４９１】

ある特定の実施形態では、本出願に記載される液体製剤は、タンパク質産物の脱アミノを阻止するためのｐＨ及び湿度の条件下で保存され得る。

【０４９２】

本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与に安全且つ無毒であり）、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な担体としては、注射用滅菌水（ＳＷＦＩ）、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、ｐＨ緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー液又はデキストロース溶液が挙げられる。

【０４９３】

保存剤は、任意選択で、細菌作用を低減させるために、本明細書に記載の製剤に添加されてもよい。保存剤の添加は、例えば、多数回使用（複数回投与）製剤の製造を容易にすることができる。

【０４９４】
静脈内（ＩＶ）製剤は、患者が移植後に入院しており、ＩＶ経路を介して全ての薬物を受けている場合などの特定の場合に好ましい投与経路であり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、投与前に０．９％の塩化ナトリウム溶液により希釈される。ある特定の実施形態では、注射のための希釈された薬物製品は等張であり、静脈内注入による投与に好適である。
【０４９５】
ある特定の実施形態では、塩又は緩衝成分は、１０ｍＭ～２００ｍＭの量で添加することができる。塩及び／又は緩衝液は、薬学的に許容され、「塩基形成」金属又はアミンを用いて、種々の公知の酸（無機及び有機）から誘導される。ある特定の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシネート、炭酸、クエン酸緩衝液であってもよく、これらの場合、ナトリウム、カリウム、又はアンモニウムイオンが対イオンとして機能し得る。
【０４９６】
本出願に記載される多重特異性結合タンパク質は、タンパク質及びリオプロテクタント（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）を含む凍結乾燥製剤として存在することができる。リオプロテクタントは、糖、例えば、二糖であり得る。ある特定の実施形態では、リオプロテクタントは、スクロース又はマルトースであり得る。凍結乾燥製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、増量剤、及び／又は保存剤のうちの１つ以上を含んでもよい。
【０４９７】
凍結乾燥された薬物製品の安定化に有用なスクロース又はマルトースの量は、少なくとも１：２のタンパク質対スクロース又はマルトースの重量比であり得る。ある特定の実施形態では、タンパク質対スクロース又はマルトースの重量比は、１：２～１：５であり得る。
【０４９８】
ある特定の実施形態では、凍結乾燥前の製剤のｐＨは、薬学的に許容される酸及び／又は塩基の添加によって設定され得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される酸は、塩酸であり得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される塩基は、水酸化ナトリウムである。
【０４９９】
凍結乾燥前に、本開示のタンパク質を含有する溶液のｐＨは、６～８に調製され得る。ある特定の実施形態では、凍結乾燥した薬物製品についてのｐＨ範囲は、７～８であり得る。
【０５００】
ある特定の実施形態では、塩又は緩衝成分は、１０ｍＭ～２００ｍＭの量で添加することができる。塩及び／又は緩衝液は、薬学的に許容され、「塩基形成」金属又はアミンを用いて、種々の公知の酸（無機及び有機）から誘導される。ある特定の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシネート、炭酸、クエン酸緩衝液であってもよく、これらの場合、ナトリウム、カリウム、又はアンモニウムイオンが対イオンとして機能し得る。
【０５０１】
ある特定の実施形態では、「増量剤」を添加することができる。「増量剤」は、凍結乾燥混合物に質量を付加し、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する（例えば、開放気孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの製造を容易にする）化合物である。例示的な増量剤には、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコール及びソルビトールが挙げられる。本出願に記載の多重特異性結合タンパク質の凍結乾燥製剤は、そのような増量剤を含有し得る。
【０５０２】
保存剤は、任意選択で細菌作用を低減するために、本明細書の製剤に添加されてもよい。保存剤の添加は、例えば、多数回使用（複数回投与）製剤の製造を容易にすることがで

きる。
【０５０３】
ある特定の実施形態では、凍結乾燥薬物製品は、水性担体で構成され得る。本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（例えば、ヒトへの投与に安全且つ無毒であり）、凍結乾燥後、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な希釈剤には、注射用滅菌水（ＳＷＦＩ）、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、ｐＨ緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー液又はデキストロース溶液が挙げられる。
【０５０４】
ある特定の実施形態では、凍結乾燥薬物製品は、注射用滅菌水、ＵＳＰ（ＳＷＦＩ）又は０．９％の塩化ナトリウム注射液、ＵＳＰのいずれかで再構成される。再構成の間、凍結乾燥粉末は、溶液に溶解する。
【０５０５】
ある特定の実施形態では、凍結乾燥タンパク質製品は、約４．５ｍＬの注射用水に構成され、０．９％の生理食塩水溶液（塩化ナトリウム溶液）により希釈される。
【０５０６】
本出願に記載の多重特異性結合タンパク質の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に毒性を生じず、特定の患者、組成物、及び投与様式に対して所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るように変化し得る。
【０５０７】
具体的な容量は、各患者に対して均一な用量、例えば、５０～５０００ｍｇのタンパク質であってもよい。或いは、患者の用量は、患者のおおよその体重又は表面積に合わせられ得る。適切な投薬量を決定する際の他の要因には、治療又は予防される疾患又は状態、疾患の重症度、投与経路、並びに患者の年齢、性別、及び医学的状態が挙げられ得る。治療のための適切な投薬量を決定するために必要な計算の更なる改良は、特に、本明細書に開示される投薬量情報及びアッセイを考慮して、当業者によって慣用的になされる。投薬量はまた、適切な用量応答データと併せて使用される投薬量を決定するための公知のアッセイの使用によって決定することができる。個々の患者の投薬量は、疾患の進行が監視されるにつれて調節されてもよい。患者における標的化可能な構築物又は複合体の血中レベルは、有効濃度に達するか、又は有効濃度を維持するように投薬量が調製される必要があるかどうかを調べるために測定され得る。どの標的化可能な構築物及び／又は複合体、並びにそれらの投薬量が、所与の固体に対して効果的である可能性が高いかを決定するために、薬理ゲノム学が使用され得る（Ｓｃｈｍｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ ３０８：４３－５３，２００１；Ｓｔｅｉｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ ３０８：３３－４１，２００１）。
【０５０８】
一般に、体重に基づく投薬量は、約０．０１μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、例えば、約０．０１μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約１００μｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約５０μｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約１０μｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約１μｇ／ｋｇ体重、約０．０１μｇ～約０．１μｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１００μｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１０μｇ／ｋｇ体重、約０．１μｇ～約１μｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約１００μｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約５０μｇ／ｋｇ体重、約１μｇ～約１０μｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約１００μｇ／ｋｇ体重、約１０μｇ～約５０μｇ／ｋｇ体重、約５０μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約５０μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約５０μｇ～約１０ｍｇ

／ｋｇ体重、約５０μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約５０μｇ～約１００μｇ／ｋｇ体重、約１００μｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約１００μｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約１００μｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約１００μｇ～約１ｍｇ／ｋｇ体重、約１ｍｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約１ｍｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約１ｍｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ体重、約１０ｍｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、約１０ｍｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、約５０ｍｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重である。

【０５０９】

用量は、１日に１回若しくは複数回、１週間に１回若しくは複数回、１ヶ月に１回若しくは複数回、又は１年に１回若しくは複数回、又は更には２～２０年に１回与えられ得る。当業者は、体液又は組織中の標的化可能な構築物又は複合体の測定された滞留時間及び濃度に基づいて、投薬のための反復率を容易に推定することができる。本出願に記載の多重特異性結合タンパク質の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、口内であってもよく、カテーテルを介する潅流によってでもよく、又は直接的な病巣内注射によってでもよい。これは、１日に１回若しくは複数回、１週間に１回若しくは複数回、１ヶ月に１回若しくは複数回、及び１年に１回若しくは複数回投与され得る。

【０５１０】

上記の説明は、本出願に記載の多重特異性結合タンパク質の複数の態様及び実施形態を提供する。本特許出願は、態様及び実施形態の全ての組み合わせと順列を具体的に検討する。本明細書におけるあらゆる全ての例、又は例示的な言語、例えば、「などの（ｓｕｃｈ　ａｓ）」又は「～を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、単に本出願に記載の多重特異性結合タンパク質をよりよく説明することを意図しており、そのように明示的に記載されていない限り、本開示の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書中のいかなる言語も、本出願において記載される多重特異性結合タンパク質の実践に必須なものとして、任意の特許請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【０５１１】

以下の実施例は単なる例示であり、本出願に記載の多重特異性結合タンパク質の範囲又は内容を多少なりとも限定することを意図していない。

【０５１２】

実施例１－細胞で発現されたヒトＢＡＦＦ－ＲへのＴｒｉＮＫＥＴ結合の評価

ＢＡＦＦ－Ｒ陽性ヒトＢリンパ芽球ＲＡＪＩ細胞株を用いて、細胞表面ＢＡＦＦ－ＲへのＴｒｉＮＫＥＴ結合を評価した。上記の「例示的な多重特異性結合タンパク質」サブセクションに記載されるような２－Ｆａｂ及びＦ３’フォーマットのある特定のＢＡＦＦ－Ｒ　ＴｒｉＮＫＥＴを希釈し、Ｒａｊｉ細胞と共にインキュベートした。ＴｒｉＮＫＥＴ及び親モノクローナル抗体の結合パターンを、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトＩｇＧ二次抗体を使用して検出した。次いで、細胞をフルオロフォアコンジュゲート抗ヒトＩｇＧ二次抗体と共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。平均蛍光強度（ＭＦＩ）値を、二次抗体のみの対照に対して標準化し、バックグラウンドに対する倍率（ＦＯＢ）値を得た。

【０５１３】

図１８Ａ～図１８Ｃに示されるように、ｈＣＯＨ－２（図１８Ａ）、Ｈｕ９．１－７３（図１８Ｂ）、及びイアナルマブベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性の細胞の細胞傷害性増強突然変異を含有しない）（図１８Ｃ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ結合部位を含有するＢＡＦＦ－Ｒ　ＴｒｉＮＫＥＴは、サブナノモル濃度で、且つイアナルマブにおいて使用されるＡＤＣＣ増強突然変異を含有しない対応する親対照抗体と同様であるか、又はそれよりも高い最大ＭＦＩで結合する。これらのＴｒｉＮＫＥＴ結合ＢＡＦＦ－ＲのEC_{50}値を、表１１に示す。第２のＢＡＦＦ－Ｒ陽性細胞株のＲａｍｏｓで同様な結果が得られた（データを示さず）。

【表３２】

表 11. RAJI 細胞を使用する BAFF-R 結合アッセイにおける EC_{50} 値

被験物質*	EC50 (nM)
イアナルマブ-F3'	0.361
イアナルマブ-2-Fab	0.115
イアナルマブ-mAb	0.003
Hu9.1-73-F3'	0.765
Hu9.1-73-2-Fab	1.054
Hu9.1-73-mAb	0.379
hCOH-2-F3'	0.893
hCOH-2-2-Fab	0.942
hCOH-2-mAb	0.043

*イアナルマブ構築物は、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞の細胞傷害性増強突然変異を含まない。

【０５１４】

実施例２－ヒトＮＫ細胞の細胞傷害性アッセイ

ＴｒｉＮＫＥＴの存在下での免疫エフェクター細胞によるＢＡＦＦ－Ｒ発現標的細胞の溶解を、ＤＥＬＦＩＡ細胞傷害性アッセイによって測定した。簡単に言うと、ＢＡＦＦ－Ｒを発現するヒト癌細胞株ＲＡＪＩを培養物から採取し、ＨＢＳで洗浄し、ＢＡＴＤＡ試薬（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＡＤ０１１６）での標識化のために、増殖培地中に10^6／ｍＬで再懸濁させた。標的細胞の標識化については、製造業者の指示に従った。標識化後に、細胞をＨＢＳで３回洗浄し、培養培地中に０．５～１．０×10^5／ｍＬで再懸濁させた。１００μｌのＢＡＴＤＡ標識細胞を、９６ウェルの各ウェルに添加した。ＢＡＦＦ－Ｒに対するモノクローナル抗体又はＴｒｉＮＫＥＴを培養培地中で希釈し、５０μｌの希釈したｍＡｂ又はＴｒｉＮＫＥＴを各ウェルに添加した。

【０５１５】

ＮＫ細胞を調製するために、密度勾配遠心分離を使用して、ＰＢＭＣをヒト末梢血バフィーコートから単離し、洗浄し、ＮＫ細胞単離用に調製した。ＮＫ細胞を、磁気ビーズを用いたネガティブセレクション技術を使用して単離した。単離されたＮＫ細胞の純度は、典型的には、＞９０％$CD3^-CD56^+$であった。単離されたＮＫ細胞を一晩休止させて、培養物から採取した。次いで、細胞を洗浄し、５：１のエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比のために、培養培地中10^5～２．０×10^6／ｍＬの濃度で再懸濁させた。５０μｌのＮＫ細胞を、合計２００μｌの培養容量になるように、プレートの各ウェルに添加した。プレートを、３７℃にて５％のCO_2で２～３時間インキュベートした。

【０５１６】

インキュベーション後に、プレートをインキュベーターから取り出し、２００×ｇで５分間の遠心分離によって細胞をペレット化した。２０μｌの培養上清を清浄なマイクロプレートに移し、２００μｌの室温のユウロピウム溶液（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃ１３５－１００）を各ウェルに添加した。プレートを遮光し、プレートシェーカー上で２５０ｒｐｍにて１５分間インキュベートし、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉ３Ｘ機器を使用して読み取った。

【０５１７】

ユウロピウムと蛍光キレートを形成することができる物質の自然放出を、ＮＫ細胞の不在下でインキュベートした標的細胞において測定した。そのような物質の最大放出を、１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘで溶解した標的細胞において測定した。％特異的溶解を、以下のように算出した：
％特異的溶解＝（（実験的放出－自然放出）／
（最大放出－自然放出））×１００％。

【０５１８】

図１９Ａ～図１９Ｃは、ｈＣＯＨ－２（図１９Ａ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ　Ｈｕ９．１－７３（図１９Ｂ）、及びイアナルマブベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞傷害性増強突然変異を含有しない）（図１９Ｃ）に由来するＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴの存在下での初代ＮＫ細胞によるＢＡＦＦ－Ｒ陽性ＲＡＪＩ細胞のＮＫ細胞媒介溶解を示す。親ＢＡＦＦ－Ｒ標的化モノクローナル抗体は、ＲＡＪＩ標的細胞のＮＫ細胞媒介溶解の増強をほとんど示さなかった。全てのＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴ（ｈＣＯＨ－２－Ｆ３’、ｈＣＯＨ－２－２－Ｆａｂ、Ｈｕ９．１－７３－Ｆ３’、Ｈｕ９．１－７３－２－Ｆａｂ、イアナルマブ－Ｆ３’、及びイアナルマブ－２－Ｆａｂ）は、それぞれのＢＡＦＦ－Ｒ標的化モノクローナル抗体と比較して、標的細胞の優れた溶解を示した。ＥＣ$_{50}$値を、表１２に示す。

【表３３】

表 12. 初代 NK 媒体細胞傷害性アッセイにおいて、親 mAb と比較した BAFF-R TriNKET の効力。

被験物質*	EC50 (nM)	最大溶解(%)
イアナルマブ-F3’	0.935	64.83
イアナルマブ-2-Fab	0.244	54.30
イアナルマブ-mAb	N/A	N/A
Hu9.1-73-F3’	0.417	54.16
Hu9.1-73-2-Fab	0.559	53.18
Hu9.1-73-mAb	N/A	N/A
hCOH-2-F3’	0.725	62.59
hCOH-2-2-Fab	1.042	73.53
hCOH-2-mAb	N/A	N/A

*イアナルマブ構築物は、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞の細胞傷害性増強突然変異を含まない。

【０５１９】

細胞傷害性所見を確認するために、ＮＫ細胞株のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶを、ＣＤ１６ａＶ及びＮＫＧ２Ｄを安定して発現するように操作し、上述したようにアッセイを行った。ＴｒｉＮＫＥＴ及びｈＣＯＨ－２（図２０Ａ）、Ｈｕ９．１－７３（図２０Ｂ）及びイアナルマブベースの抗原結合部位（３つのバージョン、Ｆ３’、２－Ｆａｂ、及びイアナルマブ－ｍＡｂは、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞傷害性増強突然変異を含有しない）（図２０Ｃ）に由来する親ｍＡｂについて測定した。ＥＣ$_{50}$値及び最大溶解値を、４パラメータロジスティック非線形回帰曲線フィッティングモデルを使用するＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｚｍソフトウェアによって、細胞溶解曲線から導出し

た（図１３）。試験した全てのＢＡＦＦ－Ｒ　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＫＨＹＧ－１　ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、サブナノモルのＥＣ５０及び高効率の最大溶解を示した。第２のＢＡＦＦ－Ｒ陽性細胞株のＲａｍｏｓで同様な結果が得られた（データを示さず）。

【表３４】

表 13. 初代 KHYG-1 CD16aV 媒介細胞傷害性アッセイにおける親 mAb と比較した BAFF-R TriNKET の効力。

被験物質*	EC50 (nM)	最大溶解(%)
イアナルマブ-F3'	0.515	68.35
イアナルマブ-2-Fab	0.183	74.02
イアナルマブ-mAb	N/A	14.48
Hu9.1-73-F3'	0.246	89.11
Hu9.1-73-2-Fab	0.402	92.94
Hu9.1-73-mAb	N/A	19.84
hCOH-2-F3'	0.448	97.52
hCOH-2-2-Fab	0.539	93.76
hCOH-2-mAb	N/A	11.56

*イアナルマブ構築物は、市販のイアナルマブ抗体中に存在する抗体依存性細胞の細胞傷害性増強突然変異を含まない。

【０５２０】

実施例３－ＢＡＦＦ－Ｒ結合ｍＡｂの生成及び特性化

組換えタンパク質免疫化法

マウスの４つの異なる系統（Ｈ２Ｌ２、ＮＺＢＷ、ＢＡＬＢ－Ｃ、及びＳＪＬ／Ｊ）を、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓ融合タンパク質で免疫化することによって、ＢＡＦＦ－Ｒ特異的抗体を生成した。抗血清価に基づいて、４つの異なる系統にわたる合計で７匹のマウスをハイブリドーマ融合のために選択した。各免疫化アームからのマウスのサブセットからの脾臓細胞を免疫ライブラリー生成のために確保したが、Ｈ２Ｌ２マウス由来の脾臓細胞のみを酵母ディスプレイｍＡｂの発見のために使用した。

【０５２１】

５つのマウス融合物（２匹のマウス由来の脾臓細胞をＨ２Ｌ２融合のためにプールし、２匹のマウス由来の脾臓細胞をＳＪＬ／Ｊ融合のためにプールした）から、ハイブリドーマ融合物当たり１６個の９６ウェルプレートを特異性ＥＬＩＳＡによって分析し、ここではヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓへの結合及び無関係なｈＦｃ－Ｈｉｓタンパク質への結合が比較された。３３個のＢＡＦＦ－Ｒ陽性且つ特異的ハイブリドーマからの上清を、更なる分析のために選択した。上清を、ＢＡＦＦ－Ｒ＋アイソジェニックＣＨＯ細胞への結合について試験し、１６個の陽性のハイブリドーマを更にサブクローニングした。サブクローンからの上清を上述した特異性ＥＬＩＳＡによって分析し、２０個のＢＡＦＦ－Ｒ陽性且つ特異的サブクローンを、ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合について試験した。９個のサブクローンｍＡｂは、ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への強力な結合を実証し、これらを配列決定した。６個のユニークな配列を得て、対応するｍＡｂを、細胞ベースのアッセイにおいて、ＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用をブロックするそれらの能力について更に分析した。

【０５２２】
ＢＡＦＦ－Ｒ＋ＣＨＯ細胞へのビオチン化ＢＡＦＦの結合を、６個のＢＡＦＦ－Ｒ特異的ｍＡｂ又はアイソタイプ対照ｍＡｂの不在下又は存在下で試験した。抗体の存在下での平均蛍光強度（ＭＦＩ）の低減は、ｍＡｂがＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦ結合の関与を阻害し、したがって、遮断抗体と指定されることを示唆した。試験した全てのクローンは、ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞へのＢＡＦＦ結合を阻害せず、したがって、６個の全ては、非遮断と名付けた（図２１）。
【０５２３】
ＤＮＡ免疫化法
ＳＷＲ／Ｊマウスの２つの群のＤＮＡ免疫化を、それぞれ実施した。１つの群は、完全長ヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡ構築物で免疫化し、他の群は、完全長ヒトＢＡＦＦ－ＲとヒトＢＡＦＦ－Ｒ細胞外ドメインｃＤＮＡ構築物との混合物で免疫化した。抗血清価に基づいて、マウスをプールし、その後シングルＢ細胞ソーティング用に選択し、別のプールをハイブリドーマ融合用に使用した。
【０５２４】
シングルＢ細胞ソーティングの取り組みは、４４個のヒト及びカニクイザル交差反応性クローンをもたらした。これらのクローンを配列決定し、２９３細胞中で一過性発現させ、精製されたｍＡｂの特異性を、ｈＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$、カニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$アイソジェニックＣＨＯ細胞への結合及び親細胞株への結合が比較されるフローサイトメトリーによって分析した。８個のバインダーを精製し、ＢＡＦＦ－Ｒに結合し、且つＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用をブロックするためのそれらの能力について更に分析した。８つのクローン全てを非遮断性と決定し、ｈＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$癌細胞に対する弱い親和性を実証した。
【０５２５】
伝統的なハイブリドーマアプローチによって得られたクローンの特異性を、フローサイトメトリーによって分析した。以下の評価：ａ）完全長ヒトＢＡＦＦ－Ｒ又はヒトＢＡＦＦ－Ｒ細胞外ドメインのいずれかを発現する細胞への結合を、非トランスフェクト親細胞への結合と比較し；ｂ）ｈＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$アイソジェニック細胞への結合を、親細胞への結合と比較し；ｃ）ｈＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$癌細胞への結合を実施した。２５個の陽性のハイブリドーマ融合物を同定し、結合強度に基づいて１４個のハイブリドーマ融合物を配列決定した。５つのユニークな配列を得て、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞に結合し、且つＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用をブロックするためのそれらの能力について分析した。５つ全てのクローンは、非遮断クローンと決定されたが（図２２）、５つのクローンのうち４つ（クローン３Ａ１、１Ｂ３－Ａ７、７Ｇ４及び１０Ｈ７－Ｃ５）は、ｈＢＡＦＦ－Ｒに対する良好な親和性を実証した。
【０５２６】
酵母ライブラリーから発見されたＢＡＦＦ－Ｒ特異的ｓｃＦｖ
酵母ディスプレイを使用して、上述した組換えヒトｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓタンパク質によって免疫化されたヒト化Ｈ２Ｌ２マウスから得られた脾臓細胞からｓｃＦｖライブラリーを構築した。３ラウンドの選択を、ビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓを用いて５ｎＭで行った。個々の酵母コロニーを拾い上げ、配列決定し、配列解析した。配列収束は、選択プロセスがバインダーの濃縮が成功裏に行われ、完全であることを示した。ユニークな配列を、更なる特性化のために選択した。３つのＢＡＦＦ－Ｒ特異的ｓｃＦｖを、１つのライブラリーから発見した（表１４）。しかしながら、これらの配列は、互いに非常に似ていたため、更なる研究のために選択されたのは、配列１１２９＿Ａ０１（ＡＢ０３６９ｓｃＦｖとも称される）だけであった。

【表３５】

表 14. 酵母ライブラリーから発見された BAFF-R バインダーの CDR 配列

	1129_A01 (AB0369 scFv)	1203_A01	1203_A02
CDRH1	GFTFSSY (配列番号 214)	GFTFSSY (配列番号 214)	GFTFSTY (配列番号 220)
CDRH2	WYDGSN (配列番号 215)	WYDGSN (配列番号 215)	WYDGSN (配列番号 215)
CDRH3	RFTMLRGLIIEDYGMDV (配列番号 216)	RFTMLRGVFIEDYGMDV (配列番号 219)	RNTMVRGVIIEDYGMDV (配列番号 221)
CDRL1	RASQSISSYLN (配列番号 217)	RASQSVSSNLA (配列番号 59)	RASQSISSYLN (配列番号 217)
CDRL2	AASSLQS (配列番号 77)	GASTRAT (配列番号 60)	AASSLQS (配列番号 77)
CDRL3	QQSYSTPLT (配列番号 218)	QQSYSTPLT (配列番号 218)	QQSYSSPLT (配列番号 222)

【０５２７】

フローサイトメトリーを使用して、ＡＢ０３６９ｓｃＦｖのｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓ、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ＧＳＴ－Ｈｉｓ、及び酵母上で表示されている間、ｈＦｃタグ若しくはＧＡＴタグを有する陰性対照タンパク質への結合の特異性を評価した。ＡＢ０３６９ｓｃＦｖは、ｈＢＡＦＦ－Ｒに対する中程度から弱い親和性を実証したが、それは陰性対照に対する結合を示さず、したがって、ＢＡＦＦ－Ｒへの高特異性を示唆している（図２３）。

【０５２８】

ＡＢ０３６９をもたらすために、１１２９＿Ａ０１（ＡＢ０３６９　ｓｃＦｖ）を、ｓｃＦｖ、及び２つの非ＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含む多重特異性結合タンパク質に変換した。ＡＢ０３６９を、ヒト（ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ＣＨＯ）及びカニクイザル（ｃＢＡＦＦ－Ｒ－ＣＨＯ）ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞に結合するその能力（図２４Ａ、図２４Ｂ）、多特異性試薬（ＰＳＲ）アッセイによる非特異的相互作用の欠如（図２５Ａ～図２５Ｇ）、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$Ｒａｍｏｓ癌細胞を溶解する能力（図２６及び表１５）並びにＢＡＦＦ－ＢＡＦＦ－Ｒ相互作用をブロックする能力（図２７）について更に分析した。ＡＢ０３６９は、アイソジェニックＣＨＯ細胞の表面上でヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒの両方に結合し、ＢＡＦＦ－Ｒの結合は、約１０ｎＭのＥＣ$_{50}$を伴い、更なる開発のための良好な選択となった。

【表３６】

表 15. KHYG-1-CD16aV 細胞傷害性アッセイにおける AB0369 の効力。

分子	EC_{50} (nM)	最大溶解 (%)
AB0369-001	0.6	73

【０５２９】

ＡＢ０３６９のＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用をブロックする能力を、細胞ベースの

ブロッキングアッセイにおいて試験した。簡単に言うと、ヒトＢＡＦＦ－Ｒを発現するＣＨＯ細胞を採取し、冷ＦＡＣＳ緩衝液中で洗浄し、ウェル当たり１００，０００個細胞の密度で播種した。被験物質をＦＡＣＳ緩衝液中で希釈し、５０μＬの希釈した多重特異性結合タンパク質又はｍＡｂを細胞に添加し、氷上で６０分間インキュベートし、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄した。１２ｎＭのＢＡＦＦ－ビオチンをＦＡＣＳ緩衝液中に希釈し、ウェル当たり１００μＬを添加し、氷上で６０分間インキュベートし、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄した。細胞を、１００μＬのＦＡＣＳ中で希釈した１：２００のストレプトアビジン－ＰＥとインキュベートし、氷上で３０分間インキュベートした後、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄した。次いで、細胞を１００μＬのＰＢＳ中の生／死判定染料の１：１，０００希釈物中で１５分間インキュベートし、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、固定化した。インキュベーション後に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリーによる分析のためにＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁させた。各試料及び二次のみの対照のメジアン蛍光強度（ＭＦＩ）を計算した。最大ＭＦＩを、ＢＡＦＦ－ビオチン単独として計算し、最小ＭＦＩをストレプトアビジン－フィリコエリトリン単独として計算した。データを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して、４パラメータ線形回帰曲線にフィットさせた。

【０５３０】

これらの研究は、ＡＢ０３６９がＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用を部分的にブロックすることができることを明らかにした。しかしながら、このブロッキングは、親抗体とは異なり、抗体依存性細胞傷害性増強突然変異を含有しないイアナルマブベースのベンチマーク対照よりも著しく効力が劣っており、恐らくはＡＢ０３６９の親和性が低いためと思われる（図２７及び表１６）。ＡＢ０３６９　ｓｃＦｖは、上記の全ての創薬研究から同定された唯一の遮断抗体であったため、ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＨ１／ＣＤＲＨ２の親和性成熟、並びにタンパク質産生及び安定性を促進するための更なるアミノ酸変化による更なる開発が行われた。

【表３７】

表 16. AB0369 及びベンチマーク mAb の細胞 BAFF-R への BAFF 結合のブロッキングの概要。

分子	IC_{50} (nM)	最小(MFI)
AB0369-001	488	38,180
イアナルマブベースのツール-mAb	0.5	224
ヒト IgG1k	N/A	68,050

【０５３１】

ＡＢ０３６９の親和性成熟

ＣＤＲＨ３に焦点を合わせたランダム化親和性成熟

上述したように、ＡＢ０３６９は、ＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞に対する特異的結合を実証した。改善された結合親和性を有するバリアントを探索するために、ＡＢ０３６９のＣＤＲＨ３残基（ＲＦＴＭＬＲＧＬＩＩＥＤＹＧＭＤＶ（配列番号２１６））を突然変異させることによって、酵母ディスプレイ親和性成熟ライブラリーを作成した。ｈＢＡＦＦ－Ｒに対するより高い親和性を有するｓｃＦｖを富化させるために、２ラウンドの選択をビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓを用いて１ｎＭで行った。（図２８Ａ～図２８Ｄ）。親クローンＡＢ０３６９と代表的な個々のライブラリークローンとの間の親和性を比較した。イアナルマブベースのｓｃＦｖをベンチマーク対照として使用する、３ラウンドのＦＡＣＳソーティングの結果、親クローンと比較して、１つ又は２つのアミノ酸の違い（太字）を含有する９個のクローンをもたらし、

【化３１】

(RFTMLRGWYIEDYGMDV (配列番号224) ; RFTMLRGQYIEDYGMDV (配列番号223);
RFTMLRGWIIEDYGMDV (配列番号225))

親クローン及び親由来のｓｃＦｖよりもｈＢＡＦＦ－Ｒに対する高い結合親和性を示した（図２９Ａ～図２９Ｄ）。

【０５３２】

最も高いｈＢＡＦＦ－Ｒ結合親和性を有するｓｃＦｖを、ｓｃＦｖ及び２つの非ＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含む多重特異性結合タンパク質に変換し、Ｅｘｐｉ２９３細胞中で発現させ、ＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞に結合するそれらの能力（図１０Ａ）及びＢＡＦＦ－Ｒ発現Ｒａｍｏｓ癌細胞を溶解するそれらの能力（図３０Ｂ、図３０Ｃ）について更に分析した。全ての多重特異性結合タンパク質は、多特異性アッセイにおいて負に採点され、改善された結合親和性がＢＡＦＦ－Ｒ特異的であることを示唆している（図３１Ａ～図３１Ｅ）。更なる研究は、ＢＡＦＦ－Ｒの結合における３倍を超える改善を実証し、これはＥＣ５０で測定された効力の６倍～１０倍の改善につながった（表１７）。最大溶解は変化しないままであり、ＢＡＦＦ－Ｒ結合親和性における改善は、効力におけるこの改良の重要な推進力であったことを示唆している。

【表３８】

表 17. 親 AB0369 と比較した HCDR3 親和性成熟バリアントに基づく多重特異性結合タンパク質によって立証された細胞結合及び細胞溶解の概要。

分子	BAFF-R-CHO 細胞結合 EC_{50} (Nm)	Ramos 細胞の KHYG-A-CD16Av 媒介細胞溶解 EC_{50} (Nm)
AB0605-001	5.72	0.15
AB0606-001	4.50	0.06
AB0622-001	3.45	0.09
AB0369-001	>10	0.64

【０５３３】

ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２に焦点を合わせた組み合わせ親和性成熟

ＣＤＲＨ３に焦点を当てた親和性成熟研究からの結果は、親和性における改善を実証したが、更なる改善が非常に望ましい。したがって、成熟されたＣＤＲＨ３骨格を使用して、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２配列を親和性成熟のために選択した（ＣＤＲＨ１：ＧＦＴＦＳＳＹ（配列番号２１４）及びＣＤＲＨ２：ＷＹＤＧＳＮ（配列番号２１５））。目的は、親クローン（ＡＢ０３６９　ｓｃＦｖ）又は上述したＣＤＲＨ３最適化バリアントを超える改善された親和性を有するバインダーを操作し、選択することであった。これにより、最適化ＣＤＲＨ３を保持しながら、ランダム化ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２を有するライブラリーを作成した。２ラウンドのＦＡＣＳを実施し、高親和性バインダーを富化させた（図３２Ａ～図３２Ｃ）。

【０５３４】

ＦＡＣＳ後に、２４個のクローンを同定した。最適化ＣＤＲＨ３骨格上のＣＤＲＨ１において変化を有するいくつかのクローン（ＲＦＴＭＬＲＧＷＹＩＥＤＹＧＭＤＶ（配列番号２２４）；ＲＦＴＭＬＲＧＱＹＩＥＤＹＧＭＤＶ（配列番号２２３））；ＲＦＴＭＬＲＧＷＩＩＥＤＹＧＭＤＶ（配列番号２２５））が、親ＡＢ０３６９ｓｃＦｖ（１１２９＿Ａ０１）と比較して、ｈＢＡＦＦ－Ｒ親和性における著しい改善を示すか（図３３Ａ～図３３Ｄ）、又はイアナルマブベースのｓｃＦｖベンチマーク対照（ｓｃＦｖは、イアナル

マブのＶＨ及びＶＬ配列に基づくＶＨ及びＶＬを含むが、親抗体において使用されるＡＤＣＣ増強突然変異を含有しない）と比較して、ｈＢＡＦＦ－Ｒ親和性における著しい改善を示すことが観察された（図３３Ｅ）。

【０５３５】

最高のｈＢＡＦＦ－Ｒ結合親和性を有するｓｃＦｖを、ｓｃＦｖ及び２つのＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含む多重特異性結合タンパク質に変換し、Ｅｘｐｉ２９３細胞中で発現させ、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞に結合するそれらの能力（図３４Ａ）、カニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞に結合するそれらの能力（図３４Ｂ）、及びＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用を阻害するそれらの能力（図３４Ｃ及び表１８）について更に分析した。試験された多重特異性結合タンパク質は、これらの基準の３つ全てにおいて改善を示し、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$ＢＪＡＢ細胞の効率的な殺傷を実証した（図３５、表１９）。

【表３９】

表 18. CDRH1 及び CDRH2 親和性成熟に基づく多重特異性結合タンパク質によって実証された BAFF-R 細胞結合及び BAFF-R-BAFF ブロッキングの概要

分子	ヒト BAFF-R 細胞結合 EC_{50} (nM)	カニクイザル BAFF-R 細胞結合 EC_{50} (nM)	BAFF-BAFF-R ブロッキング IC_{50} (nM)
AB0682-001	2.4	3.1	12.6
AB0681-001	5.1	5.6	-
AB0679-001	2.3	2.6	9.4
AB0369-001	>10	>15	-
ツール-F3'	4.3	2.9	-
ツール-mAb	-	-	0.38

【表４０】

表 19. KHYG-1-CD16V 細胞溶解アッセイにおける CDRH1 及び CDRH2 親和性成熟に基づく代表的な多重特異性結合タンパク質の効力。

分子	EC50 (nM)	最大溶解(%)
AB0679-001	0.11	83
AB0682-001	0.09	79
ツール-F3'	0.61	69

【０５３６】

潜在的配列ライアビリティの修復

親和性成熟されたクローンは、タンパク質発現、安定性、又は免疫原性に悪影響を及ぼし得るアミノ酸をそれらのＣＤＲ中に含有したため、追加のライブラリーを構築して、それらのアミノ酸を含まないクローンを選択した。３ラウンドの選択を、高親和性の富化をもたらす１ｎＭのビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓタンパク質で実施した（図３６Ａ～図３６Ｄ）。全部で２３個のバインダーを同定し、そのうち１２個が望ましくないアミノ酸を含まないと予測された（「ライアビリティ修正」）。

【０５３７】

これらのライブラリーからの好ましいクローンは、ＡＢ０８９８（上述したＡＢ０６８２のライアビリティ修正バージョン）、ＡＢ０８９９、及びＡＢ０９００を含み、これらは成功裏に同定され、酵母上で表示されながら、ｈＢＡＦＦ－Ｒへのそれらの結合について試験した。全てのクローンは、親のＡＢ０３６９ｓｃＦｖよりもｈＢＡＦＦ－Ｒに対する高い親和性を示した（図３７Ａ～図３７Ｆ）。

【０５３８】

ライアビリティ修正多重特異性結合タンパク質の特性化

ライアビリティ修正クローンのうちの３つを、ｓｃＦｖ及び２つの非ＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含む多重特異性結合タンパク質に変換し、Ｅｘｐｉ２９３細胞中で発現させ、２段階精製プロセスによって精製し、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、示唆操作熱量測定（ＤＳＣ）、ＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞への結合、及びＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、ＢＪＡＢ細胞を溶解する能力によって特性化した。これらのクローンの特性化を表２０に要約し、ライアビリティ修正が成功したことを実証している。細胞結合に対する悪影響は観察されず、３つのクローン全てが、ＢＡＦＦ－Ｒ発現腫瘍細胞の強力な殺傷を実証した（図３８）。しかしながら、分子の熱安定性は、図３９Ａ～図３９Ｃに示されるように、T_{m1}＞６５℃であった。

【表４１】

表 20. 多重特異性結合タンパク質を発現する配列ライアビリティ修正 BAFF-R バインダーの特性化の概要。

被験物質	SEC, 単量体(%)	DSC, T_{m1} (°C)	hBAFF-R^+ 細胞結合 EC_{50} (nM)	BJAB 細胞の KHYG-A-CD16aV 媒介細胞溶解, EC_{50} (nM)
AB0898	86.9	61.23	4.3	0.08
AB0899	96.5	58.79	4.3	0.06
AB0900	90.0	59.41	11.7	0.11

【０５３９】

上述したように、ＣＤＲにおける潜在的な配列ライアビリティ残基の特定のアミノ酸による置換は、結合親和性に対して最小限の影響を有していたが、ＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞の結合及び熱安定性データは、更なる改善が望ましいことを示唆していた。したがって、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２配列（ＣＤＲＨ１：ＧＦＴＦＳＳＹ（配列番号２１４）及びＣＤＲＨ２：ＷＹＤＧＳＮ（配列番号２１５））をライアビリティ修正ＣＤＲＨ３骨格中に親和性成熟させ、オフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）圧力を適用して、高親和性クローンを選択した。簡単に言うと、クローンをビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓと１００ｐＭ濃度でプレインキュベートし、次いで、１μＭの非ビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓで２時間チャレンジした。ビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓに結合したままの抗ＢＡＦＦ－Ｒ　ｓｃＦｖを表示する酵母を選別し、このプロセスを３回繰り返して、より遅いオフレートを有する高親和性バインダーを富化させた。図４０に示すように、オフレート圧力チャレンジ後であっても、クローンはビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓに結合したままであり、一方、イアナルマブベースのｓｃＦｖベンチマーク対照は、これらの条件下でビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓへの結合に失敗し、よりゆっくりとした解離速度を示唆している。

【０５４０】

個々のクローンの分析は、ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓに対する高親和性を実証し（図４１）、重要なことに、クローンはビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓに結合したままであった。とりわけ、イアナルマブベースのベンチマークｓｃＦｖは、チャレンジ後にビオチン化ｈＢＡＦＦ－Ｒ－ｈＦｃ－Ｈｉｓへの結合の失敗を示した（図４１Ａ及び図４１Ｂ）。これらのクローンのいくつかは、それらが追加の望ましくないアミノ酸又は特性を含有したために、更なる検討から除外した。上記研究から選択されたクローンの配列を、表２１に示す。

【表４２】

表 21. 選択されたクローンの CDR 配列。

配列	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB1080scFv	GFTFSSY (配列番号 214)	WYDASN (配列番号 233)	RFTHLRGWYIEDYGLDV (配列番号 237)
AB1081scFv	GFAFSSY (配列番号 238)	WYDESN (配列番号 239)	RFTNLRGWIIEDYGLDV (配列番号 240)
AB1084scFv	GFTFSMY (配列番号 241)	WYDASN (配列番号 233)	RFTRLRGWYIEDYGLDV (配列番号 242)
AB1085scFv	GFTFGSY (配列番号 243)	WYDGSN (配列番号 215)	RFTILRGQYIEDYGMDV (配列番号 244)

【０５４１】

潜在的な配列ライアビリティは太字の下線が付けられ、クローン間の多様性を示す残基は、太字で表示される。

【０５４２】

上述したオフレートチャレンジ研究から選択されたクローンを、それぞれのバインダーのｓｃＦｖ及び２つの非ＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含む多重特異性結合タンパク質として産生し、Ｅｘｐｉ２９３細胞中で発現させ、ｈＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ発現細胞への結合、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、ＢＡＦＦ－Ｒ発現癌細胞を溶解する能力、ＢＡＦＦ－ＢＡＦＦ－Ｒ相互作用をブロックする能力、熱安定性（示差走査蛍光定量法、ＤＳＦ）並びに疎水性（ＨＩＣ）によって特性化した（結果を、表２２に要約する）。ＡＢ１０８０、ＡＢ１０８１、及びＡＢ１０８５のＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞に対する結合親和性は、親クローンと比較して改善された（表２０と比較される図４２Ａ及び図４２Ｂ）。更に、カニクイザルＢＡＦＦ－Ｒに対する結合親和性は、ｈＢＡＦＦ－Ｒに対する結合親和性と同様であった（図４２Ａ及び図４２Ｂ）。多特異性の欠如を、ＰＳＲアッセイによって確認した（図４３Ａ～図４３Ｉ）。ＡＢ１０８４は、ＨＩＣでのより長い保持時間及びその後のより高い凝集傾向のために、更なる研究から除外した。改善された多重特異性結合タンパク質は、イアナルマブ配列に基づく多重特異性結合タンパク質よりもはるかに高い効力を実証した（図４４Ａ及び図４４Ｂ）。加えて、効力の１０倍を超える改善が、元のＡＢ０３６９多重特異性結合タンパク質と比較して観察された。重要なことに、ＢＡＦＦ－ＢＡＦＦ－Ｒ結合をブロックする能力が、親ＡＢ０３６９多重特異性結合タンパク質と比較して、大幅に改善されたことである（図４５）。

【表４３】

表 22. 選択された多重特異性結合タンパク質の特性化の概要。

被験物質	hBAFF-R^{+}細胞結合 EC_{50} (nM)	cBAFF_R^{+} 細胞結合 EC_{50} (nM)	細胞溶解, EC_{50} (nM)	HIC,保持時間(分)	DSF, Tm1 (°C)
AB1080-002	1.97	1.36	0.03	11.40	66.3
AB1081-002	>8	>14	0.05	11.45	65.9
AB1084-001	-	-	0.06	11.79	67.5
AB1085-001	5.78	4.34	0.08	9.55	68.1

【０５４３】

これらの多重特異性結合タンパク質は、対照のアダリムマブ（ヒュミラ）及びペムブロリズマブ（キイトルーダ）と比較して、許容される熱安定性についての基準を満たした（図４６）。ＨＩＣクロマトグラムは、ＡＢ１０８０及びＡＢ１０８１が、それぞれ１１．４分及び１１．５分の保持時間を有することを明らかにした。ＡＢ１０８５は９．５分の

保持時間を実証し、これは承認された後期段階の治療用抗体の下端にあり、非常に好ましい疎水性挙動を示唆している（図４６Ａ～図４６Ｄ）。

【０５４４】

ＡＢ１０８０及びＡＢ１０８１は、ＢＡＦＦ－Ｒへの改善された結合を示し、ＣＤＲ配列におけるいかなる配列ライアビリティも含有しなかったが、それらの疎水性は、ベンチマークされた治療用抗体のパネルと比較して高かった。ＡＢ１０８５は、所望の疎水性及び親和性を実証したが、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３配列において、潜在的配列ライアビリティを含有した（図４７）。ＡＢ１０８０、ＡＢ１０８１、及びＡＢ１０８５の配列を比較し、ＡＢ１０８０配列を分析し、ＷからＱへの疎水性低下突然変異を生成するように更に修正した（

【化３２】

RFTMLRGWYIEDYGMDV (配列番号224)

から

【化３３】

RFTMLRGQYIEDYGMDV (配列番号223)

へ）。得られたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２多重特異性結合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒに対する同じ高親和性（表２３、図４９Ａ及び図４９Ｂ）、強力なＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ結合の遮断（図５０）を維持し、且つ親ＡＢ１０８０に特徴的なライアビリティフリー配列を含みながら、良好に動作する生物製剤（図４８）の範囲内に入る好ましい低疎水性を実証した（表２４）。

【表４４】

表 23. 多重特異性結合タンパク質 AB1424/AB1612 系統による BAFF-R 結合及び BAFF-R-BAFF ブロッキングの概要。

分子	カニクイザル BAFF-R 細胞結合 EC_{50} (nM)	ヒト BAFF-R 細胞結合 EC_{50} (Nm)	リガンドブロッキング (Nm)
AB0369-001	7.11	6.80	>1000
AB1080-003	2.36	2.71	5.72
AB1085-001	3.29	4.48	12.67
AB1612-003	1.85	3.09	6.76
ヒト IgG1k	N/A	N/A	N/A

【表４５】

表 24. AB1424/AB1612 及びその祖先における BAFF-R 結合 CDR の比較

TriNKET	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB0369	GFTFSSY (配列番号 214)	WYD**G**SN (配列番号 215)	RFT**M**LRGLIIEDYG**M**DV (配列番号 216)
AB1080	GFTFSSY (配列番号 214)	WYD**A**SN (配列番号 233)	RFT**H**LRG**W**YIEDYG**L**DV (配列番号 237)
AB1085	GFTF**G**SY (配列番号 243)	WYD**G**SN (配列番号 215)	RFT**H**LRG**Q**YIEDYG**M**DV (配列番号 244)
AB1424/AB1612	GFTFSSY (配列番号 214)	WYD**A**SN (配列番号 233)	RFT**H**LRG**Q**YIEDYG**L**DV (配列番号 248)

【０５４５】

結論として、組換えタンパク質及びＤＮＡ免疫化を利用する２つの抗体の創薬キャンペーンが完了した。第１のキャンペーンは、４つの中程度の親和性の非遮断抗体を同定した。第２のキャンペーンから創薬された単一のバインダーのＡＢ０３６９ｓｃＦｖは、ＢＡＦＦ－Ｒ－ＢＡＦＦ相互作用をブロックする能力を表示した。親和性成熟、ライアビリティ修正、及び合理的配列設計の複数のラウンドによるＡＢ０３９６ｓｃＦｖの広範な開発によってバインダーＡＢ１６１２／ＡＢ１４２４をもたらし、これは治療用候補物質の望ましい特性を実証した。

【０５４６】

実施例４－ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴフォーマットの分子分析

この実施例では、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの分子フォーマット、設計、構造、及び特性を分析した。これらの研究は、ａ）分子の基礎的な生化学的及び生物物理学的特性を提供し、ｂ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ及びＣＤ１６ａ（Ｖ及びＦ対立遺伝子バリアント）に対する親和性を実証し、ｃ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの細胞表面で発現されたＢＡＦＦ－Ｒへの結合を確認し、ｄ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの選択性を実証し、並びにｅ）ＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞の殺傷におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの効力を決定した。

【０５４７】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、３つのポリペプチド（抗－ＢＡＦＦ－Ｒ　ｓｃＦｖ－ＣＨ２－ＣＨ３「Ｓ鎖」、配列番号２７０；抗ＮＫＧ２Ｄ　ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３、“Ｈ鎖”、配列番号１９４；及び抗ＮＫＧ２Ｄ　ＶＬ－ＣＬ、“Ｌ鎖”配列番号１９５）を含む上述したＦ３’フォーマットのＴｒｉＮＫＥＴである。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴＲＩＮＫＥＴの一次配列を、Ｎ結合グリコシル化部位、Ｃｙｓ残基、潜在的脱アミドの部位（Ａｓｎ）、酸化（Ｍｅｔ及びＴｒｐ）、異性化（Ａｓｐ）、及び化学的に不安定な結合（ＤＰ）などのＣＤＲにおける推定上の配列ライアビリティの存在について評価した。これらの修飾は、産物有効性、安全性、安定性、一貫性、又は製造可能性に影響を及ぼし得る。

【０５４８】

ＣＤＲにおける推定上の配列ライアビリティの分析を、表２５に提供する。ＢＡＦＦ－Ｒ結合Ｓ鎖は、いかなる予想される配列ライアビリティも含有しない。ＮＫＧ２Ｄ結合Ｌ鎖は、いかなる予想される配列ライアビリティも含有しない。ＮＫＧ２Ｄ結合Ｈ鎖は、ＣＤＲＨ３において、切断しやすい可能性がある潜在的配列ライアビリティを含有する。検証的試験は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが、分子が熱的、化学的、及び機械的ストレスに供される加速された安定性又は強制分解の条件下でいかなる断片化も示さないことを実証し、この配列が安定であることを示唆している。

【表４６】

表 25. AB1424/AB1612 F3' TriNKET CDR 配列。

鎖	可変領域	フレームワーク	CDR1	CDR2	CDR3
S	VH	VH3-30	GFTFSSY (配列番号 214)	WYDASN (配列番号 233)	RFTILRGQYIEDYGLDV (配列番号 248)
S	VL	VK1-39	RASQSISSYLN (配列番号 217)	AASSLQS (配列番号 77)	QQSYSIPLT (配列番号 249)
H	VH	VH3-21	GFTFSSY (配列番号 214)	SSSSSY (配列番号 290)	GAPIGAAAGWFDP (配列番号 97)
L	VL	VK1-12	RASQGISSWLA (配列番号 86)	AASSLQS (配列番号 77)	QQGVSFPRT (配列番号 87)

【０５４９】

分子モデル化

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの抗ＢＡＦＦ－Ｒ及び抗ＮＫＧ２Ｄ結合アームを、ＳａｂＰｒｅｄウェブサイトで利用可能な治療用抗体プロファイラー（ＴＡＰ）を使用して、第Ｉ相後の３７７個の生物学的製剤分子と比較した。ＴＡＰは、ＡｂｏｄｙＢｕｉｌｄｅｒを使用して、ＰＥＡＲＳによる側鎖を有するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴについてのモデルを生成した。ＣＤＲＨ３を、その多様性のために、ＭＯＤＥＬＬＥＲによって構築した。

【０５５０】

５つの異なるパラメータを評価した：

総ＣＤＲ長

ＣＤＲ近辺に対する表面疎水性のパッチ（ＰＳＨ）

ＣＤＲ近辺に対する正電荷のパッチ（ＰＰＣ）

ＣＤＲ近辺に対する負電荷のパッチ（ＰＮＣ）

構造的Ｆｖ電荷対称性パラメータ（ｓＦｖＣＳＰ）

【０５５１】

次いで、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのこれらのパラメータを、治療用抗体のプロファイル分布と比較し、開発可能性及び下流の課題を引き起こし得る潜在的な問題を予測した。

【０５５２】

図５１Ａ～図５１Ｃは、３つの異なる配向（上部パネル）及び同じ配向の対応する表面電荷分布（下部パネル）におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの可変フラグメント（Ｆｖ）のモデルである。図５２Ａ～図５２Ｅは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの総ＣＤＲ長及び表面特徴分析を示す。分析は、治療用抗体プロファイル（ＴＡＰ）を使用して実施し、３７７個の後期段階の治療用ｍＡｂでベンチマークした（Ｒａｙｂｏｕｌｄ，２０１９）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームについての総ＣＤＲ長は、同等な後期段階治療用抗体のものと一致する（図５２Ａ～図５２Ｅ）。

【０５５３】

モノクローナル抗体の疎水性は、その治療薬への開発性に関連する重要な生物物理学的特性である。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合ア

ームの疎水性パッチ分析は、大多数の治療用ｍＡｂとベンチマークすることを実証した（図５２Ａ～図５２Ｅ）。正電荷及び負電荷の表面パッチは、ｍＡｂ発現及び加速されたインビボクリアランスに対する有害な影響と関連している。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームについて、正に帯電したパッチ、負に帯電したパッチ、及び荷電対称性は、多数の参照ｍＡｂと一致した（図５２Ａ～図５２Ｅ）。

【０５５４】

ＮＫＧ２Ｄ結合Ｆａｂアームをモデル化し、３つの異なる配向（図５３Ａ～図５３Ｃ、上部パネル）で表示し、対応する表面電荷分布が示されている（図５３Ａ～図５３Ｃ、下部パネル）。ＮＫＧ２Ｄアームの表面電荷分布は、モデル化パラトープ全体に均等に分布しているように見える。図５４Ａ～図５４Ｅは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ結合アームの総ＣＤＲ長及び表面特徴分析を示す。分析は、ＴＡＰを使用して実施した（Ｒａｙｂｏｕｌｄ，２０１９）。総ＣＤＲ長、疎水性、正／負電荷分布、及びＦｖ荷電対称性は全て、治療用ｍＡｂ参照データに比べて優っていた。要約すると、これらの分析では、異常な表面電荷特性も、異常な表面疎水性パッチも特定されなかった。

【０５５５】

免疫原性評価

免疫原性評価を、ＥｐｉＶａｘからのＥｐｉＭａｔｒｉｘアルゴリズムを使用して実施した。この評価は、Ｃｏｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ａ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌｉｚｉｎｇ　ｔｈｅ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｖａｃｃｉｎｅｓ　ａｎｄ　ｂｉｏｌｏｇｉｃ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ：ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌｉｚｅｄ　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｅｐｉｔｏｐｅ　ｍｅａｓｕｒｅ（ｉＴＥＭ）．Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９６１７５２に記載されるように実施した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの３つの鎖の配列についての、－８０（免疫原性なし）から８０（高い免疫原性）の範囲のＴｒｅｇ調整Ｅｐｉｍａｔｒｉｘ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｏｒｅは、Ｓ鎖：－１５．７８、Ｌ鎖：－２３．４９、Ｈ鎖：－３３．３９であった。したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴについての免疫原性の予想されるリスクは、低いように思われる。

【０５５６】

疎水性相互作用クロマトグラフィー

疎水性予測データを、露出された疎水性パッチの顕著なパッチを有するタンパク質が凝集する傾向性が高いことに依存する技術である分析的疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）により、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ挙動を調べることによって確認した。ＨＩＣを実施するために、簡単に言うと、ＴｒｉＮＫＥＴ（５μｇのタンパク質）の注入物を、高塩緩衝液（１００ｍＭのリン酸ナトリウム、１．８Ｍの硫酸アンモニウム、ｐＨ６．５）対試料の５：４の比で調製した。２５℃に保持したＳｅｐａｘ　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｘ　ＨＩＣ　Ｂｕｔｙｌ－ＮＰ５　５ｕＭカラムを装備したＡｇｉｌｅｎｔ　１２６０　Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　ＩＩ　ＨＰＬＣを使用して試料を分析した。濃度勾配を、０％の低塩緩衝液（１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．５）から１００％の低塩緩衝液まで１．０ｍＬ／分の流速で６．５分にわたって実行した。クロマトグラムを２８０ｎｍで監視した。分析的ＨＩＣカラムでのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの保持時間を表２６に示し、ＨＩＣプロファイルを図５５Ａ及び図５５Ｂに示す。市販のアダリムマブ及びペムブロリズマブを、良好に動作する生物製剤の例として使用し、アッセイの内部対照として機能させた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴＲＩＮＫＥＴは、ペムブロリズマブについての１１．３分及びアダリムマブの８．８分と比較して、９．７分の保持時間を有していた。したがって、実験的疎水性分析は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの疎水性特性が、更なる開発のために許容できるものであることを示唆した。

【表４７】

表 26. HIC による疎水性の評価。

被験物質	IHC 保持時間(分)
アダリムマブ	8.8
ペムブロリズマブ	11.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	9.7

【０５５７】

キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの実験的ｐＩを、ｃＩＥＦによって得た（図５６）。簡単に言うと、試料をＭｉｌｌｉＱ水で１ｍｇ／ｍＬに希釈し、１５μＬの試料を６０μＬのマスターミックス（水、メチルセルロース、Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ　３－１０、アルギニン、ｐＩマーカー４．０５及び９．９９）に添加し、ボルテックスし、簡単に遠心分離した。６０μＬの試料を溶液の上部から吸引し、９６ウェルプレートに添加し、遠心分離した後試験を行った。Ｍａｕｒｉｃｅ装置（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）において、試料を１５００ボルトで１分間、続いて３０００ボルトで８分間分離させた。商用等級のトラスツズマブが、内部対照としてアッセイに含まれた。

【０５５８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのｃＩＥＦプロファイルは、ｐＩ９．０において主要ピークを有して、モノクローナル抗体に典型的なものであった（表２７）。表２８に示されるように、少量の酸性種及び塩基性種も観察された。

【表４８】

表 27. cIEF による AB1424/AB1612 F3' TriNKET の pI の決定。

被験物質	主要ピーク(pI)
トラスツズマブ	8.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET ラン 1	9.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET ラン 2	9.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET 平均± StDev	9.0 ± 0.0

【表４９】

表 28. AB1424/AB1612 F3' TriNKET の cIEF 分析の概要。

被験物質	pI (主要)	%酸性	%主要	%塩基性
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	9.0	41.2	53.9	4.9

【０５５９】

熱安定性分析

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの熱安定性を、ＰＢＳ　ｐＨ７．４中で、又は２０ｍＭのヒスチジン、２５０ｍＭのスクロース、０．０１％のｔｗｅｅｎ－８０を含むＨＳＴ　ｐＨ６．０中で、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって評価した。

ＤＳＣを実施するために、簡単に言うと、ＴｒｉＮＫＥＴをＰＢＳで０．５ｍｇ／ｍＬに希釈した。３２５μＬを、適合する緩衝液ブランクと共に、９６ウェル深型ウェルプレートに添加した。サーモグラムを、ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＰＥＡＱ　ＤＳＣ（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＰＡ）を使用して生成した。温度を、２０℃から１００℃まで、９０℃／時で上昇させた。生のサーモグラムをバックグラウンドで減算し、ベースラインモデルを分割し、データを非二状態モデルを使用してフィッテングさせた。

【０５６０】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、両方の緩衝液中で高い熱安定性を実証した（図５７Ａ、図５７Ｂ、及び表２９）。

【表５０】

表 29. DSC による AB1424/AB1612 F3' TriNKET の熱安定性。

被験物質	緩衝液	$T_{オンセット}$ (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_{m4} (°C)	T_{m5} (°C)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	PBS	61.7	68.1	69.3	76.4	81.4	83.2
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	A	61.8	67.9	69.8	79.1	84.3	86.4

【０５６１】

ジスルフィド結合配置

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、モノクローナルＩｇＧ１抗体の骨格に基づく操作された分子である。典型的なＩｇＧ１は、１６個のジスルフィド結合を含有するが、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＦ３’フォーマットは、１５個だけのジスルフィド結合を含有する。

【０５６２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのジスルフィド結合配置を、非還元トリプシン消化のＬＣ－ＭＳ／ＭＳペプチドマッピング分析によって確認した。ジスルフィド結合されたペプチドを、ＭＳ／ＭＳデータベース検索によって同定し、天然の消化及び還元消化におけるそれらの強度を比較することによって確認した。抗体構造から予想される全ての標準的なジスルフィドを確認した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ中の観察されたジスルフィド連結ペプチドの概要を、表３０に示す。全ての理論上のジスルフィド連結ペプチドを、高い質量精度で（＜２ｐｐｍ）観察し、再現性があり、ＭＳ／ＭＳフラグメンテーションによって配列確認した。

【表５１】

表 30. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 中のジスルフィド結合ペプチドの理論質量及び実験質量。

鎖	ドメイン	ペプチド	理論質量(Da)	実験質量(Da)	質量精度 (ppm)
L	VL	L2:L7	4482.0784	4482.0842	1.7
	CL	L12:L19	3555.7490	3555.7552	1.9
H	VH	H3:H10	3371.4686	3371.4737	1.8
	CH1	H13:H14-15	7916.9194	7916.9297	1.6
	CH2	H23:H30	2328.0977	2328.1024	2.0
	CH3	H37:H41	4432.0675	4432.0797	2.8
S	scFv VH	S3-S11	3408.4638	3408.4620	-0.5
	scFv*	S9:S48*[a]	1011.4154	1011.4155	0.0
	scFv VL	S32:S46[a]	1316.5853	1316.5850	-0.2
	CH2	S26:S33	H23:H30 を参照	N.A.	N.A.
	CH3	S42:S47	3844.8236	3844.8321	1.8
分子間	ヒンジ	H20-21:S23-24	5454.7834	5454.7890	1.6
	CL-CH1	L20-21:H19	1260.4863	1260.4868	0.4
	CH3-CH3*	H36:S40-41*	2757.3830	2757.3888	2.5

*操作されたジスルフィドを意味する

[a]トリプシン及びキモトリプシン消化による

【０５６３】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの結合特性

細胞上で発現されるヒトＢＡＦＦ－Ｒに対するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの親和性を特性化するために、結合平衡除外プラットフォーム装置（ＫｉｎＥｘＡ）を使用した。図５８Ａ及び図５８Ｂは、ＢＡＦＦ－Ｒに対するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが、アイソジェニックＢＡＦＦ－Ｒ－ＣＨＯ細胞の表面上に発現されるＢＡＦＦ－Ｒに、２．５５ｎＭの親和性で結合することを実証した。

【０５６４】

ＣＨＯ細胞株の骨格上でヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒを過剰発現するアイソジェニック細胞株を設計した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを、対応する親抗体（ＡＢ１７５３）と比較した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１７５３は、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合において同様な用量反応性を実証した（図５９Ａ及び図５９Ｂ）。ＥＣ$_{50}$は、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合を比較すると、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１７５３についてほぼ同一であった（表３１）。とりわけ、バックグラウンドに対する倍率（ＦＯＢ）は、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ細胞の両方にわたって、ＡＢ１７５３よりもＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴで大きかった（図５９Ａ及び図５９Ｂ並びに表３１）。理論によって束縛されることを望むものではないが、これは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの変更されたフォーマットに起因する可能性があり、ここでは、抗原エンゲージメントが一価であり（ＡＢ１７５３の二価ではなく）、細胞上にＴｒｉＮＫＥＴのより高い充填量が存在する可能性がある。

【表５２】

表 31. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及び対応する親 mAb のアイソジェニックヒト及びカニクイザル BAFF-R-CHO 細胞への結合。

被験物質	ヒト BAFF-R CHO		カニクイザル BAFF-R CHO	
	EC_{50} (nM)	最大 FOB	EC_{50} (nM)	最大 FOB
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.9	85	0.9	141
親 mAb (AB1753)	0.4	57	0.4	116

【０５６５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞株の多様なセットへの結合を、フローサイトメトリーによって評価した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、低いナノモルのＥＣ$_{50}$で、ＢＪＡＢ上の細胞表面ＢＡＦＦ－Ｒ、Ｒａｊｉ、ＲＬ、Ｒｓ４；１１、Ｊｅｋｏ－１、及びＳＵＤＨＬ－６癌細胞に結合した。ＥＣ５０は、ＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞株の中で同等であった（図６０Ａ～図６０Ｆ）。

【０５６６】

ＮＫＧ２Ｄへの結合

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄへの結合を、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって評価した（図６１Ａ～図６１Ｈ及び図６２Ａ～図６２Ｈ）。ＮＫＧ２Ｄは天然の二量体であるため、組換えｍＦｃタグ付きＮＫＧ２Ｄ二量体をこの実験に使用した。平衡親和性データを得るために、２つの異なるフィット：定常状態親和性フィット及び動態フィットを利用した。動態定数及び平衡親和性定数を、表３２及び表３３に示す。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを、速い解離速度で低い親和性を伴って、ヒトＮＫＧ２Ｄに結合するように設計した。解離速度定数は、ヒトＮＫＧ２Ｄ及びカニクイザル標的について、それぞれ１．１±０．０×１０$^{-1}$ｓ$^{-1}$及び１．１±０．０×１０$^{-1}$ｓ$^{-1}$であった。動態フィット及び定常状態親和性フィットによって得られた平衡親和性定数（K_D）は非常に類似しており、ヒトＮＫＧ２Ｄでは、それぞれ４５５．８±１２．７ｎＭ及び４５６．４±１３．９ｎＭであり（表３２）、カニクイザルＮＫＧ２Ｄでは、それぞれ５１７．０±１３．６ｎＭ及び５２０．５±１５．５ｎＭであった（表３３）。

【表５３】

表 32. SPR によって測定されたヒト NKG2D に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	k_a ($M^{-1}s^{-1}$) x 10^5	k_d (s^{-1}) x 10^{-1}	動態フィット K_D (nM)	定常状態フィット K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	439.0	438.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	452.9	453.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.3	1.1	466.1	468.2
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.4	1.1	465.1	466.3
平均± StDev	**2.4 ± 0.1**	**1.1 ± 0.0**	**455.8 ± 12.7**	**456.4 ± 13.9**

【表５４】

表 33. SPR によって測定されたカニクイザル NKG2D に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	k_a ($M^{-1}s^{-1}$) x 10^5	k_d (s^{-1}) x 10^{-1}	1:1 動態フィット K_D (nM)	定常状態フィット K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.1	1.1	498.2	500.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.0	1.0	515.8	516.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.0	1.0	528.4	534.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	2.1	1.1	525.4	530.3
平均± StDev	**2.0±0.1**	**1.1±0.0**	**517.0±13.6**	**520.5±15.5**

【０５６７】

ＣＤ１６への結合

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ１６ａ（Ｖ１５８）、ヒトＣＤ１６ａ（Ｆ１５８）及びカニクイザルＣＤ１６への結合をＳＰＲによって評価し、トラスツズマブと比較した（図６３Ａ～図６３Ｈ、図６４Ａ～図６４Ｐ、及び図６５Ａ～図６５Ｈ）。ヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８エンゲージメントの動態は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴとＩｇＧ１アイソタイプ実験対照のトラスツズマブとの間で同等であった。（表３４）。同様に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブのヒトＣＤ１６ａ　Ｆ１５８に対する定常状態親和性は同等であった（表３５）。カニクイザルＣＤ１６に対する親和性は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブではヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８に対するものと同等であった（表３６）。したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８／Ｆ１５８及びカニクイザルＣＤ１６への好ましい結合特性を実証した。

【表５５】

表 34. CD16a V158 に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET1 の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	動態フィット K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.1×10^5	1.4×10^{-2}	130.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0×10^5	1.4×10^{-2}	131.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.1×10^5	1.4×10^{-2}	133.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.1×10^5	1.3×10^{-2}	121.7
平均± StDev	**$(1.1 \pm 0.0) \times 10^5$**	**$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-2}$**	**129.3 ± 5.2**
トラスツズマブ	1.9×10^5	9.2×10^{-3}	48.9
トラスツズマブ	1.9×10^5	9.2×10^{-3}	48.6
トラスツズマブ	1.9×10^5	9.0×10^{-3}	47.7
トラスツズマブ	1.6×10^5	8.9×10^{-3}	56.1
平均 ± StDev	**$(1.8 \pm 0.2) \times 10^5$**	**$(9.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$**	**50.3 ± 3.9**

【表５６】

表 35. ヒト CD16a F158 に結合する AB1424/AB1612 F3' TriNKET の定常状態親和性。

被験物質	定常状態 K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1331.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1256.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1366.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1430.0
平均± StDev	**1346.2 ± 72.6**
トラスツズマブ	475.7
トラスツズマブ	428.5
トラスツズマブ	447.9
トラスツズマブ	440.2
平均± StDev	**448.1 ± 20.1**

【表５７】

表36. カニクイザルCD16に対するAB1424/AB1612 F3' TriNKETの動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	動態フィット K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.0×10^{-2}	232.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.1×10^{-2}	225.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.2×10^4	2.0×10^{-2}	238.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.0×10^{-2}	239.1
平均± StDev	**$(7.6 \pm 0.4) \times 10^4$**	**$(2.1 \pm 0.0) \times 10^{-2}$**	**270.8 ± 11.0**
トラスツズマブ	1.9×10^5	1.2×10^{-2}	66.1
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.2×10^{-2}	76.2
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.2×10^{-2}	78.9
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.3×10^{-2}	79.0
平均 ± StDev	**(1.7 ± 0.2) x 105**	**$(1.2 \pm 0.0) \times 10^{-2}$**	**73.7 ± 6.8**

【０５６８】

抗原結合部位のコエンゲージメント

ヒトＣＤ１６ａ及びヒトＮＫＧ２Ｄ結合のコエンゲージメントの相乗作用を実証するために、ＳＰＲ実験を実施し、ここではＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１６ａ及び混合されたＮＫＧ２Ｄ－ＣＤ１６ａ　Ｂｉａｃｏｒｅチップ表面への結合を定量的に評価した。ヒトＮＫＧ２Ｄ及びヒトＣＤ１６ａに対するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの親和性は両方とも低いが、両方の標的に同時に結合すると、より遅いオフレートとして現れるアビディティ効果をもたらす。したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＣＤ１６ａ及びＮＫＧ２Ｄに顕著に関与し得る（図６６）。

【０５６９】

１つの標的の結合が第２の標的のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの結合を妨害するかどうかを決定するために、ＢＡＦＦ－Ｒ及びＮＫＧ２Ｄを、抗ｈＦｃ　ＩｇＧ　ＳＰＲチップ上に捕捉されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ上に順次注入した。標的結合センサーグラムは、ＢＡＦＦ－Ｒ結合アーム又はＮＫＧ２Ｄ結合アームの占有状態が、飽和状態後には第２の標的抗原の関与を妨害しないことを実証している（図６７Ａ及び図６７Ｂ）。各標的の遊離ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及び他の標的で飽和されているＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの結合を描写するそれぞれのセンサーグラムセグメントの形状の類似性は、動態パラメータがＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの標的の占有状態によって大きな影響を受けないことを示唆している。例えば、センサーグラムのＢＡＦＦ－Ｒ結合セグメントの形状は、両方のパネルにおいて類似している。ＮＫＧ２Ｄの飽和濃度は、この標的の速い解離速度のために、実験全体を通して維持されねばならない。更に、各標的結合の相対的な化学量論への影響の欠如（占有されていないＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの結合と比較する場合）は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ上のＮＫＧ２Ｄ及びＢＡＦＦ－Ｒ結合部位の完全な独立性を意味している（表３７）。したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮ

ＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ及びＮＫＧ２Ｄ標的化アームの同時コエンゲージメントを成功裏に達成することができた。

【表５８】

表 37. AB1424/AB1612 F3' TriNKET の BAFF-R 及び NKG2D に対する相対的結合化学量論。

実験設定	BAFF-R の相対的結合化学量論	NKG2D の相対的結合化学量論
別の標的に占有されていない AB1424/AB1612 F3' TriNKET に標的を結合させる(最初に注入)	1.0	1.0
別の標的で飽和された AB1424/AB1612 F3' TriNKET に標的を結合させる(二番目に注入)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1

【０５７０】

細胞結合特異性

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒに対する特異性を評価するために、ＢＡＦＦリガンドにも結合する密接に関係するタンパク質への結合を試験した。図６８Ａ及び図６８Ｂにおいて、ＳＰＲ実験を実施し、固定化されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが標的ＢＡＦＦ－Ｒに特異的に結合し、ＴＡＣＩには特異的に結合しないことを実証した。組換えヒトＴＡＣＩの活性及び適切なフォールディングを、ＴＡＣＩ特異的抗体への結合によって確認した（右側パネル）。

【０５７１】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒに対する特異性を更に評価するために、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの別のＢＡＦＦ結合ファミリーメンバーのＢＣＭＡ（ＢＣＭＡ－Ｃ６）を発現するトランスジェニック細胞株への結合を、フローサイトメトリーによって評価した（図６９Ａ及び図６９Ｂ）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＣＭＡへの、又はラット由来の親細胞株Ｃ６への交差反応性を示さなかった。既知のＢＣＭＡ特異性を有するｍＡｂ（ＥＭ９０１）を、ＢＣＭＡ検出の陽性対照として使用した。

【０５７２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの特異性及び無関係のタンパク質との相互作用の欠如を、ヒト又はカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ細胞を発現するように操作されたＥｘｐｉＣＨＯアイソジェニック細胞株への結合を調べることによって更に評価した（図７０Ａ及び図７０Ｂ）。

【０５７３】

更に、洗浄剤可溶化ＣＨＯ細胞膜タンパク質の調製物への結合を測定するために、フローサイトメトリーベースのＰＳＲアッセイを実施した（図７１Ａ～図７１Ｇ）。ＰＳＲアッセイは、抗体溶解性の代わりとなる交差相互作用クロマトグラフィー、並びにインビボクリアランスの代わりとなるバキュロウイルス粒子酵素結合免疫吸着アッセイと良好に相関している（Ｘｕ　ｅｔ．ａｌ　（２０１３）．Ａｄｄｒｅｓｓｉｎｇ　ｐｏｌｙｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｓｅｌｅｃｔｅｄ　ｆｒｏｍ　ａｎ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｙｅａｓｔ　ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ：ａ　ＦＡＣＳ－ｂａｓｅｄ，ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　ｔｏｏｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，２６，６６３－６７０）。

【０５７４】

ＰＢＳＦ中の５０μＬの１００ｎＭ　ＴｒｉＮＫＥＴ又は対照ｍＡｂを、前洗浄した５

μＬのプロテインＡ　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）スラリー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１０００１Ｄ）と共に、室温で３０分間インキュベートした。磁気ビーズに結合したＴｒｉＮＫＥＴ又はｍＡｂを、磁気ラック上に６０秒間放置し、上清を廃棄した。結合されたビーズを、１００μＬのＰＢＳＦで洗浄した。ビーズを、５０μＬのビオチン化ＰＳＲ試薬（原液から２５倍で希釈した）と共に、氷上で２０分間インキュベートした（Ｘｕ　ｅｔ．ａｌ．２０１３）。試料を磁気ラック上に置いて、上清を廃棄し、１００μＬのＰＢＳＦで洗浄した。ビオチン化ＰＳＲ試薬のＴｒｉＮＫＥＴ又は対照ｍＡｂへの結合を検出するための二次ＦＡＣＳ試薬を、以下のように作製した：１：２５０μＬのストレプトアビジン－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号４０５２０４）及び１：１００ロバ抗ヒトＦｃをＰＢＳＦ中で合わせた。各試料に、１００μＬの二次試薬を添加し、氷上で２０分間インキュベートさせた。ビーズを１００μＬのＰＢＳＦで２回洗浄し、試料をＦＡＣＳ　Ｃｅｌｅｓｔａ（ＢＤ）で分析した。このアッセイでは、トラスツズマブは陰性対照として機能した。イキセキズマブは陽性対照として機能し、フローサイトメトリーによるＰＳＲとの相互作用については増加傾向を有した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＰＳＲへの結合に対しては陰性であり、ＰＳＲ陰性対照のトラスツズマブに最も匹敵した。これらの結果は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが非特異的タンパク質と反応性ではないことを示している（図７１Ａ～図７１Ｇ）。

【０５７５】

ＫＨＹＧ１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性

ＢＡＦＦ－Ｒ＋ＢＪＡＢ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞溶解の刺激におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの効力を、ＮＫＧ２Ｄに加えて、ＣＤ１６ａを発現するように操作されたＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａ細胞を使用する細胞傷害性アッセイにおいて決定した。標的細胞の溶解を、ＤＥＬＦＩＡ細胞傷害性アッセイによって測定した。簡単に言うと、ＢＡＦＦ－Ｒを発現するヒト癌細胞株を培養物から採取し、ＨＢＳで洗浄し、ＢＡＴＤＡ試薬（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＡＤ０１１６）による標識化のために増殖培地中、10^6／ｍＬで再懸濁させた。標的細胞の標識化については、製造業者の指示に従った。標識化後、細胞をＨＢＳで３回洗浄し、培養培地中に０．５～１．０×10^5／ｍＬで再懸濁させた。１００μｌのＢＡＴＤＡ標識細胞を、９６ウェルプレートの各ウェルに添加した。ＢＡＦＦ－Ｒに対するモノクローナル抗体又はＴｒｉＮＫＥＴを培養培地中で希釈し、５０μｌの希釈したｍＡｂ又はＴｒｉＮＫＥＴを各ウェルに添加した。

【０５７６】

ＮＫ細胞を調製するために、密度勾配遠心分離を使用して、ＰＢＭＣをヒト末梢血バフィーコートから単離し、洗浄し、ＮＫ細胞単離用に調製した。ＮＫ細胞を、磁気ビーズを用いたネガティブセレクション技術を使用して単離した。単離されたＮＫ細胞の純度は、典型的には、＞９０％ＣＤ３－ＣＤ５６＋であった。単離されたＮＫ細胞を一晩休止させて、培養物から採取した。次いで、細胞を洗浄し、５：１のエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比のために、培養培地中10^5～２．０×10^6／ｍＬの濃度で再懸濁させた。５０μｌのＮＫ細胞を、合計２００μｌの培養容量になるように、プレートの各ウェルに添加した。プレートを、３７℃にて５％のCO_2で２～３時間インキュベートした。

【０５７７】

インキュベーション後、プレートをインキュベーターから取り出し、２００×ｇで５分間の遠心分離によって細胞をペレット化した。２０μｌの培養上清を清浄なマイクロプレートに移し、２００μｌの室温のユウロピウム溶液（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃ１３５－１００）を各ウェルに添加した。プレートを遮光し、プレートシェーカー上で２５０ｒｐｍにて１５分間インキュベートし、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉ３Ｘ機器を使用して読み取った。ＢＪＡＢ細胞を、ＢＡＴＤＡ試薬で標識化した。標識化後に、細胞を洗浄し、一次細胞培養培地中に再懸濁させた。ＢＡＴＤＡ標識細胞、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴＲＩＮＫＥＴ、及び休止したＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ細胞を、９６

ウェルプレートのウェルに添加した。１％のＴｒｉｔｏｎ－Ｘを添加することによって、標的細胞の最大溶解用に追加のウェルを調製した。ＢＡＴＤＡ標識細胞のみを含むウェルからの自然放出を監視した。培養の３時間後に、細胞をペレット化し、培養上清を清浄なマイクロプレートに移し、室温ユウロピウム溶液を各ウェルに添加した。プレートを遮光し、プレートシェーカー上で２５０ｒｐｍにて１５分間インキュベートした。プレートをＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉ３Ｘ機器を使用して読み取った。％特異的溶解を、以下のように算出した：

％特異的溶解＝（（実験的放出－自然放出）／（最大放出－自然放出））＊１００％

【０５７８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、同等のサブナノモルの効力及び効果的な最大細胞殺傷を示した（表３８）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＪＡＢ細胞の溶解の推進において非常に強力であり、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの生産ロットにわたって効力の強力な相関があった。

【表５９】

表 38. KIIYG-1-CD16aV 及び BJAB 細胞の存在下での AB1424/AB1612 F3’ TriNKET の効力。
最大殺傷は、対照に対して提示される。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F3’ TriNKET	0.13	108
AB1424/AB1612 F3’ TriNKET	0.13	105

【０５７９】

ＮＫ細胞媒介細胞傷害性

ＢＡＦＦ－Ｒ＋腫瘍細胞株ＲＬのＮＫ細胞媒介溶解の推進におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの効力を、親ＡＢ１７５３抗体と比較した（図７２Ａ及び図７２Ｂ）。細胞傷害性アッセイを、実施例２に記載したように実施した。ＡＢ１７５３は、ＢＡＦＦ－Ｒ＋腫瘍細胞株の低い細胞溶解又は検出不能な細胞溶解を引き起こした。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、サブナノモルのEC_{50}、効率的な最大殺傷、及びＲＬ細胞の溶解におけるＡＢ１７５３の効力を超える効力を実証した（表３９）。

【表６０】

表 39. 初代 NK 細胞及び BAFF-R+腫瘍細胞株の存在下での AB1424/AB1612 F3’ TriNKET
及び親 mAb の効力。

細胞株	AB1424/AB1612 F3’ TriNKET		AB1753	
	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
RL	0.12±0.07	44.3±19.2	ND	10.7±9.6

【０５８０】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの効力はＮＫＧ２Ｄ及びＣＤ１６ａエンゲージメントの両方を必要とする

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ媒介細胞傷害性のメカニズムを評価するために、対照ＴｒｉＮＫＥＴのパネルを生成した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴＲＩＮＫＥＴ　ＮＫＧ２Ｄｓｉは、ＮＫＧ２Ｄ結合アームの軽鎖が置換され、アームをＮＫＧ２Ｄに結合できないようにしたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのバリアントである。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ　ＦｃγＲｓｉは、Ｆｃサイレンシング突然変異：Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ（ＥＵナンバリングに従う）を保有するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫ

ＥＴのエフェクターサイレント化バージョンである。Ｆ３’アイソタイプ対照は、ＢＡＦＦ－Ｒ結合アームをパリビズマブの可変ドメインで置き換えることによって構築し、これは、非ヒト抗原に結合し、ジスルフィド安定化ｓｃＦｖとしてフォーマットされた（図７３Ａ～図７１Ｄ）。サイレント化バリアントは、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ、及びＣＤ１６ａ　Ｖ１５８へのＳＰＲ結合によって定量的に測定されるように、それらの意図した目的に応じて、予想通りに動作した（表４０）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａ及びＢＡＦＦ－Ｒ＋ＢＪＡＢ；ＮＫＧ２Ｄの存在下で、優れた効力及び最大殺傷を示し、Ｆｃサイレント化バリアントは、最小の細胞溶解活性を表示した（図７４及び表４１）。

【表６１】

表 41. KHYG-1-CD16a 及び BJAB 細胞の存在下での AB1424/AB1612 F3’ TriNKET 及びサイレント化バリアントの効力。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F3’ TRINKET	0.03	112
AB1424/AB1612 F3’ TRINKET NKG2Dsi	0.06	74
AB1424/AB1612 F3’ TRINKET FcγRsi	N.D.	48
F3’アイソタイプ対照	N.D.	48

【０５８１】

上述したように、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、高親和性でヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒに結合し、低親和性でヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄに結合し、且つ低親和性でヒト及びカニクイザルＣＤ１６ａに結合した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、いかなる関連するオフターゲット相互作用を示さなかった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞に強固に結合され、且つＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞に対して非常に強力であった。最終的に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ及びＮＫＧ２Ｄに同時に結合し、ＮＫエンゲージャーアーム間で強固な相乗作用を示すことができ、その有効性にはＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ、及びＣＤ１６ａへの三者結合が必要であり、これはＴｒｉＮＫＥＴの作用機序を強調している。

【０５８２】

実施例５－ＣＤ１６受容体へのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ結合の更なる分析

この実施例に記載される結合分析を、実施例４に記載されるよに、ＳＰＲを使用して実施した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ６４（ＦｃγＲＩ）への結合を測定し、図７５Ａ～図７５Ｈに示す。表４２は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブについてのセンサーグラムから決定された動態速度及びヒトＣＤ６４親和性値を要約する。

【表６２】

表 42. ヒト CD64 に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 結合の動態パラメータ及び親和性値。

試料	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	7.7×10^{4}	2.2×10^{-4}	2.9
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	7.3×10^{4}	2.3×10^{-4}	3.1
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	6.9×10^{4}	2.3×10^{-4}	3.4
AB1424/AB1612 F3'TRINKET	7.2×10^{4}	2.3×10^{-4}	3.2
平均 ± SD	**$(7.3 \pm 0.3) \times 10^{4}$**	**$(2.3 \pm 0.0) \times 10^{-4}$**	**3.2 ± 0.2**
トラスツズマブ	9.9×10^{1}	2.0×10^{-4}	2.0
トラスツズマブ	5.2×10^{1}	2.0×10^{-4}	3.9
トラスツズマブ	9.2×10^{1}	2.1×10^{-4}	2.2
トラスツズマブ	8.8×10^{1}	2.2×10^{-4}	2.5
平均 ± SD	**$(8.3 \pm 2.1) \times 10^{5}$**	**$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-4}$**	**2.7 ± 0.9**

【０５８３】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＣＤ６４（ＦｃγＲＩ）への結合を測定し、図７６Ａ～図７６Ｈに示す。表４３は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブについてのセンサーグラムから決定された動態速度及びカニクイザルＣＤ６４親和性値を要約する。

【表６３】

表 43. カニクイザル CD64 に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 結合の動態パラメータ及び親和性値。

試料	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	1.0 x 10^5	1.3 x 10^{-4}	1.3
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	1.0 x 10^5	1.9 x 10^{-4}	1.9
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	1.0 x 10^5	2.5 x 10^{-4}	2.4
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	1.0 x 10^5	2.7 x 10^{-4}	2.7
平均 ± SD	**(1.0 ± 0.0) x 10^5**	**(2.1 ± 0.7) x 10^{-4}**	**2.1 ± 0.6**
トラスツズマブ	1.7 x 10^5	1.4 x 10^{-4}	0.8
トラスツズマブ	1.8 x 10^5	1.5 x 10^{-4}	0.8
トラスツズマブ	1.8 x 10^5	1.4 x 10^{-4}	0.9
トラスツズマブ	1.8 x 10^5	1.2 x 10^{-4}	0.9
平均 ± SD	**(1.8 ± 0.0) x 10^5**	**(1.4 ± 0.1) x 10^{-4}**	**0.8 ± 0.1**

【０５８４】

ヒトＣＤ３２ａ　Ｈ１３１への結合を測定し、図７７Ａ～図７７Ｐに示す。センサーグラムから決定された親和性値を、表４４に要約する。

【表６４】

表 44. ヒト CD32a H131 に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブの親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.9	1.1	0.9	1.0	**1.0 ± 0.1**
トラスツズマブ	1.4	1.1	1.3	1.3	**1.3 ± 0.1**

【０５８５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ３２ａ　Ｒ１３１対立遺伝子（ＦｃγＲＩＩａ　Ｒ１３１）への結合を測定し、図７８Ａ～図７８Ｐに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表４５に要約する。

【表６５】

表 45. ヒト CD32a R131 に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブの親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.5	1.3	1.5	1.2	1.4 ± 0.1
トラスツズマブ	1.9	1.6	1.9	1.5	1.7 ± 0.2

【０５８６】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ３２ｂ（ＦｃγＲＩＩｂ）への結合を測定し、図７９Ａ～図７９Ｐに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表４６に要約する。

【表６６】

表 46. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブに対するヒト CD32b の親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	5.9	5.5	5.8	6.3	5.9 = 0.3
トラスツズマブ	7.2	6.6	7.2	7.7	7.2 = 0.5

【０５８７】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＣＤ１６ｂ（ＦｃγＲＩＩＩｂ）への結合を測定し、図８０Ａ～図８０Ｐに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表４７に要約する。

【表６７】

表 47. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブに対するヒト CD16b の親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.0	6.3	7.9	6.4	6.9 ± 0.7
トラスツズマブ	4.0	3.5	4.4	3.4	3.8 ± 0.5

【０５８８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＣＤ１６への結合を測定し、図８１Ａ～図８１Ｈに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表４８に要約する。

【表６８】

表48. カニクイザルCD16に対するAB1424/AB1612 F3' TriNKET及びトラスツズマブの親和性値。

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.0×10^{-2}	260.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.1×10^{-2}	268.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.2×10^4	2.0×10^{-2}	282.6
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	7.8×10^4	2.0×10^{-2}	260.4
平均 ± SD	**$(7.6 \pm 0.4) \times 10^4$**	**$(2.1 \pm 0.0) \times 10^{-2}$**	**270.8 ± 11.0**
トラスツズマブ	1.9×10^5	1.2×10^{-2}	66.1
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.2×10^{-2}	76.2
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.2×10^{-2}	78.9
トラスツズマブ	1.6×10^5	1.3×10^{-2}	79.0
平均 ± SD	**$(1.7 \pm 0.2) \times 10^5$**	**$(1.2 \pm 0.0) \times 10^{-2}$**	**73.7 ± 6.8**

【０５８９】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＦｃＲｎへの結合をｐＨ６．０で測定し、図８２Ａ～図８２Ｐに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表４９に要約する。

【表６９】

表49. pH6.0でのヒトFcRnに対するAB1424/AB1612 F3' TriNKET及びトラスツズマブの親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0 ± 0.0
トラスツズマブ	1.6	1.4	1.5	1.5	1.5 ± 0.1

【０５９０】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＦｃＲｎへの結合を測定し、図８３Ａ～図８３Ｐに示す。センサーグラムから決定された、得られた親和性値を、表５０に要約する。

【表７０】

表 50. pH6.0 でのカニクイザル FcRn に対する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブの親和性値。

試料	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	反復 K_D (μM)	K_D (μM) 平均 ± SD
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 ± 0.0
トラスツズマブ	1.5	1.3	1.5	1.3	1.4 ± 0.1

【０５９１】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブのヒト及びカニクイザルＦｃＲｎへのｐＨ７．４における定量可能な結合の欠如が実証され、図８４Ａ～図８４Ｈに示す。ｐＨ６．０のＦｃＲｎ結合実験の前に、ｐＨ７．４の結合を、同じＢｉａｃｏｒｅチップ表面上で実行した。

【０５９２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＩｇＧ１アイソタイプ対照のトラスツズマブは、生理学的に意味のある差異（３倍未満の差異）を実証せず、それらの試験されたヒト及びカニクイザルＣＤ６４（ＦｃγＲＩ）並びにＣＤ１６（ＦｃγＲＩＩＩ）組換え受容体への結合と同等である（表５０）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びトラスツズマブは、ヒトＣＤ３２（ＦｃγＲＩＩ）受容体へのそれらの結合において類似している（１．２倍未満の差異）（表５１）。

【表７１】

表 51. AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブに対する FcγR の親和性の概要。

分析物	ヒト CD64 K_D, nM	カニクイザル CD64 K_D, nM	ヒト CD32a K_D, μM		ヒト CD16a K_D, nM		ヒト CD32b K_D, μM	ヒト CD16b K_D, μM	カニクイザル CD16 K_D, nM
			I131	R131	V158	F158			
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	3.2 ± 0.2	2.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	129.3 ± 5.2	1346.2 ± 72.6	5.9 = 0.3	6.9 ± 0.7	270.8 ± 11.0
トラスツズマブ	2.7 ± 0.9	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.2	50.3 ± 3.9	448.1 ± 20.1	7.2 = 0.5	3.8 ± 0.5	73.7 ± 6.8

【０５９３】

更に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ヒト及びカニクイザルＦｃＲｎに対するｐＨ６．０でのその親和性においてトラスツズマブと同様である。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、及びトラスツズマブは、試験された濃度で、ｐＨ７．４においていかなる検出可能な結合も実証しなかった（表５２）。

【表７２】

表 52. ヒト及びカニクイザル FcRn に結合する AB1424/AB1612 F3' TriNKET 及びトラスツズマブの概要。

分析物	ヒト FcRn, pH 6.0 K_D, μM	ヒト FcRn, pH 7.4 K_D, μM	カニクイザル FcRn, pH 6.0 K_D, μM	カニクイザル FcRn, pH 7.4 K_D, μM
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.0 ± 0.0	定量可能な結合なし	1.0 ± 0.0	定量可能な結合なし
トラスツズマブ	1.5 ± 0.1	定量可能な結合なし	1.4 ± 0.1	定量可能な結合なし

【０５９４】

実施例６－ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３　ＴｒｉＮＫＥＴの効力分析

ＫＨＹＧ－１　ＣＤ１６Ｖ媒介細胞傷害性アッセイを、実施例４に記載されるように実施した。

【０５９５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの２つの異なる生産ロットを、図８５に示すように効力について試験した。ｅｘｐｉＣＨＯ細胞中で発現されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（ＡＢ１６１２－００２）を、ＣＨＯ－Ｍ細胞中で発現されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（ＡＢ１６１２－００３）のロットと比較した。両方の分子は、同等の効力及びＢＪＡＢ標的細胞の最大溶解を実証した（表５３中に示す）。これらの結果は、２つの異なる生産ロット及び２つの異なる発現系に対するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの一貫性を実証している。加えて、これらのデータは、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ及びＢＪＡＢ細胞を使用する細胞傷害性アッセイがロバストであり、ロット放出バイオアッセイとして機能し得ることを示した。

【表７３】

表 53. KHYG-1-CD16V の EC_{50} 値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
AB1612-002	0.13	108
AB1612-003	0.13	105

【０５９６】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの効力における変化を検出するためのＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ＋ＢＪＡＢアッセイの感度を決定した。図８６Ｂは、２００％の公称薬物濃度（ＮＤＣ）及び５０％のＮＤＣでの分子と比較して、１００％のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを参照標準（ＥＣ５０＝０．０３ｎＭ）として使用した用量反応曲線を示す。２００％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及び５０％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの相対効力を、EC_{50}値を１００％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのEC_{50}に正規化することによって計算した。１００％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを参照として使用して、より高い濃度（２００％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ）は、２００％の相対効力を示し、より低い濃度（５０％ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ）は、６５％の相対効力を示した。ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖエフェクター細胞及びＢＪＡＢ標的細胞を使用したＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの２００％、１００％、及び５０％のＮＤＣの相対効力

は、この細胞ベースの効力アッセイで観察されたＥＣ５０値におけるシフトが、５０％～２００％の公称薬物濃度の範囲でほぼ線形であることを示唆している（表５４）。

【表７４】

表 54. KHYG-1 CD16V の EC_{50} 値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
50% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.05	120
100% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.03	119
200% AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.02	114

【０５９７】

実施例７－高濃度のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３　ＴｒｉＮＫＥＴの実現可能性及び安定性分析

ＰＥＧ沈殿

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの安定性を決定するために、ＰＥＧ沈殿研究を行った。簡単に言うと、コロイド安定性を１０ｍＭ酢酸塩　ｐＨ５．０及び２０ｍＭヒスチジン　ｐＨ６．０において評価した。各緩衝液については、ＰＥＧ－６０００の４０％ｗ／ｖの保存液を作製し、酢酸塩含有溶液についてはｐＨを５．０に調整し、ヒスチジン含有溶液についてはｐＨ６．０に調整した。ＰＥＧ－６０００滴定曲線を、ＰＥＧ保存液、緩衝保存液、及びタンパク質保存液（ＰＢＳ中３６．９ｍｇ／ｍＬ又は３４．４ｍｇ／ｍＬ）から作成し、１ｍｇ／ｍＬへの高希釈倍率のために、緩衝液交換は必要ではなかった。ＰＥＧ滴定曲線は、０～３０％ｗ／ｖのＰＥＧ－６０００の濃度をカバーし、各ポイントを、それぞれの緩衝液中のアダリムマブ対照又はＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴに対して三通りで調製した。溶液を混合後、試料を５℃で一晩インキュベートし、１５，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し（予め冷却され、５℃の遠心分離機で）、沈殿したタンパク質を除去した。次いで、上清を除去し、２８０ｎｍでの吸光度によって濃度を読み取った。次いで、濃度をＰＥＧ濃度に対してプロットし、中点（C_m）を決定し、C_m＞２０％ＰＥＧ－６０００を良好なコロイド安定性と見なした。

【０５９８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのコロイド安定性を、ＰＥＧ沈殿アッセイを使用して、２つの緩衝液（２０ｍＭヒスチジン、ｐＨ６．０及び１０ｍＭ酢酸塩、ｐＨ５．０）において研究した。アダリムマブを、良好に動作する市販の生物学的製剤の抗体のベンチマーク参照として使用した。両方の緩衝液において、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、アダリムマブよりも高いコロイド安定性を示し、高いタンパク質濃度に濃縮されるその能力に対する信頼性をもたらした（図８７Ａ及び図８７Ｂ、図８８Ａ及び図８８Ｂ、表５５）。ヒスチジンでは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、C_m　１８．１±０．０９を示し、一方、酢酸塩においては、C_mは２０．６±０．１５であり、高いコロイド安定性基準を満たしている。

【表７５】

表 55. PEG 沈殿 C_m 概要のまとめ。

C_m (%PEG)	10 mM 酢酸塩, pH 5		20 mM ヒスチジン, pH 6	
	アダリムマブ	AB1424/AB1612 F3' TriNKET	アダリムマブ	AB1424/AB1612 F3' TriNKET
濃度	13.3 ± 0.5	20.6 ± 0.2	11.2 ± 0.3	18.1 ± 0.1

【０５９９】

動的光散乱（ＤＬＳ）

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの自己相互作用の傾向を、ｐＨ５．０～７．０の範囲の３つの異なる緩衝液（２０ｍＭ酢酸塩、ｐＨ５．０；２０ｍＭヒスチジン、ｐＨ６．０；又は２０ｍＭリン酸塩、ｐＨ７．０）において、ＤＬＳによって探索した。ＤＬＳについては、簡単に言うと、高感度ＤＬＳモードで実行されるＮａｎｏｔｅｍｐｅｒ　Ｐｒｏｍｅｔｈｅｕｓ　Ｐａｎｔａを使用してk_Dを決定した。要するに、試料を緩衝液中で調製し、１０μＬを濃度毎に分析用の３つの個々のキャピラリーに充填した。結果を、Ｐａｎｔａ解析ソフトウェアにおいてフィットさせ、k_D値を各緩衝液について個々に計算した。アダリムマブを、製剤化可能であり、高濃度で投与することができることが知られている良好に動作する市販の生物製剤の例として使用した。

【０６００】

ＰＥＧ沈殿からの所見と同様に、k_D（ＤＬＳによる）値を、両方の分子について緩衝液間で比較する場合、酢酸塩及びヒスチジンは強い正の値を示したが、一方、リン酸塩は図８９Ａ、図８９Ｂ、図９０Ａ、図９０Ｂ、及び表５６に示したように負の値又は正の値を示した。酢酸塩及びヒスチジンの両方において、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、正の値の大きさによって判定されるアダリムマブと比較して、等価又は良好なk_Dを示した。これらのデータは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが酢酸塩及びヒスチジン緩衝液の両方において、アダリムマブよりも優れている、ＰＥＧ沈殿からの所見を裏付けている。ＰＥＧ沈殿及びＤＬＳの両方は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが高い立体配座安定性及びコロイド安定性を有し、高濃度製剤に適用可能であることを強く指示した。

【表７６】

表 56. 自己相互作用(K_D)の概要。

被験物質	20 mM 酢酸塩, pH 5	20 mM ヒスチジン, pH 6	20 mM リン酸塩, pH 7
アダリムマブ	+8.5	+5.0	+1.1
AB1424/AB1612 F3'TriNKET	+25.4	+18.3	-4.9

【０６０１】

濃度実現可能性研究

小規模で実施した濃度実現可能性研究は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが約１５０ｍｇ／ｍＬまで濃縮され得ることを示した。全体として、収率は、表５７に示すように、タンパク質の出発／終了時の量に基づいて８８．５％であった。試料は高純度のものであり、表５８のＳＥＣ－ＭＡＬＳによって示されるように、予想された分子量と一致した。

【表７７】

表 57. 実現可能性材料濃度の概要。

遠心分離 #	出発容量 (mL)	出発濃度 (mg/mL)	タンパク質 (mg)	最終容量 (mL) [a]	最終濃度 (mg/mL)	タンパク質(mg)	%回収
1	8.0	12.8	102.5	3.3	31.3	101.7	99.2
2	3.1	31.3	95.4	1.5	66.2	98.6	103.4
3	1.4	66.2	92.0	0.9	101.4	95.4	103.6
4	0.8	101.4	85.2	0.7	126.1	87.0	102.1
5	0.6	126.1	80.7	0.6	146.3	86.3	107.0
最終的回収(濃縮、保持、洗浄)						90.7	88.5

[a] 中間遠心分離についての最終容量を、透過物を手動でピペット操作し、出発容量から容量を減算することによって決定した。最終的%回収を、被保持物の容量を測定することによって決定した。

【表７８】

表 58. 実現可能性材料の SEC-MALS 分析の概要。

試料	%HMWS	%単量体	単量体 Mw (kDa ± 不確実性) [a]
出発材料	0.2	99.8	110.3 ± 0.9%
遠心分離 1	0.2	99.8	115.2 ± 0.8%
遠心分離 2	0.3	99.7	115.9 ± 0.4%
遠心分離 3	0.3	99.7	116.9 ± 0.7%
遠心分離 4	0.3	99.7	117.7 ± 0.8%
遠心分離 5/最終材料	0.3	99.7	117.9 ± 0.7%

[a] 配列に基づく理論的 Mw は、約 125kDa である

【０６０２】

バルク材料濃度

約３５０ｍｇのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを、熱安定性評価及び粘度決定に使用するために、約１４０ｍｇ／ｍＬまで濃縮した。加速安定性及び粘度に使用される高濃度材料の大型バッチを、実現可能性バッチとは別個に生成した。材料は、緩衝液交換されたＨＳＴ中のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及び同様に実現可能性研究から生成し、ＳＥＣによって高単量体含有量の多量の材料をもたらし、それを表５９に要約する。

【表７９】

表 59. バルク材料濃度の概要。

遠心分離 #	出発容量 (mL)	出発濃度 (mg/mL)	タンパク質 (mg)	最終容量 (mL) [a]	最終濃度 (mg/mL)	タンパク質 (mg)	%回収 [b]
1	25.5	13.5	344.3	14.5	23.50	339.6	98.6
2	14.5	23.5	339.6	10.1	33.90	340.7	100.3
3	10.1	33.9	340.7	6.8	49.50	336.6	98.8
4	6.8	49.5	336.6	3.7	110.50	408.9	121.5
5	3.7	110.5	408.9	3.2	136.40	429.7	105.1
6	3.2	136.4	429.7	1.9	154.1	288.2	62.5
	最終的回収(濃縮、保持、洗浄)					303.5	89.4

[a] 中間遠心分離についての最終容量を、透過物を手動でピペット操作し、出発容量から容量を減算することによって決定した。最終的%収率を、被保持物の容量を測定することによって決定した。

[b] 注記:濃縮プロセスの回収を評価する場合、最終的%回収のみが考慮されるべきである。

【表８０】

表 60. バルク材料濃度の SEC 分析の概要

試料	濃度(mg/mL)	%HMW	%単量体
出発材料	13.5	0.3	99.7
遠心分離 1	23.5	0.5	99.5
遠心分離 2	33.9	0.3	99.7
遠心分離 3	49.5	0.3	99.7
遠心分離 4	110.5	0.3	99.7
遠心分離 5	136.4	0.3	99.7
遠心分離 6	154.1	0.4	99.6
最終材料	154.1	0.3	99.7

【０６０３】

粘度の決定

製剤の粘度を、２５℃でＨＳＴ緩衝液中で製剤化された、０～１４０ｍｇ／ｍＬのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの濃度範囲にわたって決定した。濃度は、以下のようであった：０、５、１５、２５、７５、１００、１２０及び１４０ｍｇ／ｍＬ。Ｂ０５流路（深さ＝５０μｍ、P_{max}＝４２ｋＰａ）を装備したＶＲＯＣ（登録商標）イニシウム高スループット粘度計を使用して、試料をＲｈｅｏＳｅｎｓｅ（ＳａｎＲａｍｏｎ，ＣＡ）によって分析した。ＮＩＳＴトレーサブルＮｅｗｔｏｎｉａｎスタンダードオイル（Ｃａｎｎｏｎ　Ｎ１０　Ｌｏｔ　１９２０１、２５℃で１５．８４ｃＰ）を試験して、試料を分析する前に、流路及び機器の一貫した性能を確認した。５～７５ｍｇ／ｍＬの緩衝液及び濃度を、２２，０４０秒$^{-1}$の最大剪断速度で測定した。剪断速度掃引を、３つの最高濃度（１００、１２０及び１４０ｍｇ／ｍＬ）で実施した。

【０６０４】

ＨＳＴ緩衝液中５～１４０ｍｇ／ｍＬの濃度範囲で製剤化されたＡＢ１４２４／ＡＢ１

６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの粘度は、ＲｈｅｏＳｅｎｓｅによって決定される場合、許容可能な範囲内（＜２０ｃＰ）であった。最高濃度（１４０ｍｇ／ｍＬ）での粘度は、わずか４．５ｃＰであって、十分に自動注射器用液に許容される＜２０ｃＰの粘度範囲内であった。結果を、図９１及び表６１に示す。

【表８１】

表 61. 25℃での粘度分析の概要。

試料	緩衝液	濃度 (mg/mL)	平均粘度 (cP)	STDEV (cP)	%RSD	N
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	0	1.186	0.005	0.40	11
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	5	1.225	0.002	0.20	13
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	15	1.326	0.004	0.27	13
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	25	1.437	0.004	0.28	12
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	75	2.291	0.004	0.16	12
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	100	2.844	0.007	0.26	19
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	120	3.524	0.008	0.22	18
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	HST	140	4.528	0.006	0.14	20

【０６０５】

ＨＳＴ、ｐＨ６．０における高濃度加速（４０℃）安定性

高濃度において、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴが安定であるかどうかを探索するために、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴをＨＳＴ製剤中で４０℃で４週間にわたってインキュベートし、Ａ２８０、濁度、乳白度、ＳＥＣ、ＣＥ－ＳＤＳ、ＣＩＥＦ、ＢＡＦＦＲ＋細胞結合、ＳＰＲ、及び効力によって、タンパク質の構造的及び機能的安定性を評価することによって、加速安定性研究を実施した。４週間後に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの濃度は、１３５ｍｇ／ｍＬから１６０ｍｇ／ｍＬまでわずかに増加し、上昇温度におけるいくらかの蒸発と一致した。濁度及び乳白度は、経時的に変化しなかった（表６２）。

【表８２】

表 62. HST、pH6.0 中 40℃でのインキュベーション後の AB1424/AB1612 F3' TriNKET の UV-VIS 結果の概要。

被験物質	濃度(mg/mL)	濁度 (A350 nm)	乳白色度 (A500 nm)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0,対照	135.4	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 1 週間	147.7	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 2 週間	142.0	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 3 週間	146.9	0.3	< 0.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	160.9	0.4	< 0.1

【０６０６】

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）

ＳＥＣを、実施例４に記載されるように実施した。高濃度のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中、４０℃でのインキュベーションから４週間後に高い安定性を実証した。ＨＭＷＳは１．２％から２．０％まで最小限に増加し、ＬＭＷＳは１．１％から１．４％まで増加し、単量体は４週間後に９９．４％から９７．０％まで減少し、高濃度がストレス評価中に凝集に対して大きな影響を与えないことを示している（図９２及び表６３）。

【表８３】

表 63. HST、pH6.0 中 40℃でのインキュベーション後の AB1424/AB1612 F3' TriNKET の SEC 結果の概要。

被験物質	単量体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 対照	99.4	0.6	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 1 週間	98.6	1.4	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 2 週間	98.5	1.5	0.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 3 週間	96.9	2.2	0.9
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	97.0	2.0	1.0

【０６０７】

ＣＥ－ＳＤＳ（還元）

還元ＣＥ－ＳＤＳによって評価された純度は、４０℃で４週間のインキュベーションにわたって純度の０．１％の喪失を示した（図９３及び表６４）。還元条件下では、３つの予想される鎖（ＬＣ、ＨＣ、及びｓｃＦｖ－Ｆｃ鎖）が観察された。

【表８４】

表64. HST、pH6.0中40℃で4週間後のAB1424/AB1612 F3' TriNKETのR CE-SDS純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 対照	99.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1 週間	99.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2 週間	99.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3 週間	99.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4 週間	99.6

【０６０８】

キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）

ｃＩＥＦを、実施例４に記載されるように実施した。ｃＩＥＦによって決定された電荷プロファイルは、対照における５５．７％の主要ピークからＨＳＴ中４０℃で４週間後の４４．３％の主要ピークまでの酸性シフトを実証した（図９４及び表６５）。

【表８５】

表65. HST、pH6.0中40℃でのインキュベーション後のAB1424/AB1612 F3' TriNKETのiCIEF結果の概要。

被験物質	酸性 (%)	主要 (%)	塩基性 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 対照	39.7	55.7	4.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 1 週間	40.2	53.7	6.1
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 2 週間	42.9	50.5	6.5
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 3 週間	47.2	46.1	6.8
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40°C, 4 週間	48.7	44.3	7.0

【０６０９】

標的結合及び効力

対照とストレス付加試料との間で、全ての３つの意図された標的（ＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ及びＣＤ１６ａ）に対する結合において重要な差異はなかった。（図９５Ａ、図９５Ｂ、及び表６６）。

【表８６】

表66. HST、pH6.0中40℃で4週間後のhNKG2D、hCD16a V158に対する高濃度AB1424/AB1612 F3' TriNKETの動態パラメータ及び結合親和性、並びに細胞発現されたhBAFF-RについてのEC50。

被験物質	標的	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	K_D (nM) 定常状態
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 対照	hNKG2D	(2.2±0.0)*10^5	(1.1±0.0)*10^-1	502.9±5.9	544.3±8.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40 °C, 4 週間	hNKG2D	(2.1±0.1)*10^5	(1.0±0.0)*10^-1	492.6±9.7	521.9±15.7
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 対照	hCD16a V	(1.3±0.3)*10^5	(1.7±0.0)*10^-2	144.8±40.3	N/A
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40 °C, 4 週間	hCD16a V	(1.2±0.4)*10^5	(1.6±0.0)*10^-2	144.7±40.4	N/A

		EC_{50} (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 対照	hBAFF-R	0.82
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0 40 °C, 4 週間	hBAFF-R	0.83

n≧3 反復

【０６１０】

ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、パーセント細胞溶解として定量化された効力において、対照とストレス付加試料との間で差異は検出されなかった（図９６及び表６７）。

【表８７】

表67: HST、pH6.0中4週間後の高濃度AB1424/AB1612 F3' TriNKETのEC50及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷 (%)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 対照	0.01	94
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 1 週間	0.01	100
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 2 週間	0.01	99
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 3 週間	0.01	94
AB1424/AB1612 F3' TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	0.03	92

【０６１１】
実施例８－ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴフォーマットの分子分析
　この実施例では、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの分子フォーマット、設計、構造、及び特性を分析した。これらの研究は、ａ）分子の基礎的な生化学的及び生物物理学的特性を提供し、ｂ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ１６ａ、ＦｃγＲｓのパネル、及びＦｃＲｎに対する親和性を決定し、ｃ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞への結合を確認し、ｄ）ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの選択性を実証し、ｅ）ＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞の殺傷におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力を決定し、並びにｆ）熱的、化学的及び機械的ストレスへの曝露後のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの構造的及び機能的完全性を評価した。
【０６１２】
　ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、Ｆ４フォーマット ＴｒｉＮＫＥＴである。ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、本明細書ではＡＢ１４２６と称されることがある。ＡＢ１４２４／１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（ＡＢ１４２４／１６１２－Ｆ４）は、４つのポリペプチド：ＡＢ１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－Ａ４９ＭＩ－ｓｃＦｖ（配列番号２７１）（「Ｍ鎖」）を含む第１のポリペプチド、ＡＢ－１４２４／１６１２－ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３（配列番号２７２）（「Ｈ鎖」）を含む第２のポリペプチド、並びに各々がＡＢ１４２４／１６１２－ＶＬ－ＣＬ（配列番号２７３）（「Ｌ鎖」）を含む第３及び第４のポリペプチドを含む。
【０６１３】
分子モデル化
　ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの抗ＢＡＦＦ－Ｒ及び抗ＮＫＧ２Ｄ結合アームを、ＳａｂＰｒｅｄウェブサイトで利用可能な治療用抗体プロファイラー（ＴＡＰ）を使用して、第Ｉ相後の３７７個の生物学的製剤分子と比較した。ＴＡＰは、ＡｂｏｄｙＢｕｉｌｄｅｒを使用して、ＰＥＡＲＳによる側鎖を有するＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２についてのモデルを生成した。ＣＤＲＨ３を、その多様性のために、ＭＯＤＥＬＬＥＲによって構築した。
【０６１４】
　５つの異なるパラメータを評価した：
　総ＣＤＲ長
　ＣＤＲ近辺に対する表面疎水性のパッチ（ＰＳＨ）
　ＣＤＲ近辺に対する正電荷のパッチ（ＰＰＣ）
　ＣＤＲ近辺に対する負電荷のパッチ（ＰＮＣ）
　構造的Ｆｖ電荷対称性パラメータ（ｓＦｖＣＳＰ）
【０６１５】
　次いで、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのこれらのパラメータを、治療用抗体のプロファイル分布と比較して、開発可能性及び下流の課題を引き起こし得る潜在的な問題を予測した。
【０６１６】
　図９７Ａ～図９７Ｃは、３つの異なる配向（上部パネル）及び同じ配向の対応する表面電荷分布（下部パネル）におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ　Ｆａｂ結合アームの可変ドメインのモデルである。ＣＤＲ界面の表面電荷分布は、主に疎水性残基のいくつかのクラスターを伴って負に帯電している（「上面図」、下部パネル）。ＢＡＦＦ－Ｒアームの表面電荷分布は、モデル化パラトープ全体に均等に分布していた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの疎水性パッチ分析は、大多数の治療用ｍＡｂとベンチマークしている（図９８Ａ～図９８Ｅ）。正電荷及び負電荷の表面パッチは、ｍＡｂ発現及び加速されたインビボ

クリアランスに対する有害な影響と関連している。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ結合アームについて、正に帯電したパッチ、負に帯電したパッチ、及び荷電対称性は、多数の参照ｍＡｂと一致した（図９９Ａ～図９９Ｃ）。ＮＫＧ２Ｄ結合アームをモデル化し、３つの異なる配向で表示し、それらの対応する表面電荷分布を示す（図９９Ａ～図９９Ｃ）。ＮＫＧ２Ｄアームの表面電荷分布は、モデル化パラトープ全体に均等に分布していた。図１００Ａ～図１００Ｅは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの総ＣＤＲ長及びＮＫＧ２Ｄ結合アームの表面特徴分析を示す。要約すると、異常な表面電荷特性も、異常な表面疎水性パッチも特定されなかった。

【０６１７】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの発現及び精製

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴをＥｘｐｉＣＨＯ細胞中で発現させ、精製した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの純度を、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）及びキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム（ＣＥ－ＳＤＳ）によって決定した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、高い単量体含有量を示し（図１０１Ａ～図１０１Ｃに示される≧９８．６％）、及びＣＥ－ＳＤＳ下では、主な不純物は観察されなかった。ＳＥＣ及びＣＥ－ＳＤＳによって決定されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの３つのロットの純度を、表６８に要約する。

【表８８】

表 68. SEC 及び CE-SDS による AB1424/AB1612 F4 TriNKET の純度分析。

被験物質	SEC	CE-SDS
	% 単量体	% 純度
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	99.7	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	98.6	99.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	98.6	99.7

【０６１８】

ｃＩＥＦによる電荷プロファイル分析

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの電荷プロファイルを、キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）によって分析した（図１０２及び表６９）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、９．３のｐＩで主要ピークを示した。いくつかの存在量が少ない重複する酸性ピーク及び少量の塩基性ピークも観察された。

【表８９】

表 69. cIEF による AB1424/AB1612 F4 TriNKET の電荷プロファイル結果。

被験物質	pI	%酸性	%主要	%塩基性
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	44.4	52.2	3.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	52.7	44.2	3.1
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.3	51.3	45.3	3.3

【０６１９】

疎水性相互作用クロマトグラフィー

疎水性予測データを、露出された疎水性パッチの顕著なパッチを有するタンパク質が凝集する傾向性が高いことに依存する技術である分析的疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）により、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ挙動を調べることによって確認した。ＨＩＣを、上記実施例４に記載されるように実施した。分析的ＨＩＣカラム上のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの保持時間を表７０に

示し、ＨＩＣプロファイルを図１０３Ａに示す。市販のアダリムマブ及びペムブロリズマブを、良好に動作する生物製剤の例として使用し、このアッセイのための内部対照として機能させた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ペムブロリズマブについての１１．２分及びアダリムマブの８．７分と比較して、９．７分の保持時間を有していた。したがって、実験的疎水性分析は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの疎水性特性が、更なる開発のために許容できることを示唆している。

【表９０】

表 70. AB1424/AB1612 F4 TriNKET の HIC 分析

被験物質	保持時間 (分)	アダリムマブ/ ヒュミラに対する保持時間(分)
アダリムマブ/ヒュミラ	8.7	N/A
ペムブロリズマブ/キイトルーダ	11.2	+2.5
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	9.7	+1.0

【０６２０】

熱安定性分析

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの熱安定性を、ＰＢＳ　ｐＨ７．４中で、又は２０ｍＭのヒスチジン、２５０ｍＭのスクロース、０．０１％のｔｗｅｅｎ－８０を含むＨＳＴ　ｐＨ６．０中で、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって評価した。ＤＳＣを、上記実施例４に記載されるように実施した。

【０６２１】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、両方の緩衝液において高い熱安定性を実証した（図１０３Ｂ及び表７１）。

【表９１】

表 71. AB1424/AB1612 F4 TriNKET の熱安定性

被験物質	緩衝液	$T_{オンセット}$ (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	PBS, pH 7.4	62.5	69.3	71.2	75.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	HST, pH 6.0	63.3	70.3	74.2	79.4

【０６２２】

ジスルフィド結合配置

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、モノクローナルＩｇＧ１抗体の骨格に基づく操作された分子として構築された。典型的なＩｇＧ１は、１６個のジスルフィド結合を含有するが、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＦ４フォーマットは、２０個のジスルフィド結合で構築された。

【０６２３】

Ｂ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのジスルフィド結合を、非還元トリプシン消化のＬＣ－ＭＳ／ＭＳペプチドマッピング分析によって確認した。ジスルフィド結合されたペプチドを、ＭＳ／ＭＳデータベース検索によって同定し、天然の消化及び還元消化におけるそれらの強度を比較することによって確認した。抗体構造から予測された標準ジスルフィドの全てを確認した。図１０４及び図１０４Ｂは、Ｆｃ中の操作されたジスルフィド対（非還元型及び還元型）についての抽出イオンクロマトグラム（ＸＩＣ）及

びそのペプチド対について最も強い荷電状態を示す。同様に、図１０５Ａ及び図１０５ＢにおけるＸＩＣは、ｓｃＦｖを安定化するために導入された操作されたジスルフィド架橋の存在を確認する。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ中の観察されたジスルフィド連結ペプチドの概要を、表７２に示す。全ての理論上のジスルフィド連結ペプチドを、高い質量精度で（＜２．０ｐｐｍ）観察し、再現性があり、ＭＳ／ＭＳフラグメンテーションによって配列確認した。

【表９２】

表 72. ジスルフィド結合ペプチドの理論質量及び実験質量。

鎖	ドメイン	ペプチド	理論質量(Da)	実験質量(Da)	質量精度(ppm)
L	VL	L2:L7	5147.4056	5147.4132	1.4
	CL	L11:L18	3555.7490	3555.7490	0.4
H	VH	H3:H11	3408.4638	3408.4599	-1.0
	CH1	H16:H17-18	7916.9194	7916.9058	-1.5
	CH2	H26:H33	2328.0977	2328.0961	-0.7
	CH3	H40:H44	4432.0675	4432.0636	-0.9
M	VH	M3:M11	非一意的、H3:H11 を参照		
	CH1	M16:M17-18	非一意的、H16:H17-18 を参照		
	CH2	M26:M33	非一意的、see H26:H33 を参照		
	CH3	M42:M47	3844.8236	3844.8302	1.4
	scFv VL	M49:M54	4482.0784	4482.0759	-0.4
	scFv 安定化*	M55:M61*	3183.4417	3183.4433	0.8
	scFv VH	M59:M66	3371.4686	3371.4708	0.8
分子間	ヒンジ	H23-24:M23-24	5454.7834	5454.7855	0.5
	CL-CH1	L19-20:H22	1260.4863	1260.4843	-1.6
	CL-CH1	L19-20:M22	非一意的、L19-20:H22 を参照		
	CH3-CH3*	H39:M40-41*	2757.3830	2757.3889	1.9

【０６２４】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの結合特性

ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒを過剰発現するアイソジェニック細胞株を、ＣＨＯ細胞から発生させた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの細胞表面で発現されたＢＡＦＦ－Ｒへの結合を、親ＢＡＦＦ－Ｒ特異的抗体並びにＢＡＦＦ－Ｒバインダーを含有しないＦ４フォーマット対照（Ｆ４－パリビズマブ）と比較した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及びその親ｍＡｂは、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合において、同様な用量反応性を実証した（図１０６Ａ及び図１０６Ｂ）。ＥＣ$_{50}$及び最大ＦＯＢは、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒへの結合を比較する場合、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと親ｍＡｂとはほぼ同一であった（表７３）。

【表９３】

表 73. AB1424/AB1612 F4 TriNKET 及び親 mAb のヒト及びカニクイザル細胞表面発現された BAFF-R への結合。

	ヒト BAFF-R$^+$ アイソジェニック CHO		カニクイザル BAFF-R$^+$アイソジェニック CHO	
被験物質	EC_{50} (nM)	最大 FOB	EC_{50} (nM)	最大 FOB
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.37 ± 0.11	120 ± 86	0.51 ± 0.03	56 ± 52
親 mAb	0.39 ± 0.17	123 ± 85	0.57 ± 0.23	58 ± 50

【０６２５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$癌細胞株のサブセットへの結合を、フローサイトメトリーによって評価した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、低いナノモルのＥＣ$_{50}$で、ＢＪＡＢ、Ｒａｊｉ、ＲＬ、Ｒｓ４；１１、Ｊｅｋｏ－１及びＳＵＤＨＬ－６細胞上の細胞表面ＢＡＦＦ－Ｒに結合した。ＥＣ$_{50}$は、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$癌細胞株の中では同等であった（表７４）。

【表９４】

表 74. AB1424/AB1612 F4 TriNKET の BAFF-R^{+}ヒト癌細胞株への結合

細胞株	AB1424/AB1612 F4 TriNKET EC_{50} (nM)
BJAB	0.37 ± 0.16
Raji	0.13 ± 0.02
RL	0.17 ± 0.02
Rs4;11	0.08 ± 0.03
Jeko-1	0.08 ± 0.03
SUDHL-6	0.18 ± 0.04

【０６２６】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄへの結合を、ＳＰＲによって評価した（図１０７Ａ～図１０７Ｌ）。ＮＫＧ２Ｄは天然の二量体であるため、組換えｍＦｃタグ付きＮＫＧ２Ｄ二量体をこの実験に使用した。ヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄに対する定常状態親和性を、表７５に示す。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄに対する親和性は同等であった。

【表９５】

表 75. SPR によって測定されたヒト NKG2D に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET の定常状態親和性。

被験物質	ヒト NKG2D に対する親和性 K_D (μM)	カニクイザル NKG2D に対する親和性 K_D (μM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	6.9	7.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	6.7	7.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	7.0	6.9
平均 ± StDev	**6.9 ± 0.2**	**7.2 ± 0.5**

【０６２７】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、Ｆｃ受容体との相互作用を維持することを意図したヒトＩｇＧ１　Ｆｃを用いて構築された。ＣＤ１６ａのエンゲージメントは、ＴｒｉＮＫＥＴの作用機序の重要な推進力である。ヒトＣＤ１６ａ　Ｖ１５８及びＦ１５８対立遺伝子の両方への結合、並びにカニクイザルＣＤ１６への結合を、表７６に提示されるように、ＳＰＲによって完全なＦｃＲパネル分析の一部として評価し、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴが、ＩｇＧ１アイソタイプ対照のトラスツズマブへの結合と同等な程度に、ヒト及びカニクイザルＣＤ１６に結合することを実証した。図１０８Ａ～図１０８Ｐ、図１０９Ａ～図１０９Ｈ、及び図１１０Ａ～図１１０Ｈは、それぞれＣＤ１６ａ　Ｖ１５８、Ｆ１５８及びカニクイザルＣＤ１６についての生データ及びフィットしたセンサーグラムを表す。したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１

２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＣＤ１６への良好な結合を実証している。

【０６２８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、実験対照として機能する市販されているＩｇＧ１生物製剤であるトラスツズマブに匹敵する親和性で、ヒト及びカニクイザルＦｃγ受容体に結合する。表７６は、試験されたＦｃγＲについての親和性値の概要を表す。図１１１Ａ～図１１１Ｈ、図１１２Ａ～図１１２Ｈ、図１１３Ａ～図１１３Ｐ、図１１４Ａ～図１１４Ｐ、図１１５Ａ～図１１５Ｐ、図１１６Ａ～図１１６Ｐ、図１１７Ａ～図１１７Ｐ、及び図１１８Ａ～図１１８Ｈは、生及びフィットしたセンサーグラムを表す。

【表９６】

表 76. ヒト及びカニクイザル FcγR に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET 及びトラスツズマブの親和性の概要。

分析物	ヒト CD64 K_D, nM	カニクイザル CD64 K_D, nM	ヒト CD32a K_D, mM		ヒト CD16a K_D, nM		ヒト CD32b K_D, mM	ヒト CD16b K_D, mM	カニクイザル CD16 K_D, nM
			H131	R131	V158	F158			
AB1424/AB1612 F4 TRINKET	3.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.0± 0.1	1.4± 0.2	135.0±10.0	1259.9 ± 98.5	6.1 ± 0.3	7.4 ± 1.0	232.1 ± 6.5
トラスツズマブ	2.7 ± 0.9	0.8 ± 0.1	1.3± 0.1	1.7± 0.2	65.6 ± 8.3	448.1± 20.1	7.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5	73.7 ±6.8

【０６２９】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＦｃＲｎへの結合を、ＳＰＲによって評価した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＦｃＲｎに対する親和性は、主に対して、及び実験対照として機能する市販されているＩｇＧ１生物製剤であるトラスツズマブの親和性と同様であった（表７７）。図１１６Ａ～図１１６Ｐ及び図１１７Ａ～図１１７Ｐは、ｐＨ６．０でのそれぞれヒト及びカニクイザルＦｃＲｎ結合についての定常状態フィット及び結合センサーグラムを表す。図１１８Ａ～図１１８Ｈは、ＩｇＧ１アイソタイプ対照のトラスツズマブと同様に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ｐＨ７．４ではヒト及びカニクイザルＦｃＲｎへの顕著な結合を欠如したことを実証している。

【表９７】

表 77. ヒト及びカニクイザル FcRn への AB1424/AB1612 F4 TriNKET 及びトラスツズマブの結合。

分析物	ヒト FcRn, pH 6.0 K_D, μM	ヒト FcRn, pH 7.4 K_D, μM	カニクイザル FcRn, pH 6.0 K_D, μM	カニクイザル FcRn, pH 7.4 K_D, μM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	1.3 ± 0.0	定量可能な結合なし	1.2 ± 0.0	定量可能な結合なし
トラスツズマブ	1.5 ± 0.1	定量可能な結合なし	1.4 ± 0.1	定量可能な結合なし

【０６３０】

抗原結合部位のコエンゲージメント

ヒトＣＤ１６ａ及びヒトＮＫＧ２Ｄ結合のコエンゲージメントの相乗作用を実証するためにＳＰＲ実験を実施し、ここではＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ及びＣＤ１６ａへの結合を、混合されたＮＫＧ２Ｄ－ＣＤ１６ａ　Ｂｉａｃｏｒｅチップ表面に対して別々に比較した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　Ｔｒｉ

ＮＫＥＴのヒトＮＫＧ２Ｄ及びヒトＣＤ１６ａに対する親和性は両方とも低かったが、両方の標的に同時に結合すると、より遅いオフレートとして現れるアビディティ効果をもたらす。データは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＣＤ１６ａ及びＮＫＧ２Ｄに顕著に関与し得ることを実証した（図１１９）。

【０６３１】

１つの標的の結合が他の標的のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの結合を妨害するかどうかを決定するために、ＢＡＦＦ－Ｒ及びＮＫＧ２Ｄを、抗ｈＦｃ　ＩｇＧ　ＳＰＲチップ上に捕捉されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ上に順次注入した（図１２０Ａ）。標的結合センサーグラムは、ＢＡＦＦ－Ｒ結合アームの占有状態が、ＮＫＧ２Ｄ結合を妨害しないことを実証した（図１２０Ａ）。同様に、データは、ＮＫＧ２Ｄ結合アームの占有がＢＡＦＦ－Ｒの関与を妨げることを実証した（図１２０Ｂ）。遊離ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及び他の標的で飽和されているＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの各標的の結合を表示するそれぞれのセンサーグラムセグメントの形状の類似性は、動態パラメータがＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの標的占有状態によって大きく影響されないことを示唆した。例えば、センサーグラムのＢＡＦＦ－Ｒ結合セグメントの形状は、両方のパネルにおいて類似している。ＮＫＧ２Ｄの飽和濃度は、この標的の速い解離速度のために、下部パネルに表示された実験全体にわたって維持される必要があった。更に、各標的結合の相対的な化学量論への影響の欠如（占有されていないＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの結合と比較する場合）は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ上のＮＫＧ２Ｄ及びＢＡＦＦ－Ｒ結合部位の完全な独立性を意味している（表７８）。

【表９８】

表 78. AB1424/AB1612 F4 TriNKET の BAFF-R 及び NKG2D に対する相対的結合化学量論。

実験設定	BAFF-R の相対的結合化学量論	NKG2D の相対的結合化学量論
別の標的に占有されていない AB1424/AB1612 F4 TriNKET に標的を結合させる(最初に注入)	1.00	1.00
別の標的で飽和された AB1424/AB1612 F4 TriNKET に標的を結合させる(二番目に注入)	0.97 ± 0.03	1.24 ± 0.22

【０６３２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの特異性を評価するために、フローサイトメトリーベースのＰＳＲアッセイを、上記実施例４に記載されるように実施した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＰＳＲへの結合について陰性であり、陰性対照のトラスツズマブのＰＳＲに最も匹敵した（図１２１Ａ～図１２１Ｉ）。これらの結果は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴが非特異的タンパクシ値とは反応性を示さないことを示している。

【０６３３】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力を、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$ＲＬ細胞のＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶの媒介細胞溶解を刺激するその能力によって評価した（図１２２）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$ＲＬ細胞の溶解の推進において非常に強力であり、サブナノモルの効力及び効果的な最大細胞殺傷を示している（表７９）。

【表９９】

表 79. KHYG-1-CD16aV 及び RL 細胞の存在下での AB1424/AB1612 F4 TriNKET の効力。

試験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.05	16

【０６３４】

ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$腫瘍細胞株ＲＬの初代ＮＫ細胞媒介溶解におけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力を、親ｍＡｂと更に比較した（図１２３）。親ｍＡｂは、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞株ＲＬの低い細胞溶解を引き起こすか、又は検出可能な細胞溶解を引き起こさなかった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、サブナノモルの$ＥＣ_{５０}$、効率的な最大殺傷を実証し、親ｍＡｂの効力を超えた（図１２３及び表８０）。

【表１００】

表 80. 初代 NK 及び BAFF-R^{-}細胞存在下での AB1424/AB1612 F4 TriNKET の効力。

細胞株	AB1424/AB1612 F4 TriNKET		親 mAb	
	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
RL	0.03 ± 0.00	28 ± 15	ND	ND

ND=未決定

【０６３５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの開発可能性

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの開発可能性を、一連のストレス：熱ストレス（４０℃、４週間）、低ｐＨストレス（ｐＨ５、４０℃、２週間）、高ｐＨストレス（ｐＨ８、４０℃、２週間）、酸化ストレス（０．０２％の過酸化水素、２５℃、２４時間）、撹拌、凍結／融解、低ｐＨ保持を適用することによって評価した。

【０６３６】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、上述のように、ＨＳＴ中、ｐＨ６．０、４０℃での４週間のインキュベーション後に高安定性を実証した。非常にわずかな凝集（＋０．１％）及び単量体の最小限の喪失（１．０％）が、ＳＥＣによって観察された（図１２４及び表８１）。純度の２．６％の喪失が、Ｒ　ＣＥ－ＳＤＳによって検出された（図１２５及び表８２）。ｃＩＥＦによって監視された電荷プロファイルは、対照における５２．５％の主要ピークから４週間後の２９．９％の主要ピークまでの酸性シフトを実証した。（図１２６及び表８３）。この主要ピークにおける喪失は、高温でインキュベートされたタンパク質に典型的である。更に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのヒトＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞への結合又はヒトＣＤ１６ａＶに対する動態及び親和性において、対照とストレス付加試料との間で重要な差異は観察されなかった（図１２７、表８４、図１２８Ａ、図１２８Ｂ、及び表８５）。対照とストレス付加試料との間で、効力における差異は検出されなかった（図１２９及び表８６）。

【表１０１】

表 81. HST、pH6.0 中 40°Cでのインキュベーション後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 単量体、HMWS 及び LMWS の概要。

被験物質	単量体 (%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET HST, pH 6.0 対照*	99.5	0.5	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	98.5	0.6	0.9

*HST、pH6.0 対照試料は、分析の前に病期分類後に-80°Cで保存した。

【表１０２】

表 82. HST、pH6.0 中 40°Cで 4 週間後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 対照	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	97.2

【表１０３】

表 83. HST、pH6.0 中 40°Cでのインキュベーション後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 中の酸性種、主要種、及び塩基性種の概要。

被験物質	酸性(%)	主要(%)	塩基性(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 対照	44.1	52.5	3.5
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	64.7	29.9	5.2

【表１０４】

表 84. HST、pH6.0 中 40°Cで 4 週間後の ΛB1424/ΛB1612 F4 TriNKET の hBΛFF-R$^+$細胞への結合。

被験物質	標的	BAFF-R$^+$アイソジェニック CHO 細胞への結合 EC_{50}, nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 対照	hBΛFF-R	0.18
ΛB1424/ΛB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	hBAFF-R	0.22

結果は、n=3 反復の平均である

【表１０５】

表 85. HST、pH6.0 中 40℃で 4 週間後の hCD16a に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	標的	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 対照	hCD16aV	(1.2 ± 0.1) x 10^5	(1.8 ± 0.0) x 10^{-2}	149.8 ± 4.3
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40 °C, 4 週間	hCD16aV	(1.1 ± 0.1) x 10^5	(1.6 ± 0.0) x 10^{-2}	145.5 + 16.6

結果は、n=3 反復の平均である

【表１０６】

表 86. HST、pH6.0 中で 4 週間後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の EC_{50} 及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0 対照	0.01	91
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, HST, pH 6.0, 40℃, 4 週間	0.01	93

【０６３７】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの化学的安定性

酸化ストレス下でのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの安定性を評価するために、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴを、ＰＢＳ中、２５℃で２４時間、０．０２％過酸化水素とインキュベートした。単量体の凝集又は喪失は、ＳＥＣによって観察されなかった（図１３０及び表８７）。フラグメンテーションにおける重要な増加が、Ｒ　ＣＥ－ＳＤＳによって検出された（図１３１及び表８８）。更に、ｈＢＡＦＦ－Ｒ細胞への結合において、又はｈＣＤ１６ａに対する動態及び親和性において、対照とストレス付加試料との間で重要な差異は観察されなかった（図１３２、表８９、図１３３Ａ、図１３３Ｂ、及び表９０）。最終的に、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイにおいて、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力は、酸化ストレス後に変化しなかった（図１３４及び表９１）。

【表１０７】

表 87. 強制酸化後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 単量体、HMWS、及び LMWS の概要。

被験物質	単量体(%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 酸化対照*	98.6	1.0	0.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H_2O_2, 24 時間	98.8	0.8	0.4

*酸化対照試料(H_2O_2 の代わりに PBS で模擬希釈した)は、分析前に病期分類後に-80℃で保存した。

【表１０８】

表 88. 強制酸化後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 酸化対照	100.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 0.02% H_2O_2, 24 時間	100.0

【表１０９】

表 89. 強制酸化後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の hBAFF-R$^+$細胞への結合。

被験物質	標的	BAFF-R 発現細胞への結合 EC_{50}, nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 酸化対照	hBAFF-R	0.24
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H_2O_2, 24 時間	hBAFF-R	0.21

【表１１０】

表 90. 強制酸化後の hCD16a に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	標的	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 酸化対照	hCD16aV	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^5$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	137.1 ± 3.2
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H_2O_2, 24 時間	hCD16aV	$(1.2 \pm 0.0) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	131.1 ± 4.0

結果は、n=3 反復の平均である

【表１１１】

表 91. 強制酸化後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の EC_{50} 及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 酸化対照	0.02	96
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 0.02% H_2O_2, 24 時間	0.02	100

【０６３８】

長期ｐＨ５のストレス

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの化学的安定性を、低ｐＨ（２０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０、４０℃、２週間）で長期インキュベーションによって評価した。凝集及び単量体の最小喪失（０．６％）は、ＳＥＣによって観察されなかっ

た（図１３５及び表９２）。フラグメンテーションにおける重要な増加は、還元ＣＥ－ＳＤＳによって検出されなかった（図１３６及び表９３）。長期低ｐＨ５のストレス後に、ｃＩＥＦによって監視された電荷プロファイルは、対照における５２．９％の主要ピークからストレス付加試料における４１．２％の主要ピークまでの酸性シフトを実証した（図１３７及び表９４）。長期低ｐＨ５のストレスは、ｈＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞への結合又はｈＣＤ１６ａＶについての動態及び親和性に対して大きな影響を有さなかった（図１３８、表９５、図１３９Ａ、図１３９Ｂ、及び表９６）。更に、ストレス付加試料と対照試料との間で、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおいて、効力における著しい差異は観察されなかった（図１４０及び表９７）。これらの結果に基づいて、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴが、低ｐＨストレスによる凝集及びフラグメンテーションに対して耐性があることを結論付けた。

【表１１２】

表 92. 長期低 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriINKET 単量体、HMWS、及び LMWS の概要。

被験物質(%)	単量体(%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET pH 5 対象	99.7	0.3	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	99.1	0.2	0.7

【表１１３】

表 93. 長期低 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 対照*	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	99.6

*pH5 の対照試料は、分類の前に、病期分類後-80℃で保存した。

【表１１４】

表 94. 長期低 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 中の酸性種、主要種、及び塩基性種の概要。

被験物質	酸性(%)	主要(%)	塩基性(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 対象	44.2	52.9	2.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	50.4	41.2	8.4

【表１１５】

表 95. 長期低 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の hBAFF-R+細胞への結合。

被験物質	標的	BAFF-R 発現細胞への結合 EC_{50}, nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 対象	hBAFF-R	0.22
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	hBAFF-R	0.19

【表１１６】

表 96. 長期低 pH ストレス後の hCD16a に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	標的	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 対象	hCD16aV	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{5}$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	150.5 ± 11.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	hCD16aV	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^{5}$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	152.6 + 3.9

結果は、n=3 反復の平均である

【表１１７】

表 97. 長期低 pH 曝露後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の EC_{50} 及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5 対象	0.07	89
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 5, 40 °C, 2 週間	0.05	93

【０６３９】

長期低ｐＨ８のストレス

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの化学的安定性を、高ｐＨ（２０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ８．０、４０℃、２週間）で長期インキュベーションによって評価した。凝集における少量の増加（０．２％）及び最小限の単量体喪失（１．３％）が、ＳＥＣによって観察された（図１４１及び表９８）。フラグメンテーションにおけるわずかな増加が、還元ＣＥ－ＳＤＳによって検出された（２．２％）（図１４２及び表９９）。長期ｐＨ８のストレス後に、ｃＩＥＦによって監視された電荷プロファイルは、対照における４９．２％の主要ピークからストレス付加試料における２２．５％の主要ピークまでの酸性シフトを実証した（図１４３及び表１００）。この酸性シフトは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ配列にわたる脱アミドに起因し得る。脱アミドは、上昇したｐＨにおける主要な化学的分解である。同様な酸性シフトが、同じストレス条件後に、トラスツズマブについて観察された。長期低ｐＨ８のストレスは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのｈＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合又はｈＣＤ１６ａＶに対する動態及び親和性に対して著しい影響を有さなかった（図１４４、表１０１、図１４５Ａ、図１４５Ｂ、及び表１０２）。更に、長期ｐＨ８のストレス後のＡＢ１４２４

／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと対照試料との間の効力における著しい差異は、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイにおいて観察されなかった（図１４６及び表１０３）。これらの結果に基づいて、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴＲＩＮＫＥＴが、上昇したｐＨストレスに起因する凝集に対して耐性があることを結論付けた。

【表１１８】

表 98. 長期高 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 単量体、HMWS、及び LMWS の概要。

被験物質	単量体(%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照*	99.7	0.3	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40 °C, 2 週間	98.4	0.5	1.1

pH8 対照試料は、分析前に、病期分類後-80°Cで保存した。

【表１１９】

表 99. 長期高 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40 °C, 2 週間	96.6

【表１２０】

表 100. 長期高 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 中の酸性種、主要種、及び塩基性種の概要。

被験物質	酸性(%)	主要(%)	塩基性(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照	47.8	49.2	3.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2 週間	74.5	22.5	3.0

【表１２１】

表 101. 長期高 pH ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の hBAFF-R$^+$細胞への結合。

被験物質	標的	BAFF-R 発現細胞への結合 EC_{50}, nM
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照	hBAFF-R	0.19
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2 週間	hBAFF-R	0.20

【表１２２】

表 102. 長期高 pH ストレス後の hCD16a に対する AB1424/AB1612 F4 TriNKET の動態パラメータ及び結合親和性。

被験物質	標的	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照	hCD16aV	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{5}$	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	137.3 ± 17.4
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40°C, 2 週間	hCD16aV	$(1.0 \pm 0.0) \times 10^{5}$	$(1.3 \pm 0.0) \times 10^{-2}$	120.7 ± 5.0

結果は、n=3 反復の平均である

【表１２３】

表 103. 長期高 pH 曝露後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の EC_{50} 及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷 (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8 対照	0.04	96
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, pH 8, 40 °C, 2 週間	0.05	85

【０６４０】

製造可能性

凍結／融解（Ｆ／Ｔ）サイクル中の安定性は、プロセス中間体及びバルク薬物物質が凍結され、プロセス工程間の安定性を確実にすることができるために、生物学的製剤にとって重要である。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの凍結／融解安定性を、ＨＳＴ、ｐＨ６．０中２０ｍｇ／ｍｌで評価した。タンパク質濃度を、Ａ２８０による研究の完了時に評価した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの濃度は、対照において、２１．６ｍｇ／ｍｌ及び６回の凍結／融解サイクル後に２４．２ｍｇ／ｍｌであり、凍結／融解ストレスに起因するタンパク質の喪失がないことを示している。６回の凍結／融解サイクル後に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの純度は、ＳＥＣによって（図１４７及び表１０４）並びに還元ＣＥ－ＳＤＳによって（図１４８及び表１０５）評価されるように、対照と比較して変化しなかった。ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞への結合（図１４９及び表１０６）並びにＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイにおけるＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効力（図１５０及び表１０７）は、対照試料と比較して、６回の凍結／融解サイクル後に変化しないままであった。これは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴが凍結／融解ストレス中の凝集及びフラグメンテーションの両方に対して耐性があることを示している。

【表１２４】

表 104. 6 回の凍結/融解サイクル後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET 単量体、HMWS、及び LMWS の概要。

被験物質	単量体(%)	HMWS (%)	LMWS (%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, F/T 対照*	99.6	0.4	0.0
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 6 F/T	99.6	0.4	0.0

*HST、pH6.0 F/T 対照試料は、F/T サイクリングなしで、分析の前に、病期分類後-80°Cで保存した。

【表１２５】

表 105. 凍結/融解ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, F/T 対照	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 6 F/T	99.9

【表１２６】

表 106. 6 回の凍結/融解サイクル後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の BAFF-R+細胞への結合の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET F/T 対照	0.18
AB1424/AB1612 F4 TriNKET F/T ストレス	0.14

【表１２７】

表 107. 6 回の凍結/融解サイクル後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の EC_{50} 及び最大溶解の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, F/T 対照	0.05	83
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 6 F/T	0.05	83

【０６４１】

撹拌

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ（ＨＳＴ、ｐＨ６．０中５ｍｇ／ｍｌでの）を、室温で１０００ｒｐｍにて７日間振盪させた。撹拌ストレス後に、単量体の喪失はＳＥＣによって検出されず（図１５１及び表１０８）、純度の喪失は還元ＣＥ－ＳＤＳによって観察されず（図１５２及び表１０９）、タンパク質濃度の喪失はなかった（表１０８）。ストレス付加された試料と対照のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ試料との間の差異は、ＢＡＦＦ－Ｒ$^{+}$細胞への結合において（図１５３及び表１１０）又はＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ媒介細胞傷害性アッセイによって評価された効力において（図１５４及び表１１１）観察されなかった。

【表１２８】

表 108. 撹拌ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の濃度及び単量体含有量の概要。

被験物質	濃度(mg/mL)	単量体(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌対照*	5.3	99.8
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌ストレス	5.5	99.8

*HST、pH6.0 撹拌対照試料は、分析前に、撹拌なしで 25°Cにて 1 週間ストレスを与え、ストレス後に-80°Cで保存した。

【表１２９】

表 109. 撹拌後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌対照	99.9
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌ストレス	99.9

【表１３０】

表 110. 撹拌ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TRINKET の BAFF-R+細胞への結合の概要。

被験物質	EC_{50} (nM)
AB1424/AB1612 F4 TRINKET 撹拌対照	0.17
AB1424/AB1612 F4 TRINKET 撹拌ストレス	0.16

【表１３１】

表 111. 対照と比較した撹拌ストレス後の AB1424/AB1612 F4 TriNKET の効力。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌対照	0.04	87
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 撹拌ストレス	0.05	83

【０６４２】

低ｐＨ保持

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴが、生物製剤製造において、ウイルスクリアランス工程として、一般的に使用される低ｐＨ保持に適しているかどうかを決定するために、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴプロテインＡ溶出液をｐＨ３．５１に調整し、室温で１．５時間保持した。保持時間後に、プロテインＡ溶出液を、１．０ＭのＴｒｉｓ、ｐＨ８．３で中和し、中性ｐＨを達成した。分析的ＳＥＣを実施して、低ｐＨ曝露前及び低ｐＨ曝露後に、プロファイル又は凝集体含有量において、なんらかの変化があるかどうかを決定した（図１５５Ａ及び図１５５Ｂ）。低ｐＨ保持後のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＳＥＣプロファイルは、「保持なし」対照試料と比較して、ＨＭＷ種の増加及び単量体における対応する減少（８．１％

）を示したが、ＬＭＷ種の量は変化しなかった。

【０６４３】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴを、イオン交換クロマトグラフィーを通して更に処理し、低ｐＨ保持に供されなかった精製されたタンパク質と比較して、追加のアッセイのパネルを使用して分析した。アミノ酸側鎖の化学修飾は、典型的には、ｃＩＥＦを用いたグローバルスケールで観察することができる。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの対照及び低ｐＨ保持のｃＩＥＦプロファイルは非常に類似しているように見え、酸性種、主要種、及び塩基性種の相対的定量化は全て互いの５％の範囲内である（図１５６及び表１１２）。これは、低ｐＨ保持が、精製の第２の工程後に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの電荷プロファイルに対して測定可能な影響を有さなかったことを示している。更に、還元ＣＥ－ＳＤＳによって低ｐＨ保持を受けた完全に精製されたＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴにおいて、純度の喪失は観察されなかった（図１５７及び表１１３）。低ｐＨ保持は、対照と比較して、ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞結合に対して著しい影響を有さなかった（図１５８及び表１１４）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの完全に精製された低ｐＨ保持ロットの効力は、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６ａＶ細胞傷害性アッセイによって評価されるように、対照試料の効力と同様なままであった（図１５９及び表１１５）。

【表１３２】

表 113. 低 pI 保持後の完全に精製された AB1424/AB1612 F4 TriNKET の R CE-SDS 純度の概要。

被験物質	NR CE-SDS 純度(%)	R CE-SDS 純度(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持対照	94.5	99.7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pH 保持	94.8	99.7

【表１３３】

表 114. 対照と比較した AB1424/AB1612 F4 TriNKET の低 pH 保持ロットの BAFF-R^{+}細胞の結合。

被験物質	標的	BAFF-R 発現細胞への結合 (EC_{50}, nM)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持対照	hBAFF-R	0.44
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pH 保持	hBAFF-R	0.46

結果は、n=3 反復の平均である。

【表１３４】

表 115. 対照と比較した完全に精製された AB1424/AB1612 F4 TriNKET の低 pH 保持ロットの効力。

被験物質	EC_{50} (nM)	最大殺傷(%)
AB1424/AB1612 F4 TriNKET 低 pH 保持対照	0.03	87
AB1424/AB1612 F4 TriNKET, 低 pI 保持	0.02	88

【０６４４】
実施例９－ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒへの結合の更なる分析
　初代Ｂ細胞及びヒト癌細胞株へのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴによるＢＡＦＦ－Ｒ結合の更なる評価を実施した。結合実験を、実施例４に記載されるように実施した。
【０６４５】
　ＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞株及び初代Ｂ細胞の抗体結合能力を、抗ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＡｂクローン１Ｃ１１を使用して実施した。ＢＡＦＦ－Ｒ発現を、７つのヒト癌細胞株並びにヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒを発現するように操作されたＣＨＯ細胞で測定し、結果を表１１６に要約する。ＢＡＦＦ－Ｒはまた、３人の健康なドナーからのＰＢＭＣ試料中のＣＤ１９＋初代Ｂ細胞でも測定した。初代Ｂ細胞上のＢＡＦＦ－Ｒの発現は、表１１７に要約したように、ヒト癌細胞株上の発現と同様であることを見出した。
【表１３５】

表 116. 細胞株に対する BAFF-R の定量化

細胞株	抗体結合能力
CHO-hBAFF-R	239504
CHO-cBAFF-R	58922
BJAB	9806
Raji	9969
Ramos	4815
RL	8007
Rs4;11	2771
Jeko1	10438
SUDHL-6	14164

【表１３６】

表 117. 初代 B 細胞に対する BAFF-R の定量化

ドナー ID	BAFF-R ABC
55212	12253
54136	4511
21189	9564

【０６４６】
　ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、それらの親ｍＡｂ及び２つのアイソタイプ対照ＴｒｉＮＫＥＴの用量反応性結合を、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒを発現するＣＨＯ細胞上で測定した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＣＨＯ細胞上で発現されたヒトＢＡＦＦ－Ｒ（０．７０±０．３３ｎＭ）及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒ（０．９６±０．２１ｎＭ）に対して、同等なサブナノモルの結合ＥＣ５０を有していた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及び親ｍＡｂもまた、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒに対して同様な結合を示したが、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴと比較して、約２倍大きな効力であった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、ヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒに、それぞれ０．３７±０．１１ｎＭ及び０．５１±０．０３ｎＭの効力で結合した。親ｍＡｂは、ヒト及びカニクイザル

ＢＡＦＦ－Ｒに、それぞれ０．３９±０．１７ｎＭ及び０．５７±０．２３ｎＭの結合効力で、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと同様に結合した。これらの結果は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、及びそれらの親ｍＡｂのヒト及びカニクイザルＢＡＦＦ－Ｒの交差反応性結合を実証している。

【０６４７】

ＢＡＦＦ－Ｒの内因性発現を伴う６つのヒト癌細胞株を用いて、ＢＡＦＦ－Ｒを過剰発現するＣＨＯ細胞で観察される結合を確認した。選択された細胞株はＢ細胞起源のものであって、様々なＢＡＦＦ－Ｒ＋Ｂ細胞悪性腫瘍を代表する。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、試験された６つの細胞株のうちの５つで、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及びそれらの親ｍＡｂと比較してわずかに弱い効力を有したが、高い最大バックグラウンドに対する倍率（ＦＯＢ）を有していた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及びそれらの親ｍＡｂは、Ｒｓ４；１１細胞に同一の最大ＦＯＢで結合し、これは最低のＢＡＦＦ－Ｒ発現を有していた。全ての分子及び細胞株についての結合ＥＣ５０及び最大ＦＯＢを、表１１８に要約する。

【表１３７】

表 118. 細胞結合の概要

	AB1424/AB1612 F3' TriNKET		AB1424/AB1612 F4 TriNKET		親 mAb		F3'-対照		F4-対照	
	EC50 nM	最大 FOB	EC50 nM	最大 FOB	EC50 nM	最大 FOB	EC50 nM	最大 FOB	EC50 nM	最大 FOB
BJAB	0.37 ± 0.16	16 ± 8	0.21 ± 0.03	12 ± 4	0.18 ± 0.04	12 ± 4	ND	ND	ND	ND
Raji	0.18 ± 0.01	10 ± 4	0.13 ± 0.02	7 ± 3	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
RL	0.27 ± 0.02	8 ± 2	0.17 ± 0.02	6 ± 1	0.14 ± 0.01	6 ± 1	ND	ND	ND	ND
Rs4;11	0.09 ± 0.02	4 ± 1	0.08 ± 0.03	4 ± 1	0.06 ± 0.02	3 ± 1	ND	ND	ND	ND
Jeko-1	0.13 ± 0.03	7 ± 2	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	5 ± 1	ND	ND	ND	ND
SUDHL-6	0.41 ± 0.10	19 ± 3	0.18 ± 0.04	12 ± 3	0.19 ± 0.05	13 ± 3	ND	ND	ND	ND
CHO-cBAFF-R	0.96 ± 0.21	67 ± 64	0.51 ± 0.03	56 ± 52	0.57 ± 0.23	58 ± 50	ND	ND	ND	ND
CHO-hBAFF-R	0.70 ± 0.33	146 ± 78	0.37 ± 0.11	120 ± 86	0.39 ± 0.17	123 ± 85	ND	ND	ND	ND

【０６４８】
高親和性のＣＤ１６Ｖバリアントの発現を有するか、又は有さないＮＫ白血病ＫＨＹＧ－１細胞を使用して、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの結合を、それらの親ｍＡｂと比較した。ＫＨＹＧ－１及びＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ細胞上のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの両方による結合パターンを、仮定した通りに観察した（図１６０Ａ及び図１６０Ｂ）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの両方について、ＣＤ１６の発現を欠いているＫＨＹＧ－１親細胞においてより弱い結合を観察し、それらの親ｍＡｂでは結合を観察しなかった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴと比較して、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのより弱い結合が予想され、ヒトＮＫＧ２Ｄへのこれらの分子の結合についてのＳＰＲ親和性と相関した。

【０６４９】
ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ又は親ｍＡｂとのインキュベーション後のＢＡＦＦ－Ｒの表面保持を、２時間又は２４時間のインキュベーション後に、ＲＬ及びＲａｊｉ細胞で測定した。２時間後に、ＢＡＦＦ－Ｒ表面保持において、１５～３５％の増加（１２０％±８％及び１３５％±２０％）が観察され、これはＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴとの２４時間のインキュベーション後に、３０～４０％まで更に増加した（１３９％±１４％及び１３８％±３３％）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及びそれらの親ｍＡｂについて、２時間及び２４時間で同様な増加が確認された（図１６１Ａ及び図１６１Ｂ）。３つの独立した実験の結果を、表１１９に要約する。Ｒａｊｉ細胞においても同様な結果が観察された（図１６２及び表１２０）。

【表１３８】

表 119. RL 細胞上の BAFF-R の細胞表面保持の概要

	RL 2時間	RL24時間
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	120 ± 8	139 ± 14
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	116 ± 6	136 ± 16
親mAb	117 ± 5	139 ± 16

【表１３９】

表 120. Raji 細胞上の BAFF-R の細胞表面保持の概要

	Raji 2時間	Raji 24時間
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	135 + 20	138 + 33
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	130 ± 7	134 ± 27
親mAb	126 ± 10	131 ± 35

【０６５０】
実施例１０－ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒへの結合の更なる分析
ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＢＡＦＦ－Ｒ＋細胞のＮＫ細胞溶解を刺激する能力を、非ホジキ

ンリンパ腫（ＮＨＬ）細胞株のＲＬを標的細胞として使用して、２時間の短期細胞溶解アッセイにおいて試験した。３人の健康なドナーからの初代ヒトＮＫ細胞は、エフェクター細胞として機能した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、図１６３で見られるように、親ｍＡｂと比較して、ＲＬ標的細胞の優れた殺傷効力及び最大溶解を示した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと比較して、標的細胞のより高い最大溶解を有していたが（それぞれ４４±１９及び２８±１５％）、低下した殺傷効力を有した（それぞれ０．１３±０．０７及び０．０３±０．００ｎＭ）。３つの初代ＮＫドナーからの結果を、表１２１に要約する。

【表１４０】

表 121. RL 細胞の短期間休止した NK 細胞溶解についての EC_{50} 及びパーセント最大溶解値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.13 ± 0.07	44 ± 19
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.03 ± 0.00	28 ± 15
親 mAb	ND	ND

ND=未決定

【０６５１】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴはまた、ＲＬ細胞を標的細胞として使用する長期３６時間細胞溶解アッセイにおいて、強力な活性を実証した。３人の健康なドナーからの初代ヒトＮＫ細胞は、エフェクター細胞として機能した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、それらの親ｍＡｂと比較して、ＲＬ標的細胞の優れた殺傷効力及び最大溶解を示した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと比較して、標的細胞のより高い最大溶解を有していたが（それぞれ４４±７及び３２±１３％）、低下した殺傷効力を有した（それぞれ０．０６±０．０４及び０．０５±０．０４ｎＭ）。２つの初代ＮＫドナーからの結果を、表１２２に要約する。

【表１４１】

表 122. RL 細胞の長期休止した NK 細胞溶解についての EC_{50} 及び%最大溶解値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.06 ± 0.04	44 ± 7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.04 ± 0.04	32 ± 13
親 mAb	ND	ND

ND=未決定

【０６５２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴはまた、ＲＬ標的細胞に対するＩＬ－２活性化初代ヒトＮＫ細胞の細胞溶解も増強した。同じドナーからのヒトＮＫ細胞を一晩休止させるか、又はＩＬ－２との培養によって一晩活性化させた。ＩＬ－２で活性化されたＮＫ細胞は、ＴｒｉＮＫＥＴの不在下で、ＲＬ標的細胞の増加したバックグラウンド殺傷を示した。ＡＢ１４２４／

ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、休止したＮＫ細胞及びＩＬ－２活性化ＮＫ細胞の活性を増強したが、活性化ヒトＮＫ細胞でより高い最大溶解及びより強力なＥＣ$_{50}$値を実証した（図１６４Ａ及び図１６４Ｂ）。３人の健康なドナーからのデータを、表１２３に要約する。

【表１４２】

表 123. RL 標的細胞に対する活性化 NK 細胞についての EC50 及び%最大溶解値

	休止した hNK		IL-2 活性化 hNK	
分子	EC50 (nM)	%最大溶解	EC50 (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TRINKET	0.07 ± 0.03	45 ± 17	0.02 ± 0.01	79 ± 8
AB1424/AB1612 F4 TRINKET	0.02 ± 0.01	29 ± 16	0.01 ± 0.01	76 ± 13

【０６５３】

ＴｒｉＮＫＥＴアームの各々の分子の全体的な活性への寄与を理解するために、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの複数のバリアントを、分子の様々な結合アームにおける突然変異によって生成した。１つのバリアントでは、突然変異を定常領域のＣＨ２ドメイン中に導入し、ＦｃγＲ結合を抑制させ、この分子はＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃ－ｓｉと呼ばれる。ＮＫＧ２Ｄ受容体結合を抑制する第２の機能喪失型分子を生成し、この分子はＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｄｅａｄ－ＮＫＧ２Ｄと呼ばれる。最後に、ＢＡＦＦ－Ｒに結合することができないＴｒｉＮＫＥＴ分子を生成し、この分子はＦ３’－パリビズマブと呼ばれる。４つの分子を、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖエフェクター細胞を使用する標的細胞溶解アッセイにおいて最初に試験した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ＋標的細胞の特異的溶解を、用量反応性の様式で調節することができた（ＥＣ５０＝０．０５ｎＭ）。しかしながら、ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖエフェクター細胞では、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの機能喪失型バリアントのＦ３’－パリビズマブ又はＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃ－ｓｉの用量漸増に対しては、活性は観察されなかった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｄｅａｄ－ＮＫＧ２Ｄは、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴと比較して、低下した効力及び最大溶解でＢＪＡＢ標的細胞の溶解を誘導することができた（ＥＣ$_{50}$＝０．９３ｎＭ）（図１６５）。

【０６５４】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びその機能喪失型バリアントもまた、第２のアッセイシステムにおいて評価し、ここでは健康なドナーからの休止させた初代ヒトＮＫ細胞をエフェクター細胞として使用した。ＫＨＹＧ－１－ＣＤ１６Ｖ細胞による結果と同様に、初代ＮＫ細胞は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴによるＣＤ１６、ＮＫＧ２Ｄ、及びＢＡＦＦ－Ｒエンゲージメントが、ＢＪＡＢ標的細胞に対する最大ＮＫ細胞応答を達成するために全て必要であることを示した（ＥＣ$_{50}$＝０．０６ｎＭ）（図１６６）。

【０６５５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの活性を、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンドの存在下で試験した。これらのアッセイについては、ＮＫＧ２Ｄリガンドの組換えバージョンのＭＩＣＡを使用した。ＭＩＣＡは、癌適応症全体にわたって広く発現しており、細胞表面から放出され、患者の血清中に蓄積することが知られている。可溶性ＭＩＣＡ－Ｆｃを、癌患者で見られる生理学的に関連した血清濃度である２０ｎｇ／ｍＬでＮＫ細胞の細胞溶解アッセイシステムに添加した。図１６７は、可溶性ＭＩＣＡの不在下及び存在下でのＢＪＡＢ標的細胞に対する初代ＮＫ細胞の細胞溶解アッセイにおけるＡＢ１４２

４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの用量反応曲線を示す。ＭＩＣＡの添加は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴによって達成される効力又は最大溶解に対して影響を及ぼさなかった。予想したように、可溶性ＭＩＣＡもまた、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの活性に影響を有さなかった。表１２４は、ＥＣ５０及び最大溶解値を要約する。

【表１４３】

表 124. sMIC-A-Fc を伴う NK 細胞による BJAB 細胞の溶解についての EC_{50} 及び%最大溶解値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.17 ± 0.24	49 = 24
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.04 ± 0.02	44 = 27
AB1424/AB1612 F3' TriNKET + MIC-A-Fc	0.07 ± 0.08	47 = 28
AB1424/AB1612 F4 TriNKET + MIC-A-Fc	0.05 ± 0.05	46 = 27

【０６５６】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、上述したように、ＢＡＦＦのＢＡＦＦ－Ｒへの結合をブロックする能力を実証した。ヒトＮＫ細胞溶解アッセイにおける可溶性ＢＡＦＦ二量体の効果を理解するために、可溶性ＢＡＦＦの生理学的に関連した濃度である２０ｎｇ／ｍＬを使用した。可溶性ＢＡＦＦの存在下で、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴについて効力の小さな変化が観察されたが、同じ最大溶解が達成された（図１６８）。３つのドナー試料からのデータを、表１２５に要約する。

【表１４４】

表 125. 可溶性 BAFF を伴う NK 細胞による BJAB 細胞の溶解についての EC_{50} 及び%最大溶解値

分子	EC_{50} (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.02 ± 0.02	62 = 12
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.01 ± 0.00	56 = 12
AB1424/AB1612 F3' TriNKET + MIC-A-Fcc	0.21 ± 0.15	64 = 11
AB1424/AB1612 F4 TriNKET + MIC-A-Fc	0.04 ± 0.01	51 = 15

【０６５７】

標的細胞の直接溶解に加えて、ＮＫ細胞はまた、活性時にサイトカインを産生する。し

たがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ又はそれらの親ｍＡｂの存在下で、ＢＡＦＦ－Ｒ＋標的細胞と共培養したＮＫ細胞からのＩＦＮγ産生及びＣＤ１０７ａ脱顆粒を評価した。ＢＪＡＢ標的細胞との共培養中で休止させたＮＫ細胞は、４時間後にＣＤ１０７ａ脱顆粒又は細胞内ＩＦＮγ蓄積の基礎的な誘導をほとんど示さなかった（図１６９）。共培養物へのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの添加は、脱顆粒及びＩＦＮγ産生のロバストな誘導を用量反応的様式でもたらした。対照的に、親ｍＡｂも非ＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴ　Ｆ３’－パリビズマブ及びＦ４－パリビズマブのどちらも、ＣＤ１０７ａ＋ＩＦＮγ＋ＮＫ細胞においてロバストな増加を示さなかった。ＢＪＡＢ標的細胞との共培養物中で３つの独立したＮＫ細胞ドナーを用いてアッセイを実施し、結果を表１２６に要約する。

【表１４５】

表 126. BJAB 細胞との共培養における IFNγ 及び CD107a の NK 細胞誘導の概要

分子	EC_{50} (nM)	%最大
AB1424/AB1612 F3' TRINKET	0.03 ± 0.02	35 = 26
AB1424/AB1612 F4 TRINKET	0.03 ± 0.01	32 = 23
親 mAb	0.07 ± 0.05	23 = 16

【０６５８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのサイトカイン刺激されたＣＤ８＋Ｔ細胞によるＢＡＦＦ－Ｒ＋癌細胞の殺傷を誘導する能力を評価した。活性化Ｔ細胞は、標的細胞の基礎溶解を示さず、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｄｅａｄ－ＮＫＧ２Ｄの添加も、Ｆ３’－パリビズマブの添加のいずれもＣＤ８＋Ｔ細胞活性のいかなる誘発も示さなかった。対照的に、ＣＤ２０標的化ツールのＴｒｉＮＫＥＴは、ＲＬ標的細胞のＣＤ８＋Ｔ細胞溶解の用量依存的誘導を示し、これらのＣＤ８＋細胞のＮＫＧ２Ｄ刺激に応答する能力を実証している。

【０６５９】

ヒトＩｇＧ１抗体のＦｃドメインは、３つの異なるタイプのエフェクター機能を媒介することができる。１つのタイプのＦｃ媒介エフェクター機能は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）であり、これはＮＫ細胞に対するＣＤ１６のエンゲージメントによって行われ、ＮＫ細胞刺激は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴに対して広範囲に特徴付けられている。第２のＦｃ媒介エフェクター機能は、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）であり、ここではマクロファージが抗体で被覆された細胞を攻撃して飲み込む。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴについて、オプソニン化標的細胞のＡＤＣＰを誘導するためのそれらの能力を評価するために、精製されたＣＤ１４＋単球を、Ｍ－ＣＳＦと培養することによって誘導されたＭ$_0$マクロファージをエフェクター細胞として用いるインビトロアッセイシステムを利用した。ＢＡＦＦ－Ｒ＋標的細胞を、Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　ＣＦＳＥ染料で標識し、被験物質でオプソニン化し、Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ標識Ｍ$_0$マクロファージと共培養した。貪食作用を、フローサイトメトリーによってｅｌｌ　ＴｒａｃｅＶｉｏｌｅｔ＋　Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　ＣＦＳＥ＋（二重陽性）事象として分析した。

【０６６０】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴＲＩＮＫＥＴは、Ｍ$_0$マクロファージによるＢＪＡＢ標的細胞の貪食作用を増強した。親ｍＡｂもまた、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴと同様に、

オプソニン化標的細胞のM0マクロファージ貪食作用を誘導する能力を示した（図１７０）。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃ－ｓｉは、Ｆｃγ受容体結合をサイレンシングするために、ＣＨ２ドメイン中に突然変異を保有し、陰性対照として機能した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ－Ｆｃ－ｓｉは、オプソニン化標的細胞のＡＤＣＰを媒介することができなかった。３人の異なるドナーに由来するM0マクロファージを使用した結果を、表１２７に要約する。

【表１４６】

表127. ADCP活性についてのEC50及び%最大値の概要

分子	EC50 (nM)	%最大溶解
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.03 ± 0.02	57 ± 7
AB1424/AB1612 F4 TriNKET	0.01 ± 0.00	53 ± 6
親 mAb	0.09 ± 0.00	54 ± 6

【０６６１】

ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体の第３のエフェクター機能は、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）をもたらす補体カスケードの開始である。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴＲＩＮＫＥＴは、ヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインを使用して構築されており、したがって、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴのＣＤＣ活性を刺激する能力を理解するために、Ｒａｊｉ細胞を細胞傷害性アッセイで使用した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴも、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４ＴｒｉＮＫＥＴのいずれも、Ｒａｊｉ標的細胞の補体媒介殺傷を刺激しなかった（図１７１）。対照的に、ＣＤ２０に対する陽性対照抗体（リツキシマブ）は、ヒト血清の存在下で、Ｒａｊｉ標的細胞の用量依存的溶解を示し、血清が活性補体因子を有することを確認している。

【０６６２】

実施例１１－ヒト血液中のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの安全性

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの結合を、健康なドナーの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を使用して評価した。市販の抗体１１Ｃ１で得られた結果と同様に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ＋Ｂ細胞に結合したが、３人の健康なドナーからのＰＢＭＣにおける他の細胞サブセットには結合しなかった（図１７２Ａ～図１７２Ｅ）。

【０６６３】

ヒト全血試料中のインキュベーション後のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの結合を評価した。抗体の免疫表現型検査を用いて、ヒト血液中の細胞集団の各々を定義し、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの結合を各細胞型について評価した。ヒトＰＢＭＣ試料中のクローン１１Ｃ１のＢＡＦＦ－Ｒ発現に対する染色パターンと一致して、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴに対する染色が、全血中のＢ細胞で観察された（図１７３Ａ～図１７３Ｅ）。ＮＫ細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞などのＮＫＧ２Ｄ陽性集団を含む特定された他の細胞型への感知できる結合は観察されず、これらのサブセットへの感知できる結合の欠如は、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫＧ２Ｄ結合に対する低親和性設計と一致している。

【０６６４】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＲＢＣへの結合を分析した。赤血球を、前方及び側方散乱光プロットを使用するＦＡＣＳによって、表面ＣＤ２３５ａの

発現及びＣＤ４１の欠如を特定した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ（図１７４Ａ～図１７４Ｃ）及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴについて、赤血球上で結合は観察されなかった。これらの結果は、ＲＢＣ上のＢＡＦＦ－Ｒ、ＮＫＧ２Ｄ、及びＣＤ１６発現の欠如と一致している。

【０６６５】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、ＢＡＦＦ－Ｒ発現と一致するヒト全血中での結合を実証した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴの全血試料中の影響を更に調べるために、免疫細胞存在頻度（ｉｍｍｕｎｅ　ｃｅｌｌ　ｆｒｅｑｕｅｎｃｙ）をＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ、Ｆ３’－パリビズマブ、Ｆ４－パリビズマブ又はリツキシマブで処理した試料中で検討した。全血を、１００μｇ／ｍＬの各被験物質に曝露し、４時間インキュベートした後、ＦＡＣＳ分析用に試料を調製した。

【０６６６】

リツキシマブは、細胞表面抗原ＣＤ２０を標的化し、ＣＤ２０＋リンパ腫の治療に対して承認されている。リツキシマブは、インビトロ及びインビボの両方で十分に特性化されており、ヒト及びカニクイザル全血試料の両方において、ＣＤ２０＋細胞の枯渇を引き起こすことが知られている（Ｖｕｇｍｅｙｓｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ，２００３）。したがって、リツキシマブを、全血ベースのアッセイにおける陽性対照として使用し、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴへの曝露後の細胞枯渇を評価した。リツキシマブは、試験された３つのドナーに対してＢ細胞の約５０％を枯渇させた。リツキシマブとインキュベートした試料中の他のサブ集団については、細胞存在頻度における変化は観察されなかった。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、３人の健康なドナーにおいて、対照のＦ３’－パリビズマブ及びＦ４－パリビズマブのそれぞれと比較して、細胞存在頻度における枯渇を引き起こさなかった（図１７５Ａ～図１７５Ｆ）。

【０６６７】

実施例１２－カニクイザルタンパク質へのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの結合の分析

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴと対照ｈＩｇＧ１トラスツズマブとの間で、ＦｃγＲＩに対して（それぞれ２．１±０．６ｎＭ及び０．８±０．１ｎＭ）及びＦｃγＲＩＩＩに対して（それぞれ２７０．８±１１．０ｎＭ及び７３．７±６．８ｎＭ）同等の結合親和性が観察された（表１２８を参照）。ｐＨ６．０でＦｃＲｎに対して観察される結合親和性において、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴとトラスツズマブとの間で識別可能な差は存在せず（それぞれ１．０±０．０μＭ及び１．４±０．１μＭ）、ｐＨ７．４でＦｃＲｎに対する検出可能な結合は存在しなかった。

【表１４７】

表 128. 様々なカニクイザル FcR に対する SPR による親和性を含む概要表

	標的	AB1424/AB1612 F3' TriNKET K_D	トラスツズマブ, hIgG1 対照 K_D
FcγR	FcγRI	2.1 ± 0.6 nM	0.8 ± 0.1 nM
	FcγRIII	270.8 ⊥ 11.0 nM	73.7 ⊥ 6.8 nM
FcRn	FcRn, pH 6.0	1.0 ± 0.0 μM	1.4 ± 0.1 μM
	FcRn, pH 7.4	定量可能な結合なし	定量可能な結合なし

【０６６８】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのヒト及びカニクイザルＮＫＧ２Ｄへの結合を、ＳＰＲによって評価した。平衡親和性データを得るために、２つの異なるフィット：定常状態親和性フィット及び動態フィットを利用した。動態定数及び平衡親和性定数を、表１２９に示す。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴを、速

い解離速度で低親和性を伴って、カニクイザルＮＫＧ２Ｄに結合するように設計した。カニクイザルＮＫＧ２Ｄについての解離速度定数は、１．１±０．１×１０$^{-1}$ｓ$^{-1}$であった。動態フィット及び定常状態親和性フィットによって得られた平衡親和性定数（K_D）は、それぞれ５９６．５±２０．５ｎＭ及び６０９．３±１８．３ｎＭで、カニクイザルＮＫＧ２Ｄについては非常に類似しており、測定されたパラメータにおける高い信頼性を示唆している。全体的に、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＮＫＧ２Ｄ、ＦｃγＲ及びＢＡＦＦ－Ｒに対する動態は同等であり、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴをテストするためのカニクイザルの使用を証明している。

【表１４８】

表 129. カニクイザル NKG2D に対する SPR による親和性を含む概要表

被験物質	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	動態フィット K_D (nM)	定常状態フィット K_D (nM)
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.8×10^5	1.1×10^{-1}	609.1	618.4
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.9×10^5	1.2×10^{-1}	617.3	630.0
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.8×10^5	1.1×10^{-1}	572.4	589.3
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	1.9×10^5	1.1×10^{-1}	587.2	599.6
平均 ± StDev	**$(1.9 \pm 0.1) \times 10^5$**	**$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-1}$**	**596.5 ± 20.5**	**609.3 ± 18.3**

【０６６９】

カニクイザル全血における、ＡＦ６４７コンジュゲートＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴ及びそれぞれの対照分子Ｆ３’－パリビズマブ並びにＦ４－パリビズマブによる染色を、全ての免疫細胞サブセットで測定した（代表的試料は、図１７６Ａ～図１７６Ｆのヒストグラムとして示されている）。非ＢＡＦＦ－Ｒ標的化Ｆ３’－パリビズマブ及びＦ４－パリビズマブの対照は両方とも、全ての非Ｂ細胞サブセットでのＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴで見られるように、同様な染色パターンを有していた。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの有意且つ用量反応性の結合は、同定されたＢ細胞集団のみで観察された。

【０６７０】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、カニクイザルＰＢＭＣ及び全血中でＢＡＦＦ－Ｒ＋Ｂ細胞への結合を実証した。全血試料中のＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴの効果を更に調べるために、免疫細胞存在頻度を、ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴで処理された試料中で検討した。非ＢＡＦＦ－Ｒ標的化対照ＴｒｉＮＫＥＴのＦ３’－パリビズマブ及びＦ４－パリビズマブを、陰性対照として使用した。全血を、１００μｇ／ｍＬの各被験物質に曝露し、４時間インキュベートした後、ＦＡＣＳ分析用に試料を調製した。

【０６７１】

リツキシマブは、細胞表面抗原ＣＤ２０を標的化し、ＣＤ２０＋リンパ腫の治療に対して承認されている。リツキシマブは、インビトロ及びインビボの両方で十分に特性化されており、ヒト及びカニクイザル全血試料の両方において、ＣＤ２０＋細胞の枯渇を引き起こすことが知られている（Ｖｕｇｍｅｙｓｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ，２００３）。したがって、リツキシマブを、全血ベースのアッセイにおける陽性対照として使用して、ＡＢ１４２

４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴへの曝露後のＢ細胞枯渇を評価した。リツキシマブは、試験された３つのドナーに対して、Ｂ細胞の約５０％の枯渇を実証した。リツキシマブとインキュベートした試料中の他のサブ集団については、細胞存在頻度における変化は観察されず、枯渇に対する標的特異性を示唆している。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴ及びＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ４　ＴｒｉＮＫＥＴは、３匹の健康な動物からの試料のいずれにおいても、Ｆ３’－パリビズマブ及びＦ４－パリビズマブ対照と比較して、細胞存在頻度における変化を引き起こさなかった（図１７７Ａ～図１７７Ｆ）。

【０６７２】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのカニクイザルＮＫ細胞の活性化を増強させるための能力を、ＢＡＦＦ－Ｒを内因性発現するヒトリンパ腫細胞株のＢＪＡＢとの共培養アッセイにおいて評価した。ＮＫＧ２Ｄ発現は、ＣＤ８＋ＮＫ細胞で見られるものと一致したが、ＣＤ８－ＮＫ細胞で見られるものとは一致しなかった。染色及びゲーティング戦略を、ＣＤ４５＋ＣＤ１４－ＣＤ２０－ＣＤ３－ＣＤ８＋ＣＤ１６＋と共に使用して、ＢＡＦＦ－Ｒ標的化ＴｒｉＮＫＥＴに対する応答が予測されるＣＤ８＋ＮＫ細胞を画定した。ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴは、Ｆ３’－パリビズマブと比較する場合、試験された２つのカニクイザルＰＢＭＣ試料からのＣＤ８＋ＮＫ細胞の脱顆粒の増強における優れた活性を示した（代表的なプロットを図１７８に示し、表１３０に要約する）。

【０６７３】

ＡＢ１４２４／ＡＢ１６１２　Ｆ３’ＴｒｉＮＫＥＴのＮＫ細胞脱顆粒（ＣＤ１０７ａ＋）の刺激における効力は、カニクイザル活性化アッセイとヒト活性化アッセイとの間で同等であった（カニクイザルＮＫ細胞のEC_{50}＝０．１９±０．１６ｎＭ及びヒトＮＫ細胞のEC_{50}＝０．０３±０．０２ｎＭ）。

【表１４９】

表 130. BJAB 標的細胞との共培養におけるカニクイザル NK 細胞の脱顆粒についての EC50 値

分子	EC_{50} (nM)	最大%CD107a
F3`-パリビズマブ	N/D	N/D
AB1424/AB1612 F3' TriNKET	0.19 ± 0.16	23 ± 9

N/D=未決定

【０６７４】

参照による組み込み

特段の記載がない限り、本明細書で参照される特許文献及び化学論文の各々の開示全体は、全ての目的のために参照により組み込まれる。

【０６７５】

等価物

本出願は、その精神又は本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化されてもよい。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載される本出願を限定するのではなく、全ての点で例示的であると見なされるべきである。したがって、本出願の範囲は、前述の記載によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の等価の意味及び範囲内に入る全ての変更は、その中に包含されることが意図される。

【図面】

【図１】

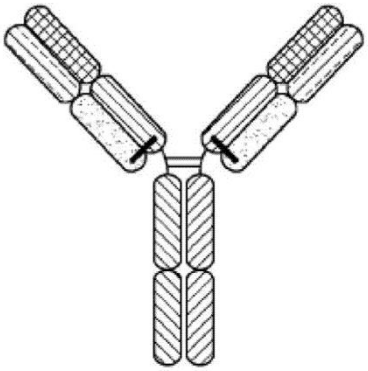


図1

【図２－１】

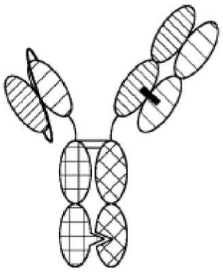


図2A

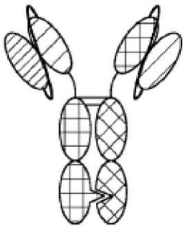


図2B

【図２－２】

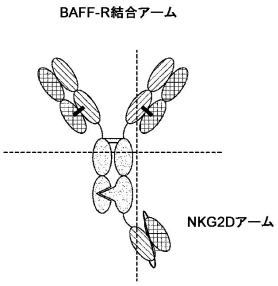


図2C

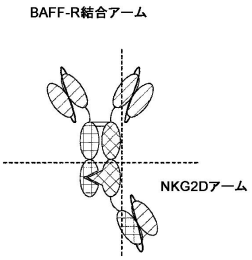


図2D

【図２－３】

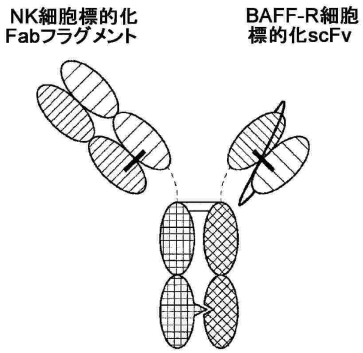


図2E

【図３】

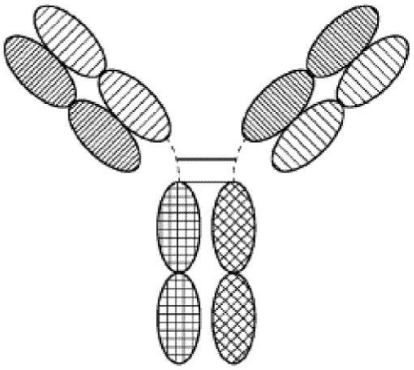


図3

【図４】

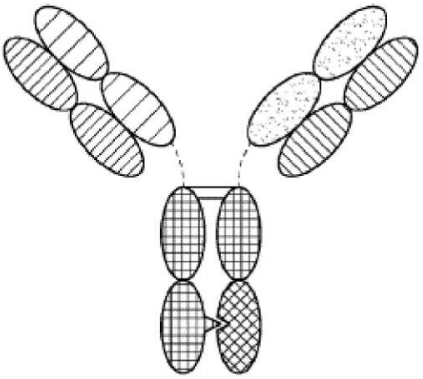


図4

【図５】

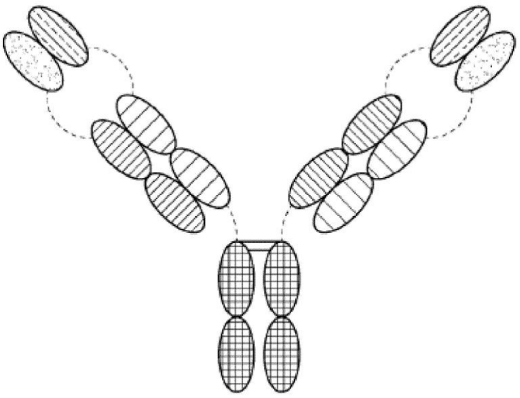


図5

【図６】

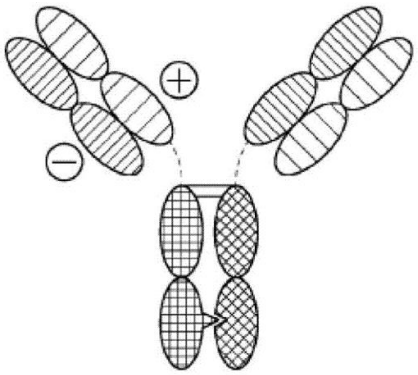


図6

【図７】

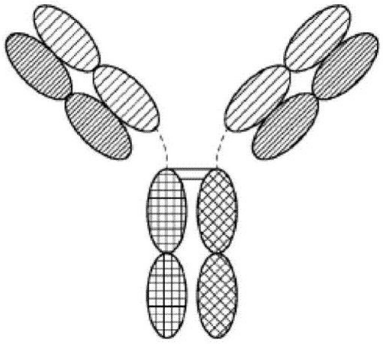


図7

【図８】

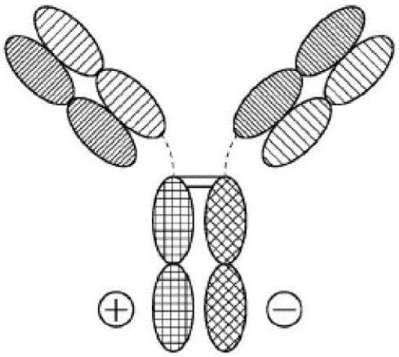


図8

【図９】

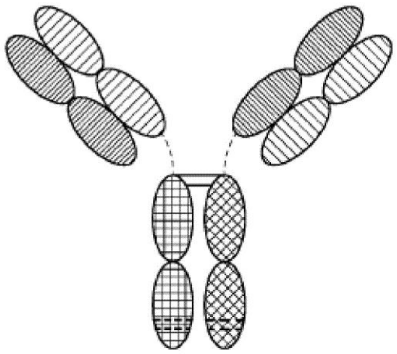


図9

【図１０】

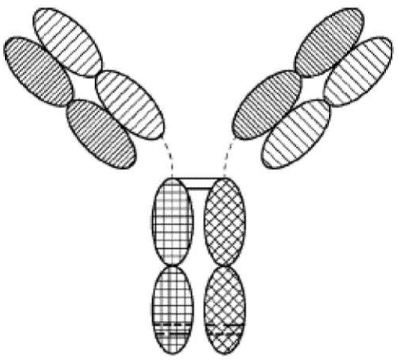


図10

【図１１】

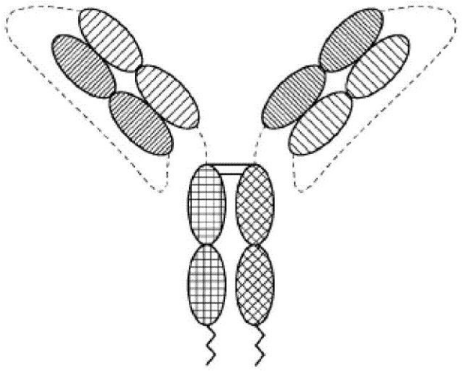


図11

【図１２】

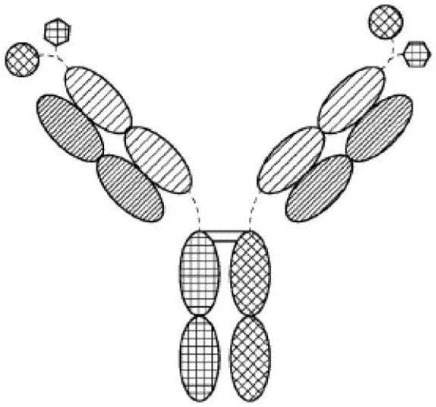


図12

【図１３－１】

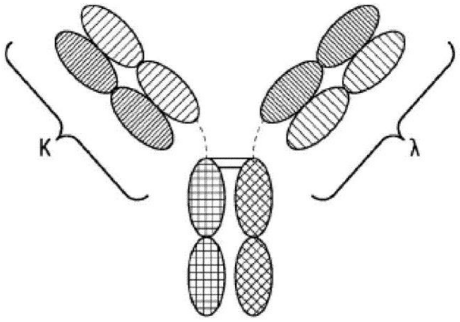


図13A

【図１３－２】

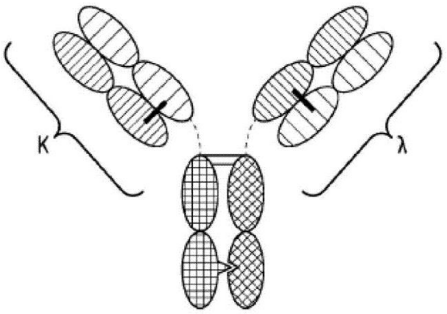


図13B

【図１４】

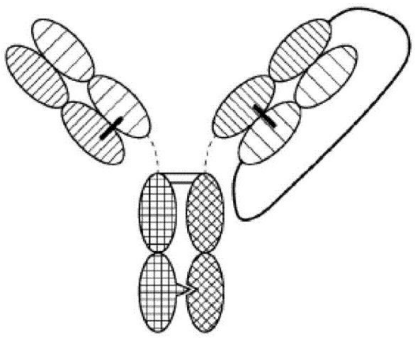


図14

【図１５】

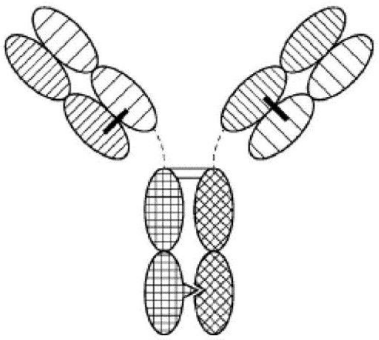


図15

【図１６】

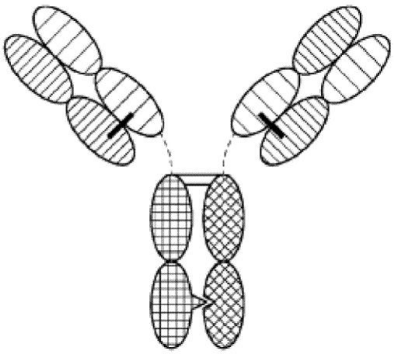


図16

【図１７】

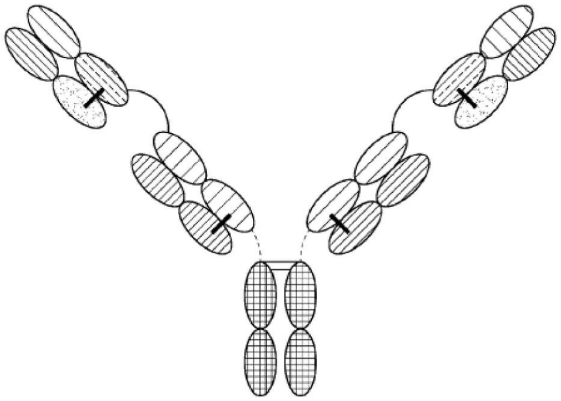


図17

【図１８－１】

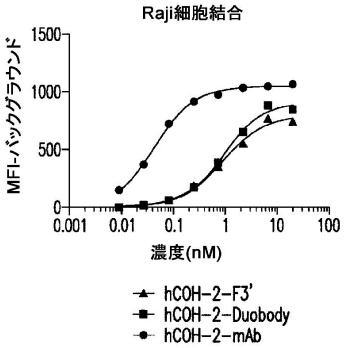


図18A

【図１８－２】

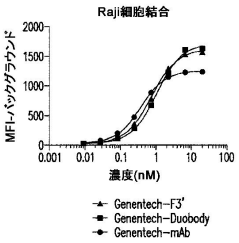


図18B

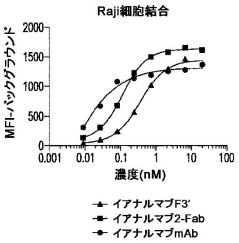


図18C

【図１９－１】

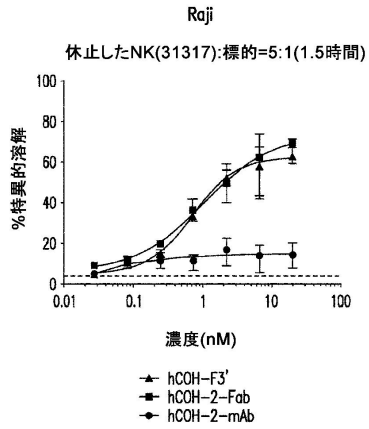


図19A

【図１９－２】

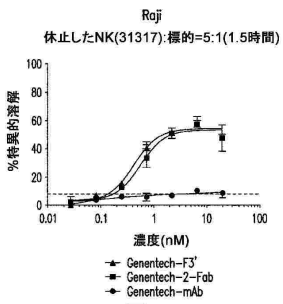


図19B

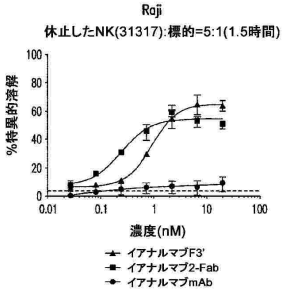


図19C

【図２０－１】

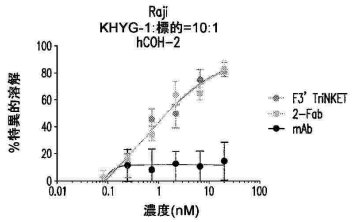


図20A

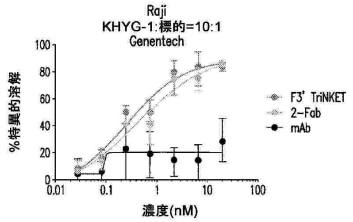


図20B

【図２０－２】

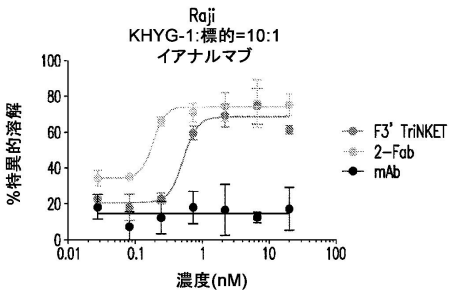


図20C

【図２１】

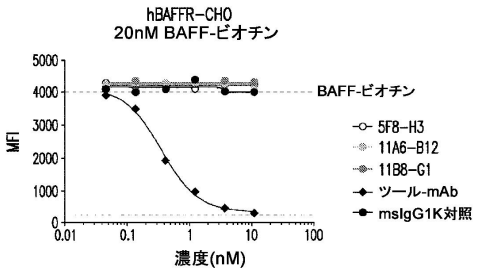


図21

【図２２－１】

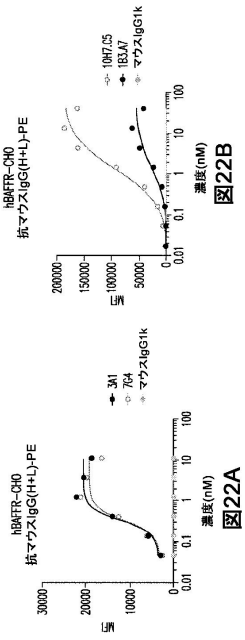


図22B

図22A

【図２２－２】

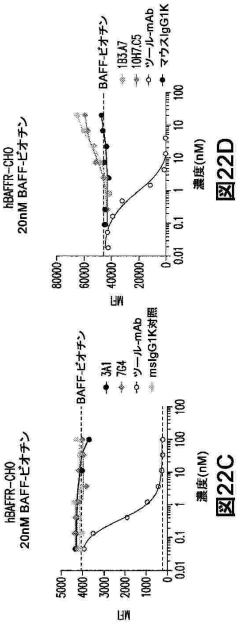


図22C

図22D

【図２３－１】

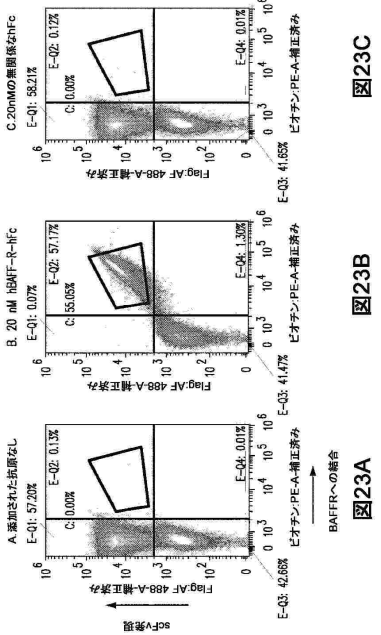


図23A

図23B

図23C

【図２３－２】

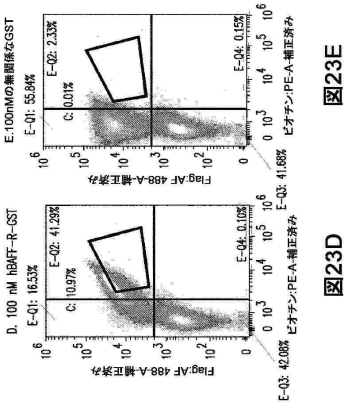


図23D

図23E

【図２４】

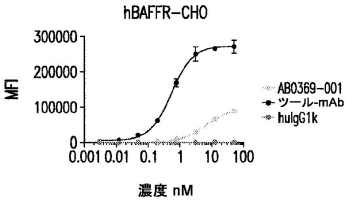


図24A

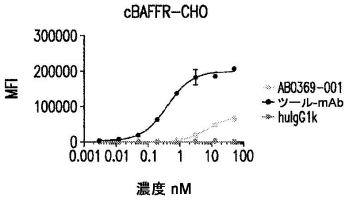


図24B

【図２５－１】

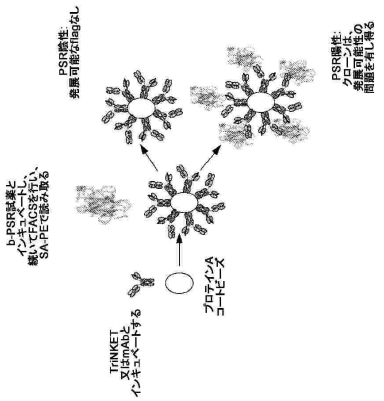


図25A

【図２５－２】

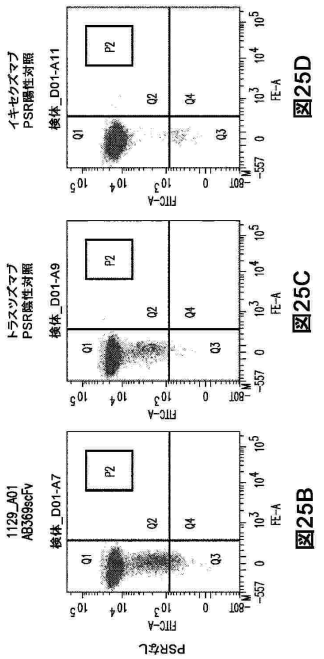


図25D
図25C
図25B

【図２５－３】

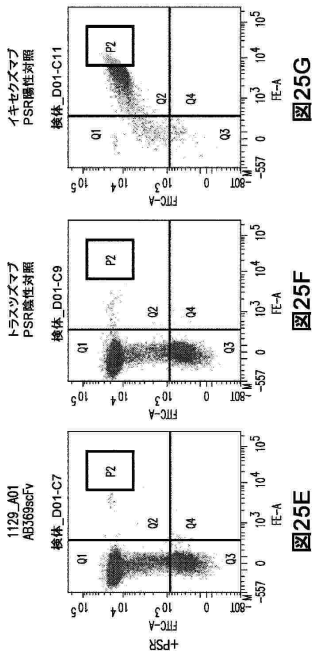


図25G
図25F
図25E

【図２６】

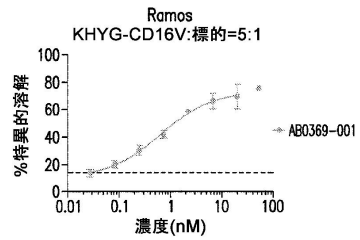


図26

【図２７】

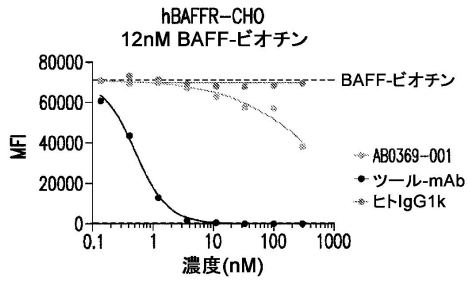
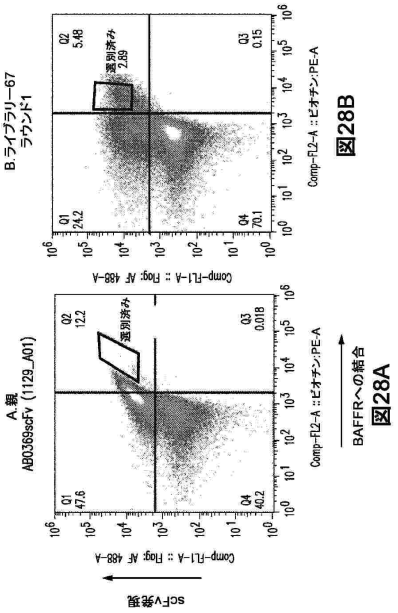
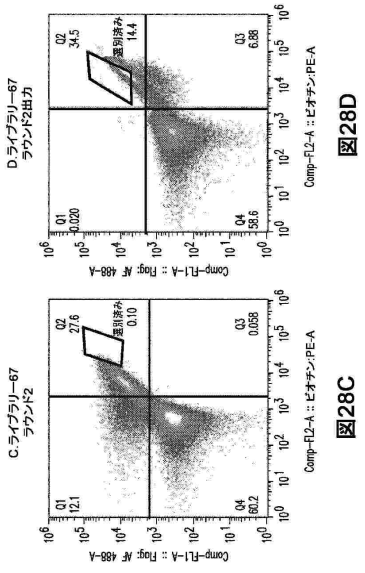


図27

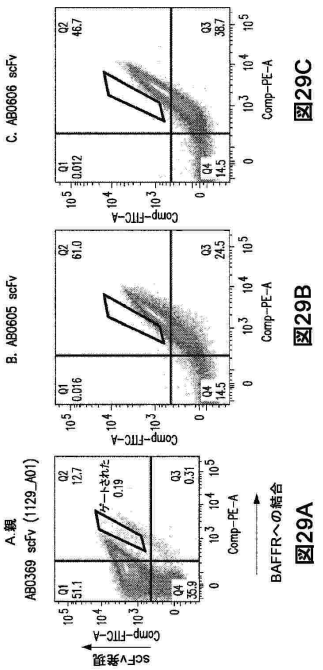
【図２８－１】



【図２８－２】



【図２９－１】



【図２９－２】

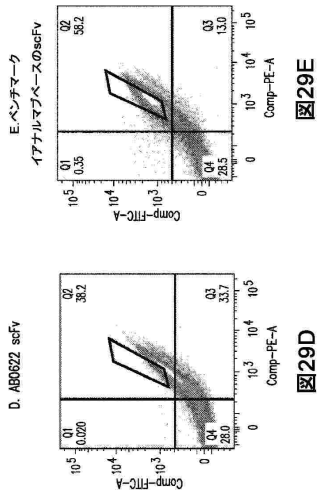


図29E

図29D

【図３０－１】

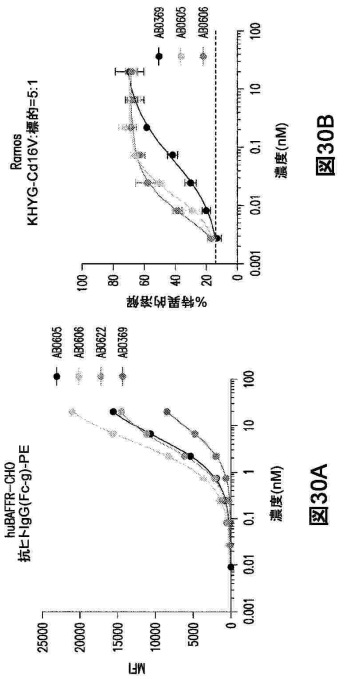


図30B

図30A

【図３０－２】

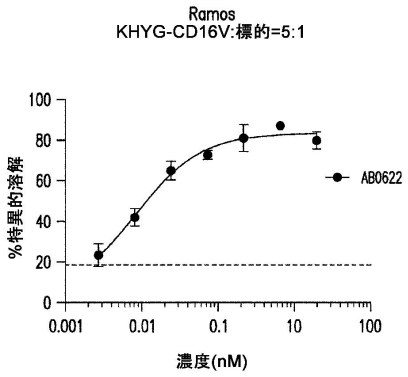


図30C

【図３１－１】

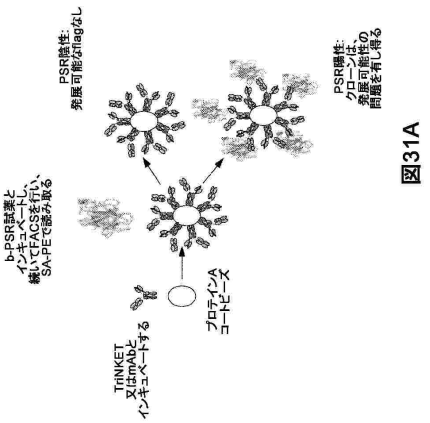


図31A

【図３１－２】

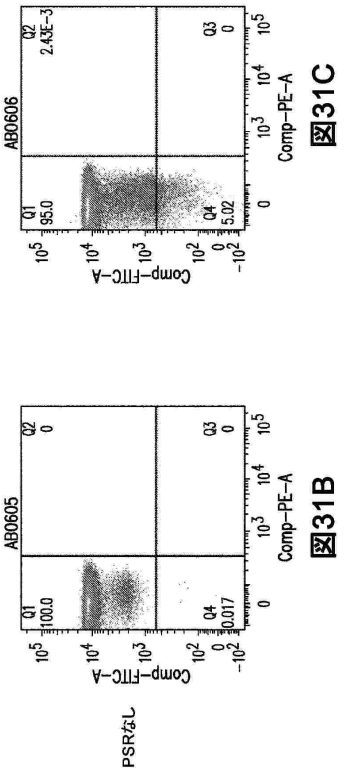


図31B

図31C

【図３１－３】

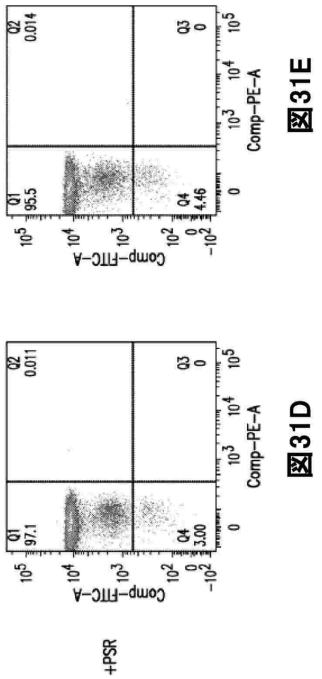


図31D

図31E

【図３２】

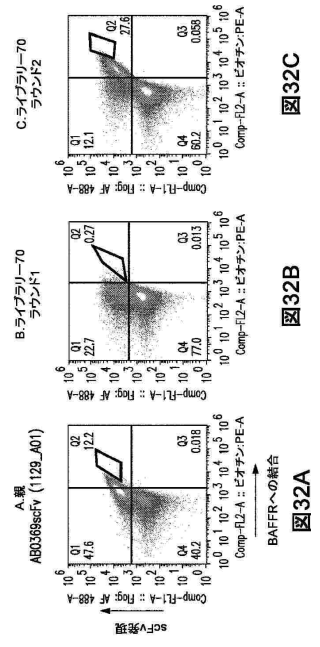


図32A

図32B

図32C

【図３３－１】

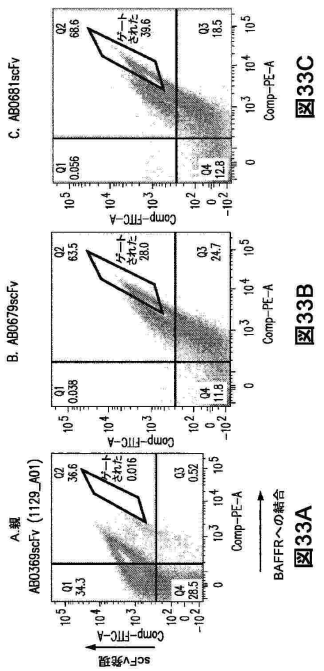


図33A

図33B

図33C

【図３３－２】

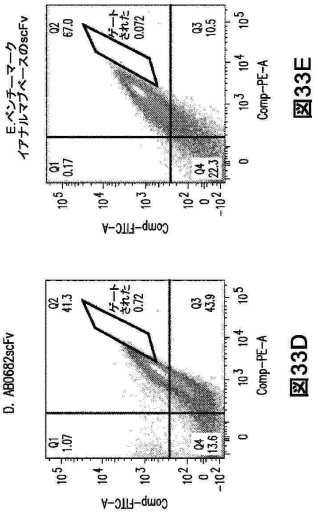


図33D　図33E

【図３４－１】

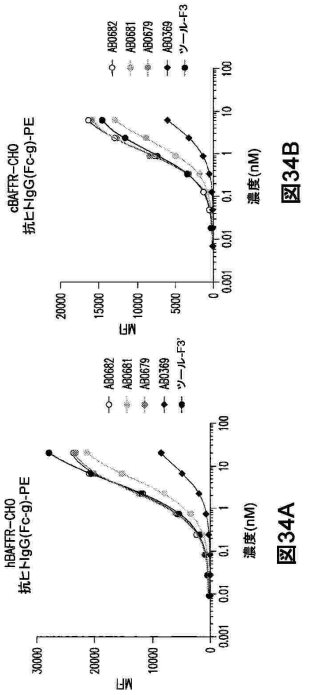


図34A　図34B

【図３４－２】

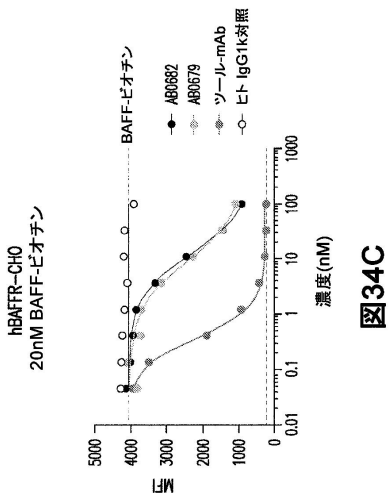


図34C

【図３５】

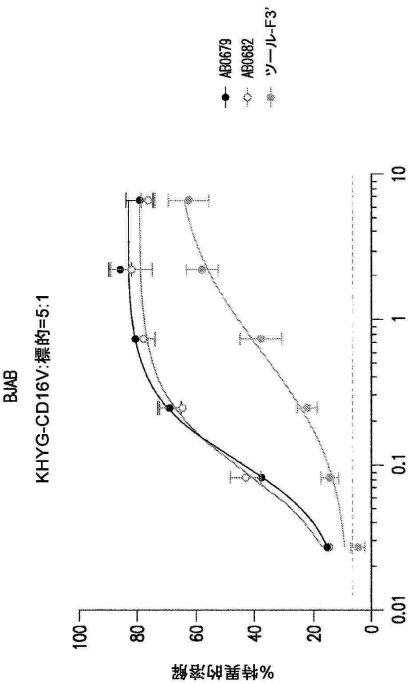


図35

【図３６－１】

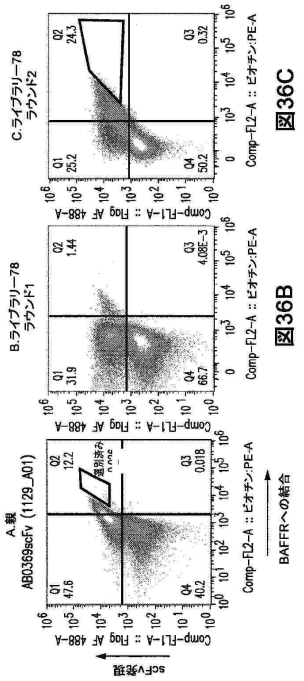


図36A　図36B　図36C

【図３６－２】

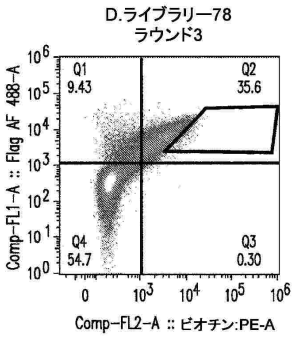


図36D

【図３７－１】

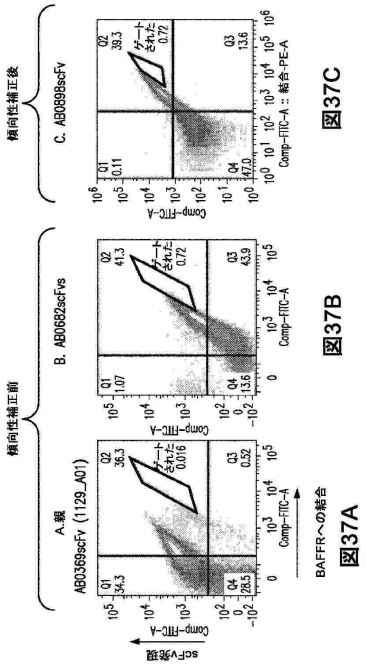


図37A　図37B　図37C

【図３７－２】

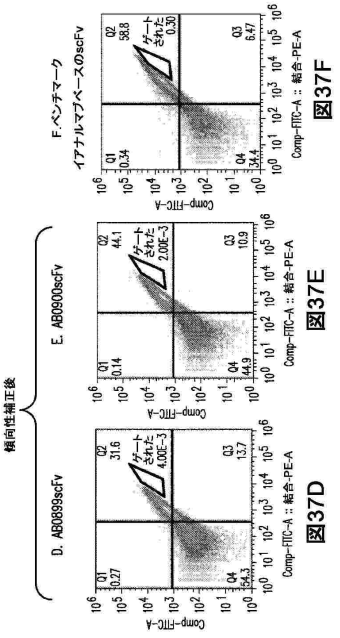


図37D　図37E　図37F

【図３８】

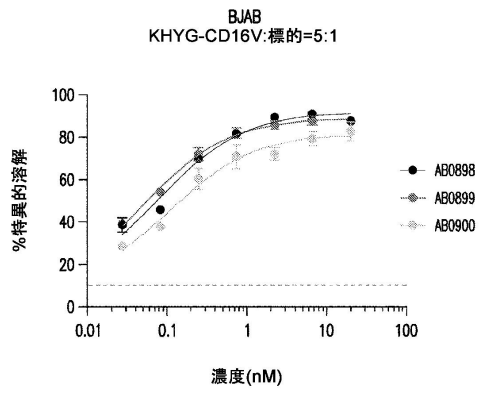
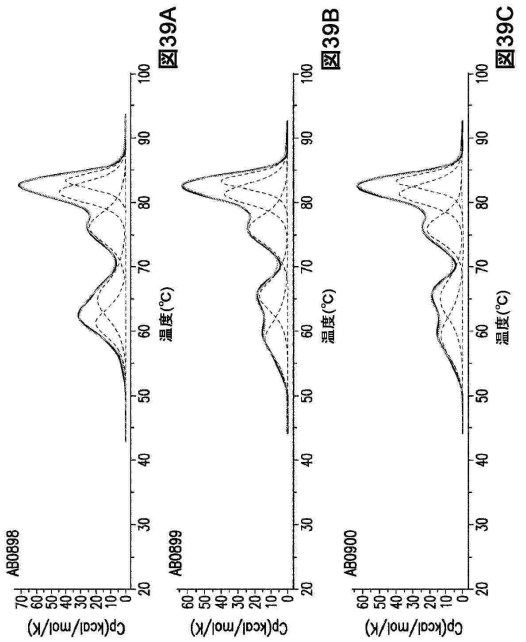


図38

【図３９】



【図４０】

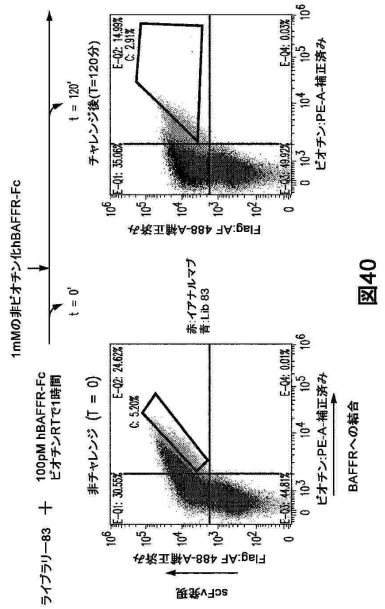


図40

【図４１－１】

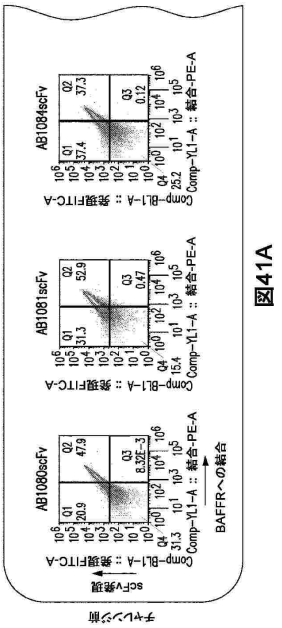


図41A

【図４１－２】

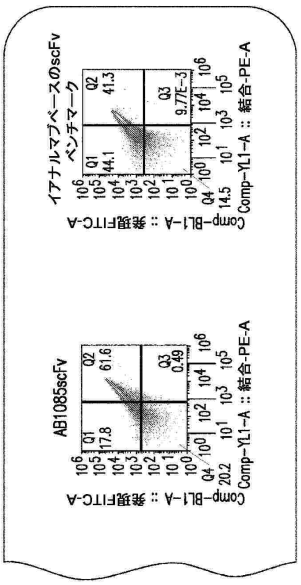


図41A(続き)

【図４１－３】

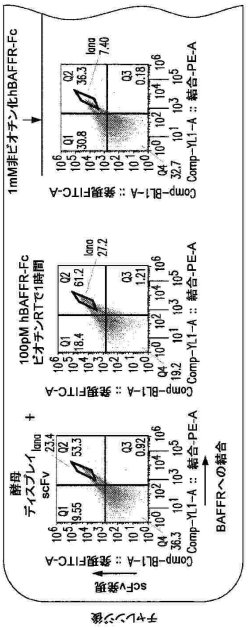


図41B

【図４１－４】

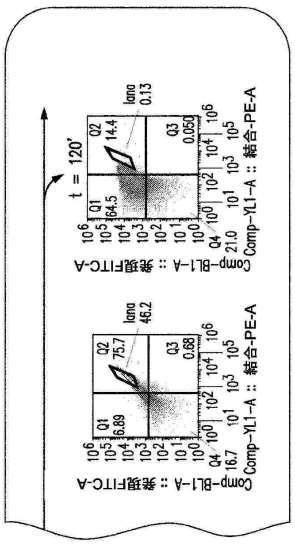


図41B(続き)

【図４２】

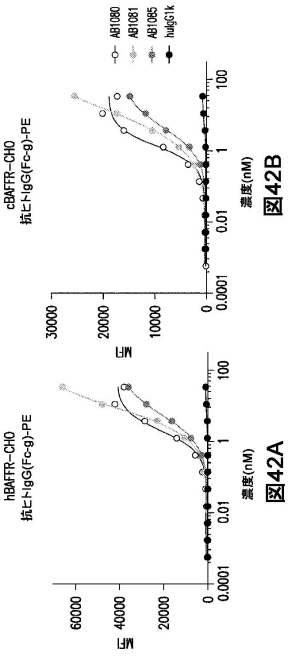


図42B

図42A

【図４３－１】

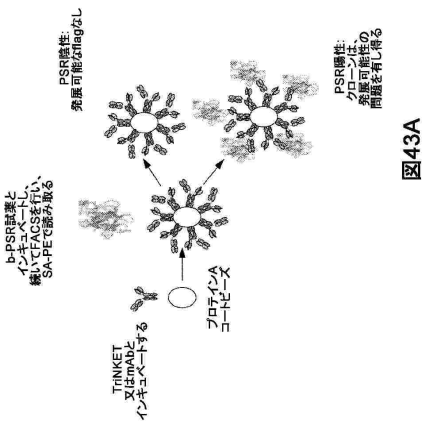


図43A

【図４３－２】

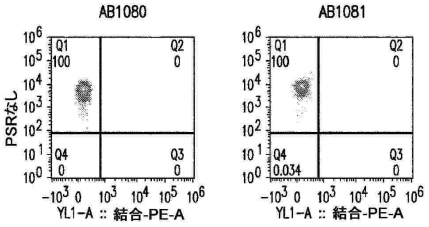


図43B

図43C

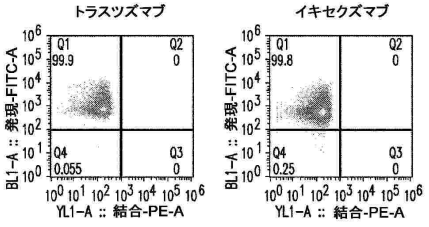


図43D

図43E

【図４３－３】

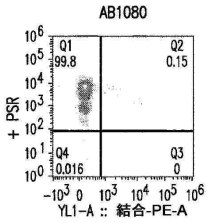


図43F

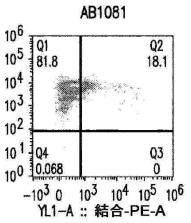


図43G

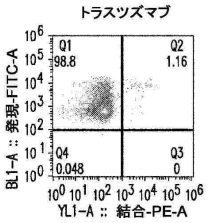


図43H

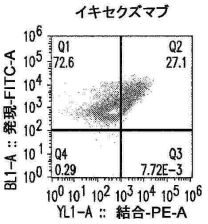


図43I

【図４４】

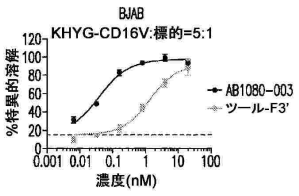


図44A

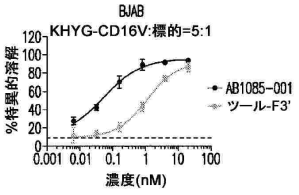


図44B

【図４５】

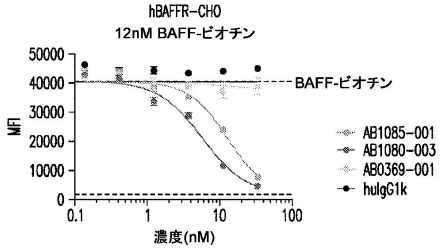


図45

【図４６－１】

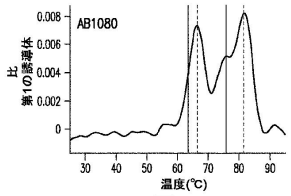


図46A

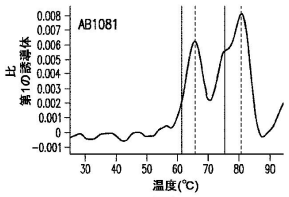


図46B

【図４６－２】

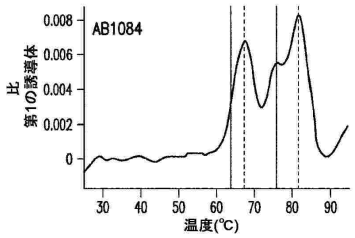


図46C

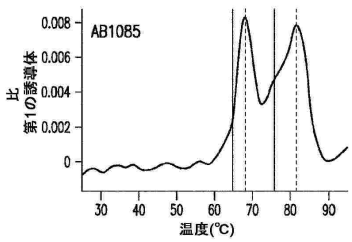


図46D

【図４７】

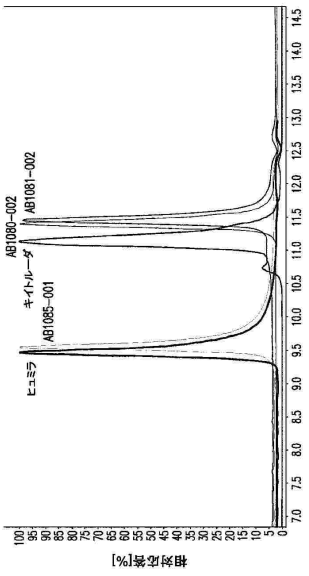


図47

【図４８】

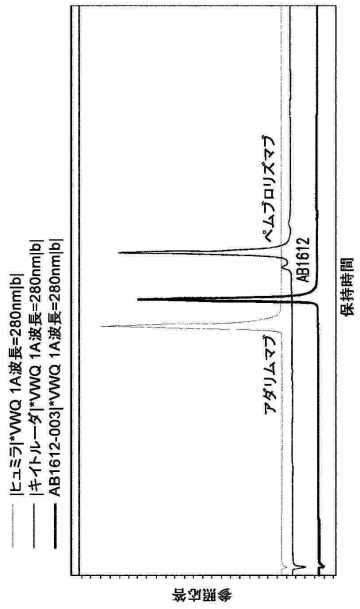


図48

【図４９】

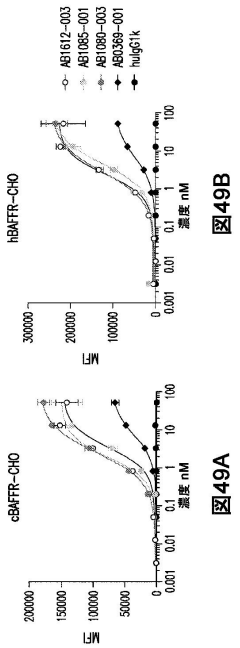


図49B

図49A

【図５０】

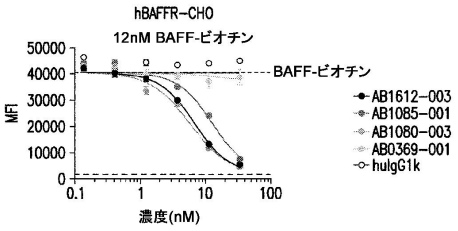


図50

【図５１】

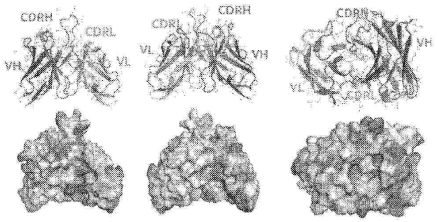


図51A

赤:負に帯電した

図51B

青:正に帯電した

図51C

白:疎水性

【図５２－１】

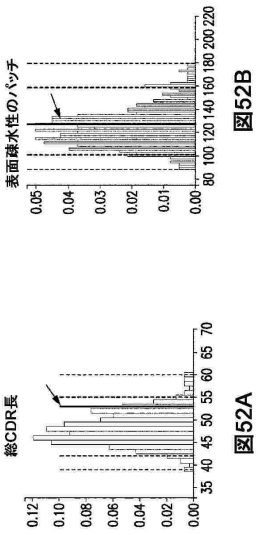


図52A　図52B

【図５２－２】

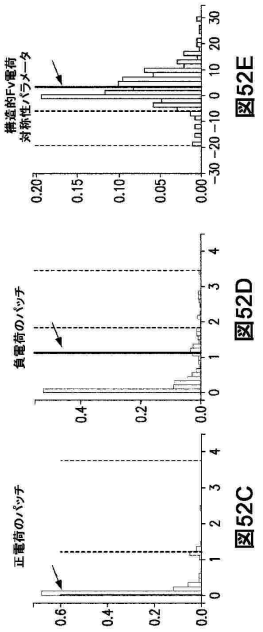


図52C　図52D　図52E

【図５３】

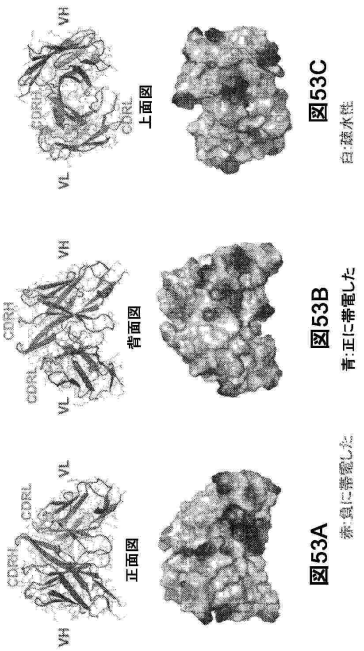


図53A　赤:負に帯電した
図53B　青:正に帯電した
図53C　白:疎水性

【図５４－１】

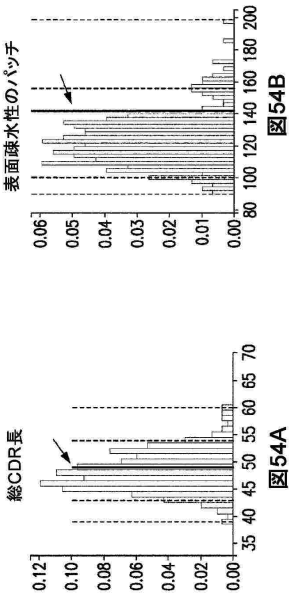


図54A　図54B

【図５４－２】

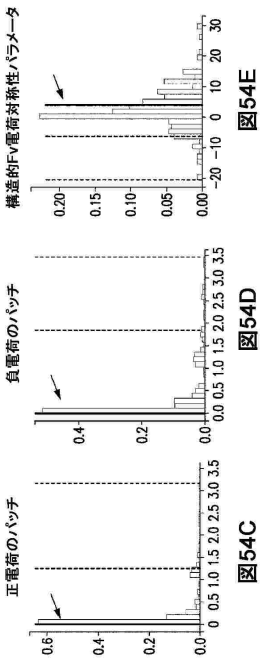


図54C
図54D
図54E

【図５５－１】

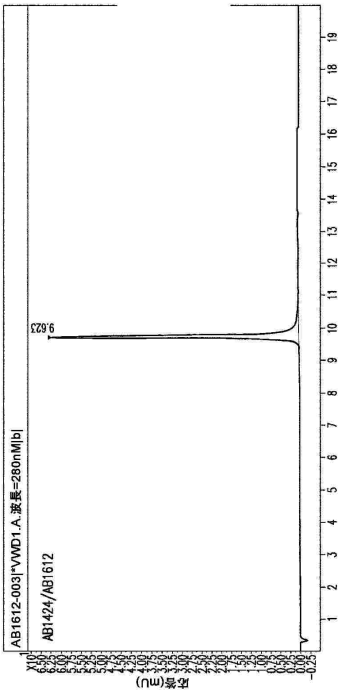


図55A

【図５５－２】

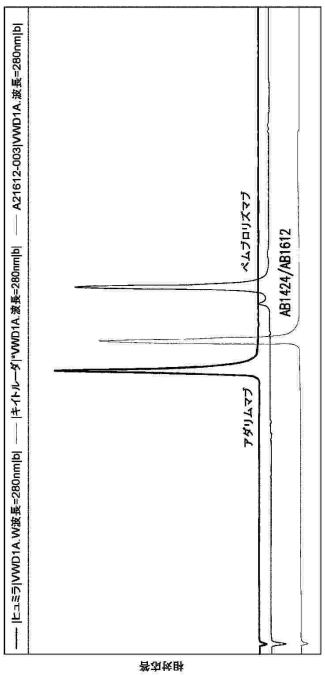


図55B

【図５６】

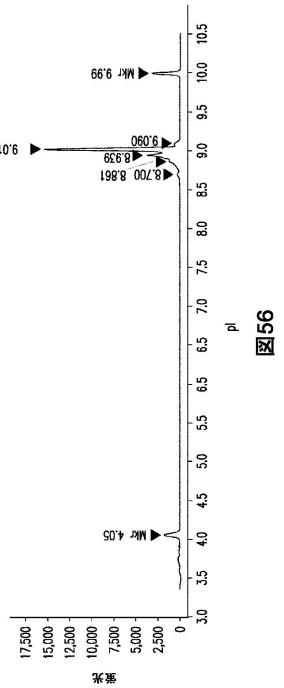


図56

【図５７】

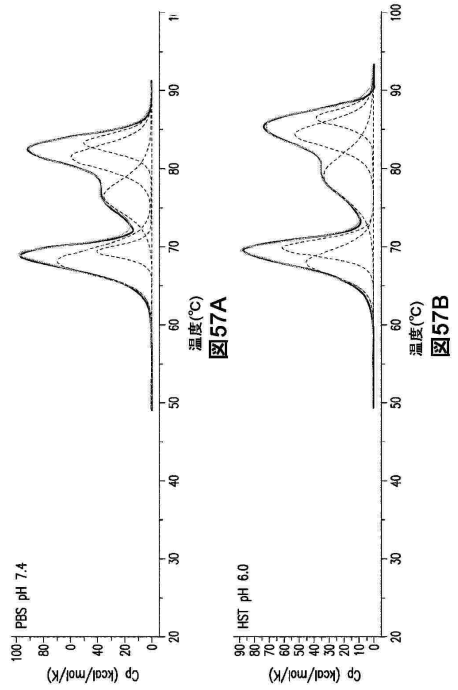


図57A

図57B

【図５８】

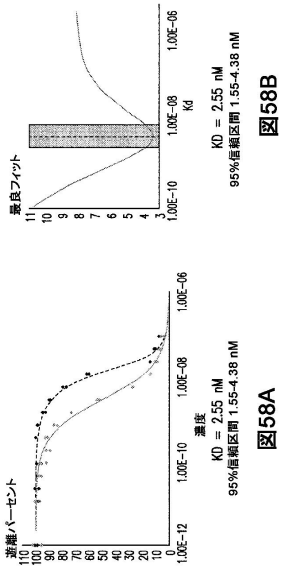


図58B

図58A

【図５９】

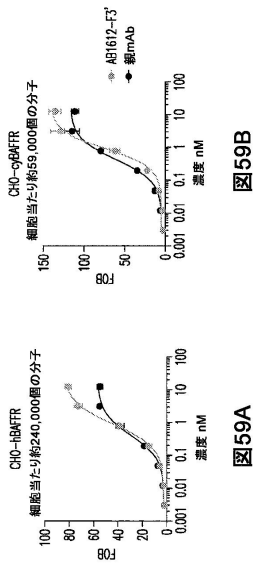


図59B

図59A

【図６０】

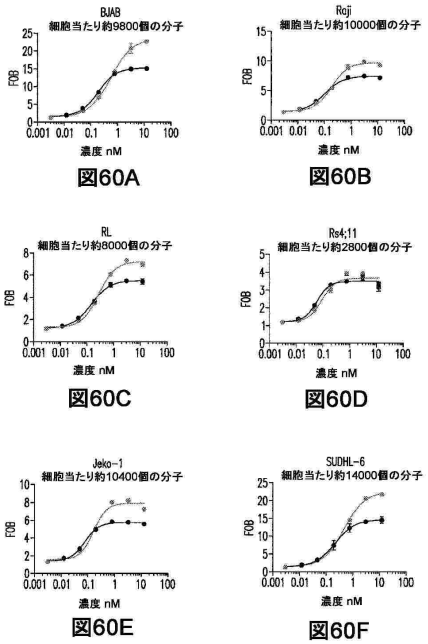


図60A

図60B

図60C

図60D

図60E

図60F

【図６１－１】

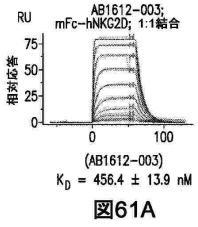


図61A

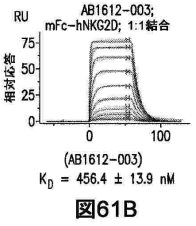


図61B

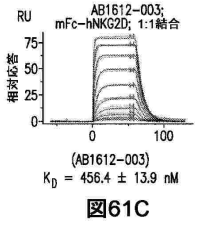


図61C

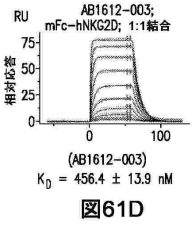


図61D

【図６１－２】

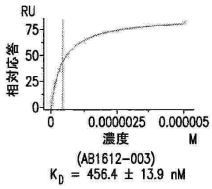


図61E

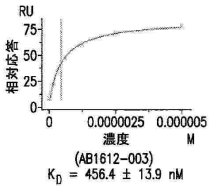


図61F

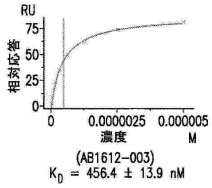


図61G

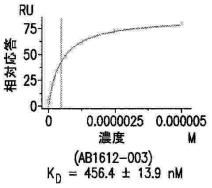


図61H

【図６２－１】

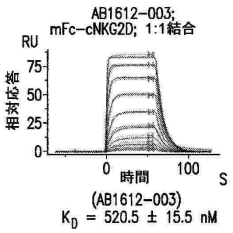


図62A

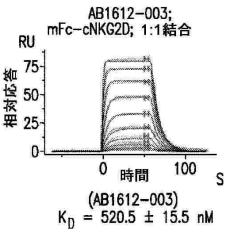


図62B

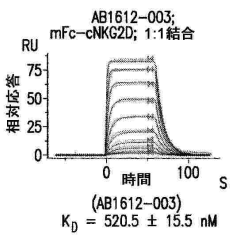


図62C

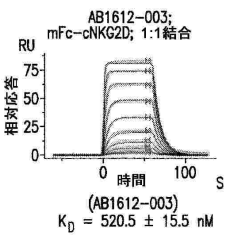


図62D

【図６２－２】

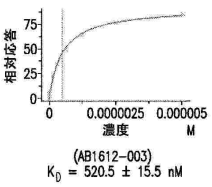


図62E

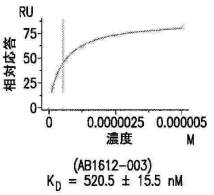


図62F

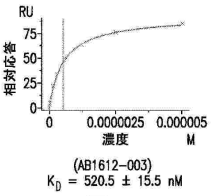


図62G

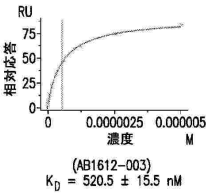


図62H

【図６３－１】

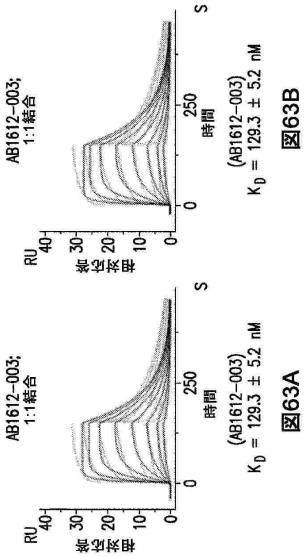


図63A

図63B

【図６３－２】

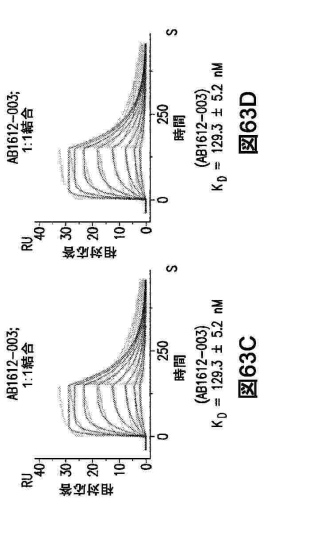


図63C

図63D

【図６３－３】

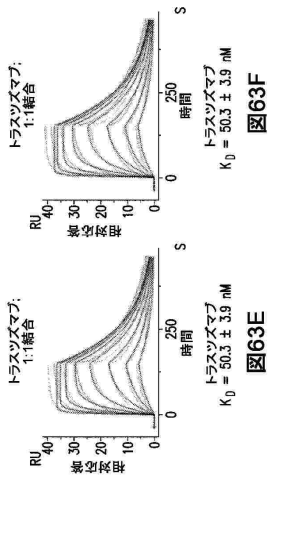


図63E

図63F

【図６３－４】

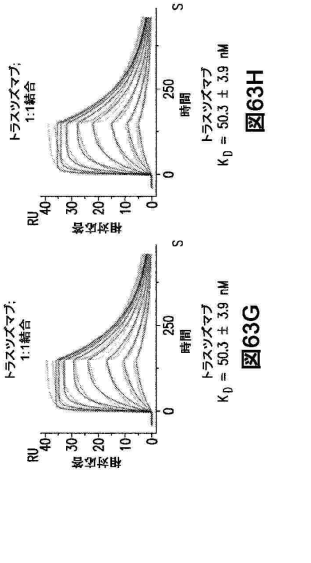


図63G

図63H

【図６４－１】

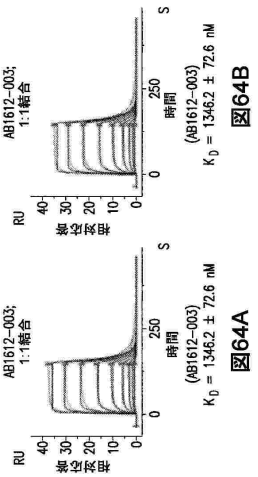


図64A

図64B

【図６４－２】

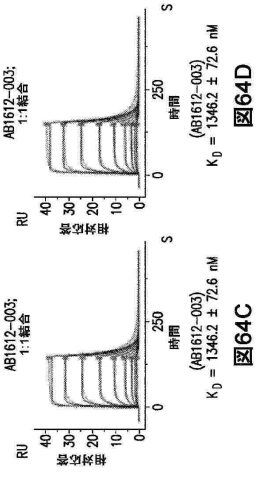


図64C

図64D

【図６４－３】

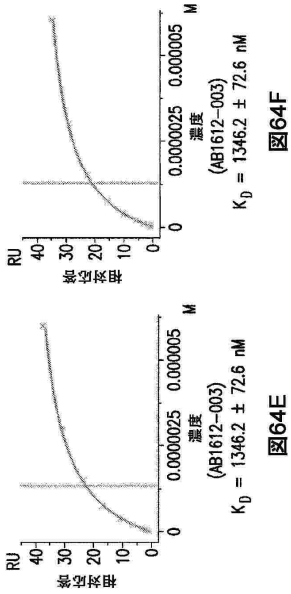


図64E

図64F

【図６４－４】

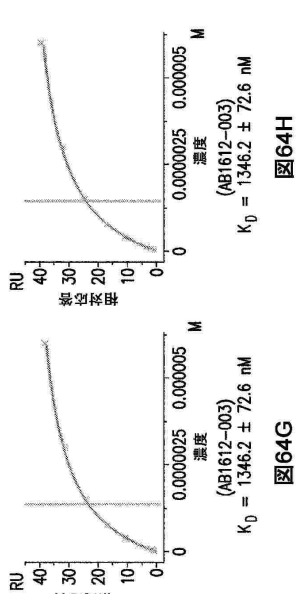


図64G

図64H

【図６４－５】

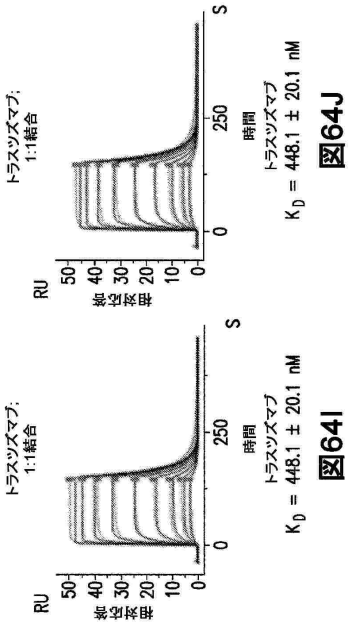


図64J

図64I

【図６４－６】

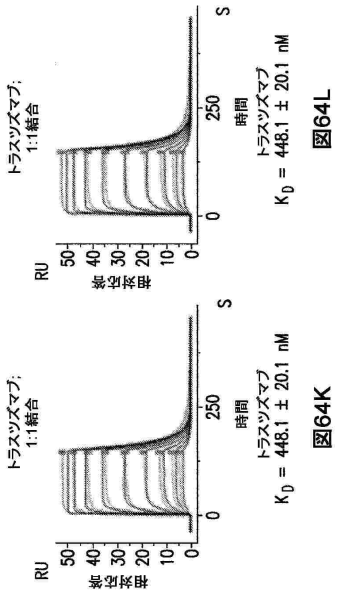


図64L

図64K

【図６４－７】

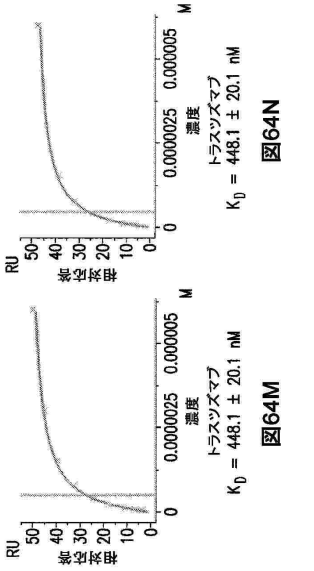


図64N

図64M

【図６４－８】

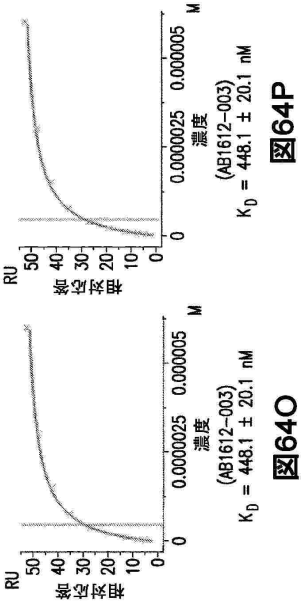


図64P

図64O

【図６５－１】

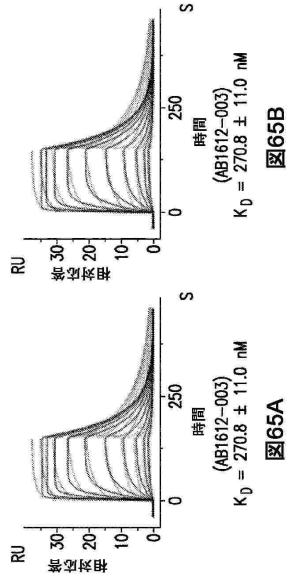


図65A

図65B

【図６５－２】

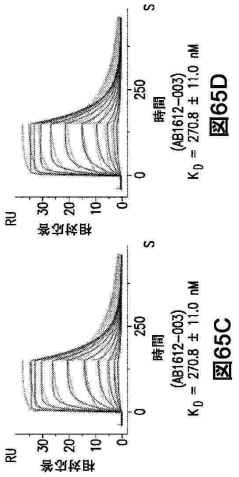


図65C

図65D

【図６５－３】

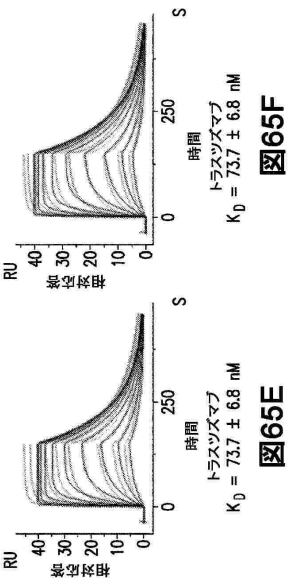


図65E

図65F

【図６５－４】

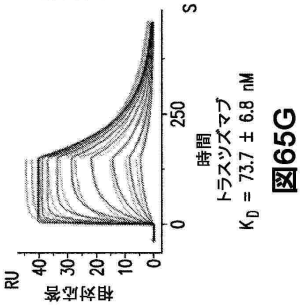


図65G

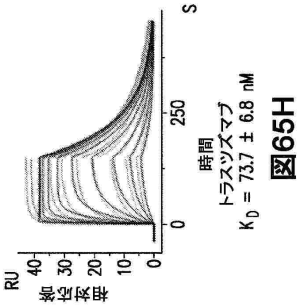


図65H

【図６６】

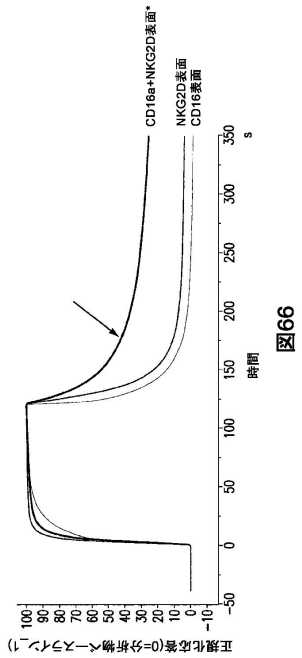


図66

【図６７】

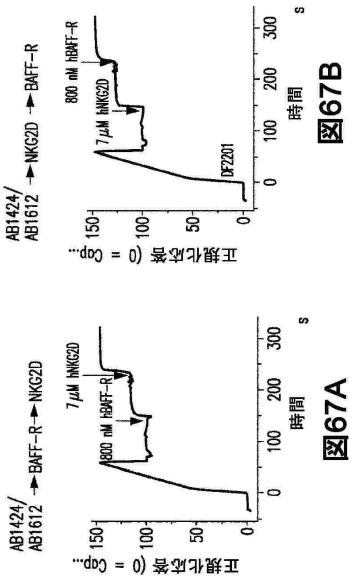


図67A

図67B

【図６８】

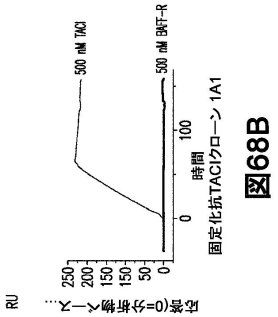


図68B

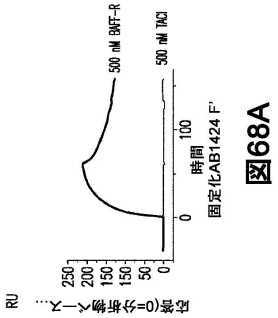


図68A

【図６９】

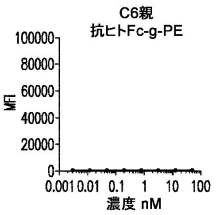


図69A

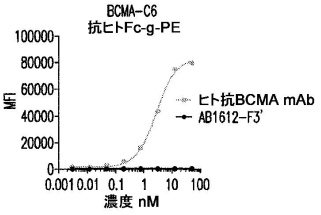


図69B

【図７０】

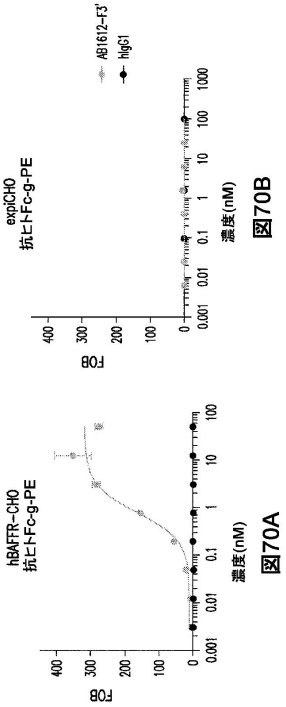


図70A

図70B

【図７１－１】

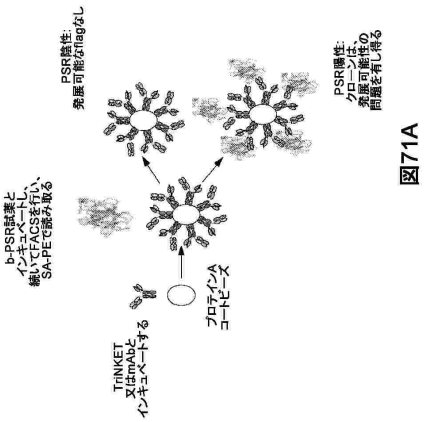


図71A

【図７１－２】

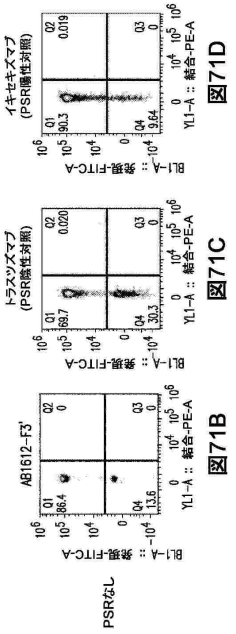


図71B

図71C

図71D

【図７１－３】

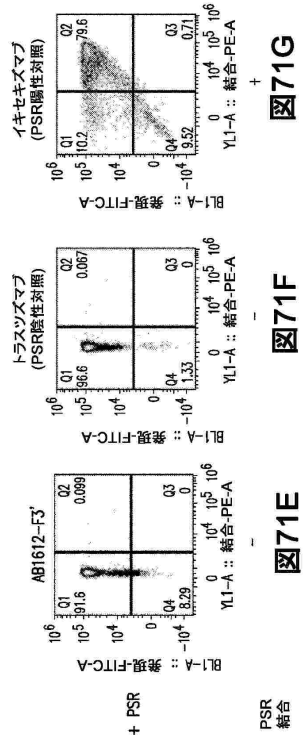


図71E

図71F

図71G

【図７２】

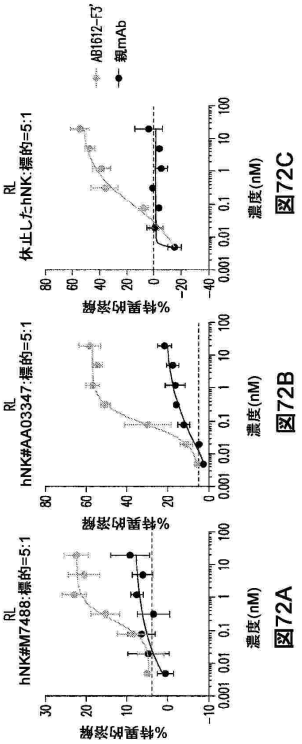


図72A 図72B 図72C

【図７３】

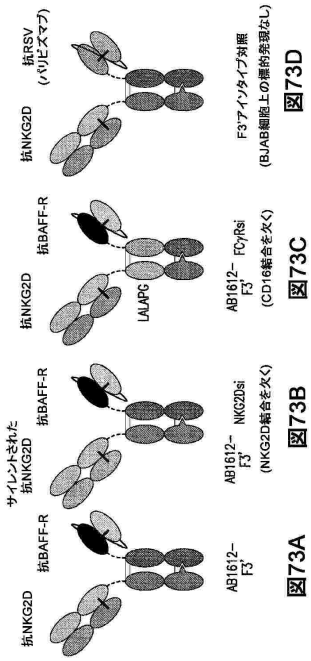


図73A 図73B 図73C 図73D

【図７４】

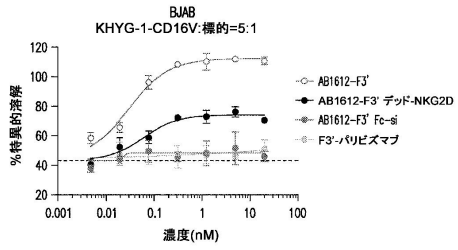


図74

【図７５－１】

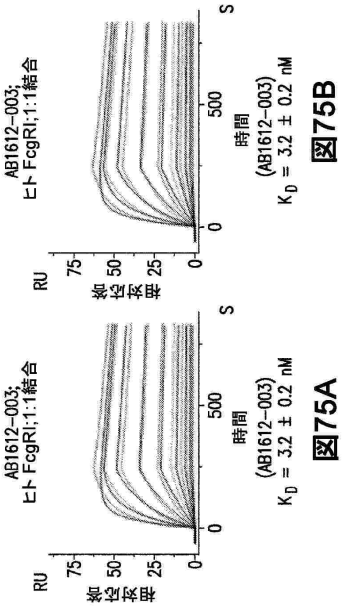


図75A 図75B

【図７５－２】

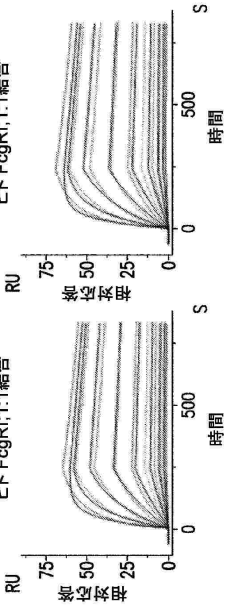


図75C

図75D

【図７５－３】

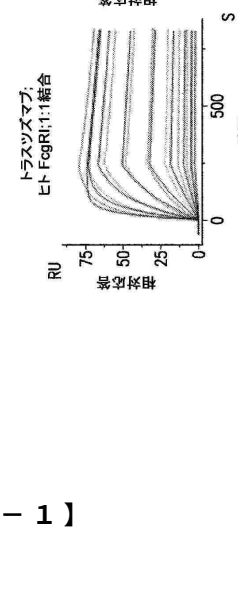


図75E

図75F

【図７５－４】

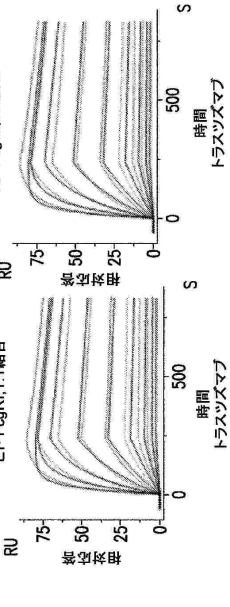


図75G

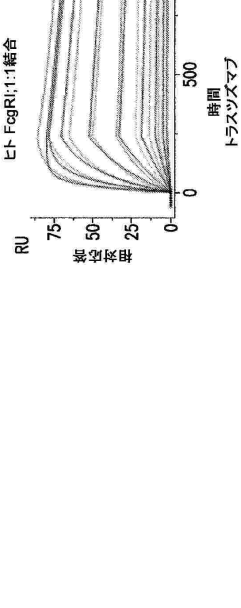


図75H

【図７６－１】

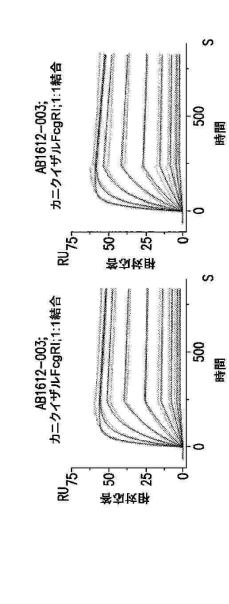


図76A



図76B

【図７６－２】

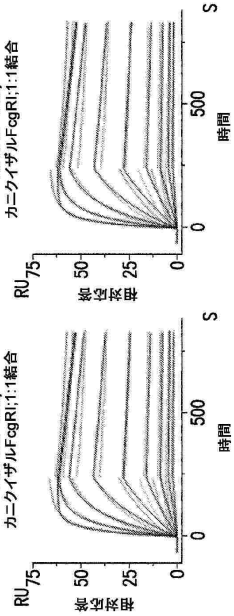


図76C

図76D

【図７６－３】

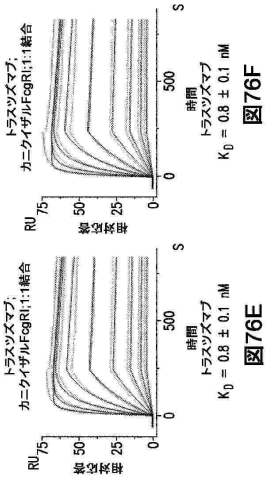


図76E

図76F

【図７６－４】

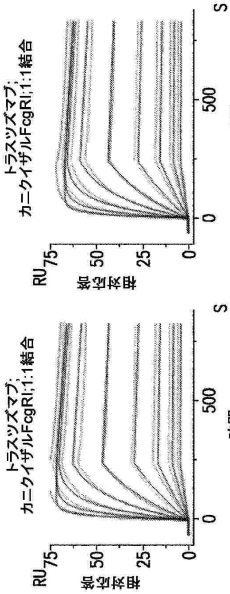


図76G

図76H

【図７７－１】

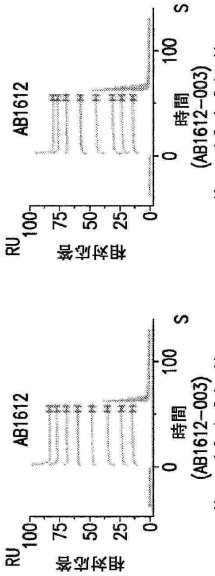


図77A

図77B

【図７７－２】

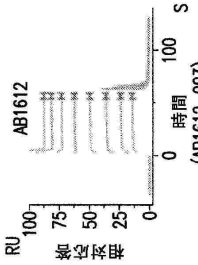


図77D

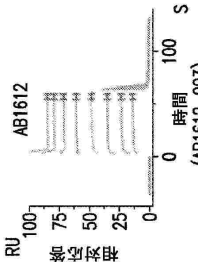


図77C

【図７７－３】

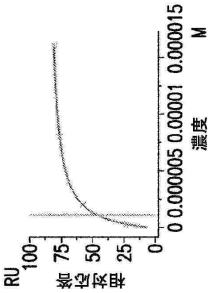


図77F

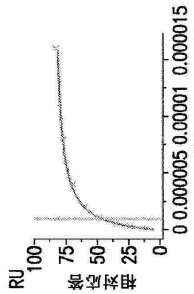


図77E

【図７７－４】

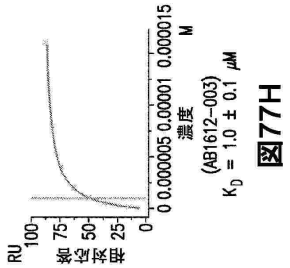


図77H

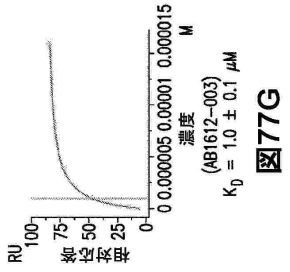


図77G

【図７７－５】

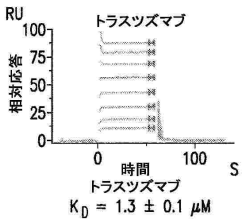


図77I

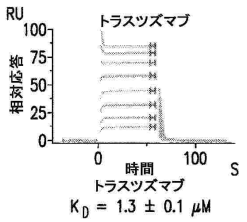


図77J

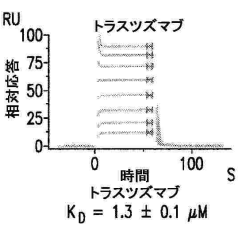


図77K

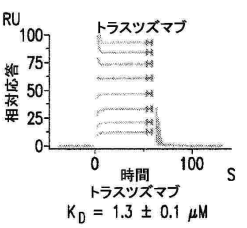


図77L

【図７７－６】

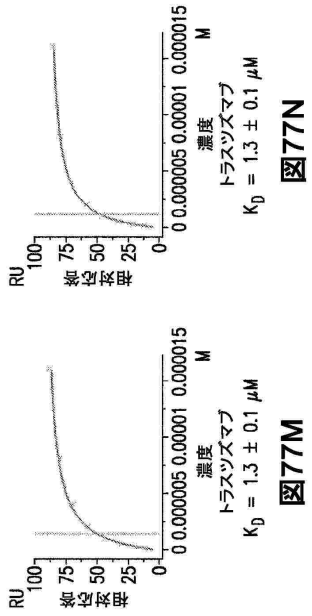


図77N

図77M

【図７７－７】

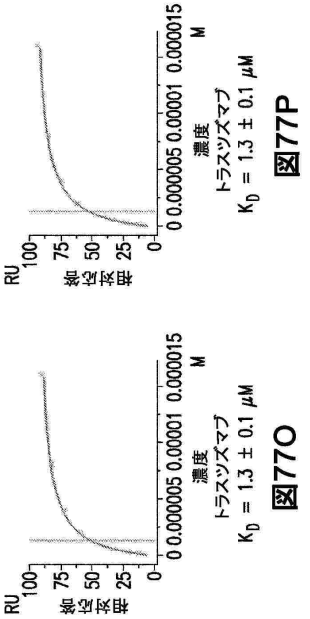


図77P

図77O

【図７８－１】

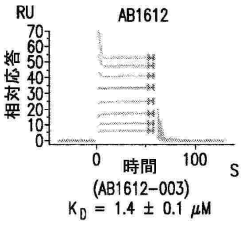


図78A

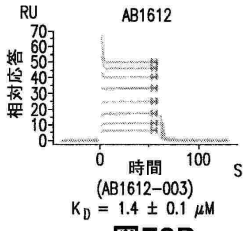


図78B

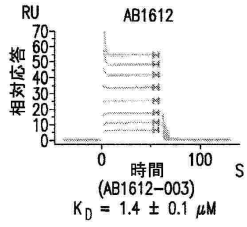


図78C

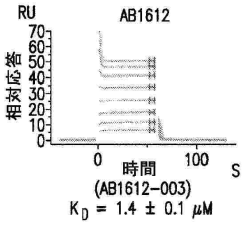


図78D

【図７８－２】

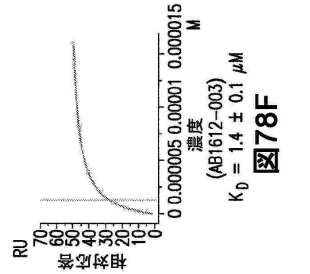


図78F

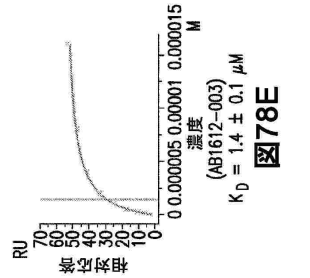


図78E

【図７８－３】

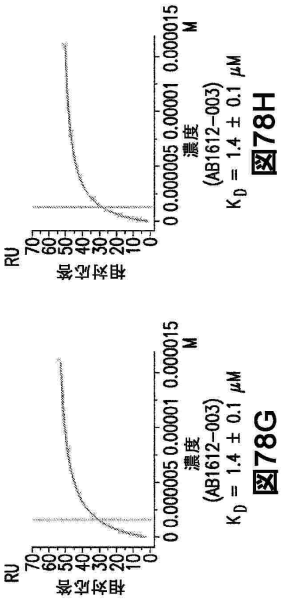


図78H

図78G

【図７８－４】

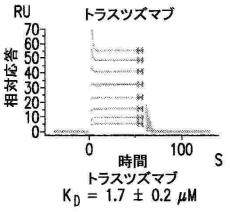


図78I

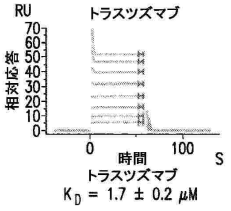


図78J

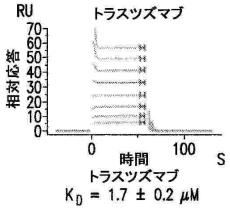


図78K

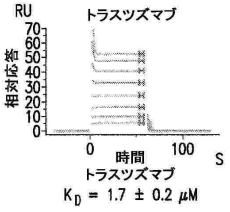


図78L

【図７８－５】

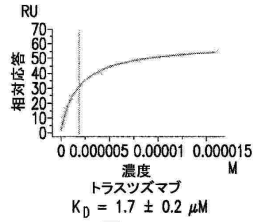


図78M

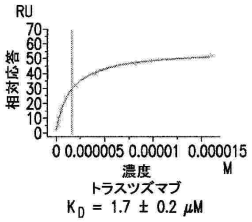


図78N

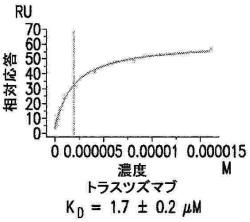


図78O

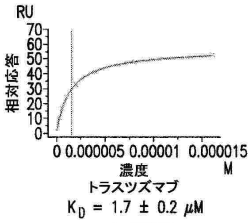


図78P

【図７９－１】

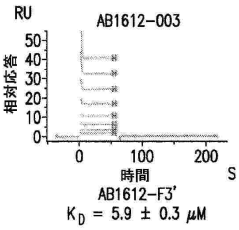


図79A

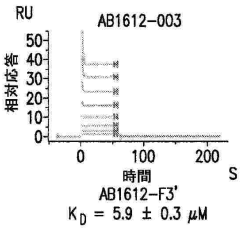


図79B

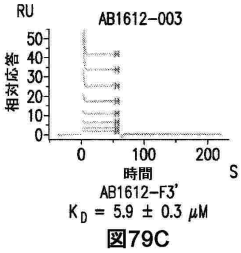


図79C

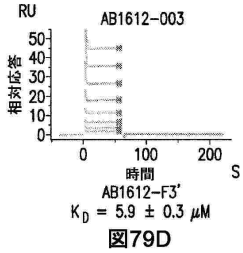


図79D

【図７９－２】

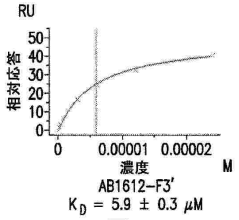


図79E

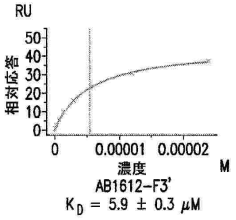


図79F

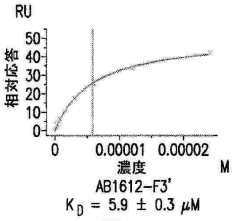


図79G

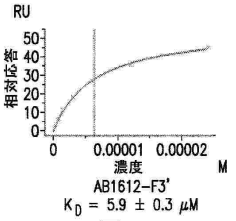


図79H

【図７９－３】

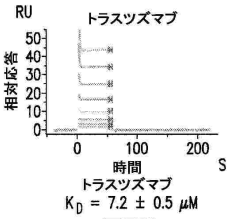


図79I

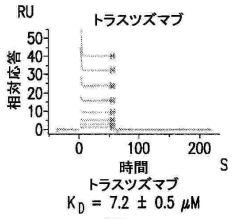


図79J

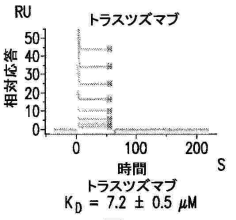


図79K

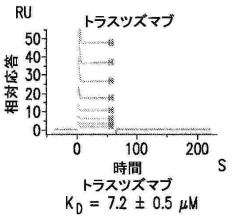


図79L

【図７９－４】

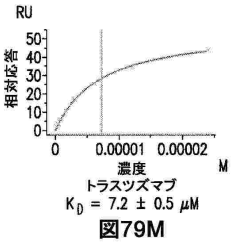


図79M

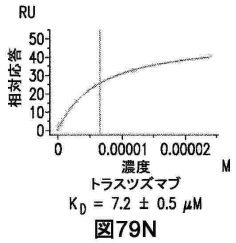


図79N

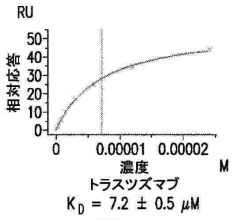


図79O

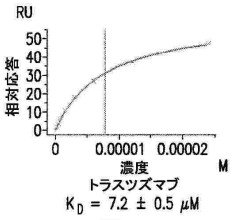


図79P

【図８０－１】

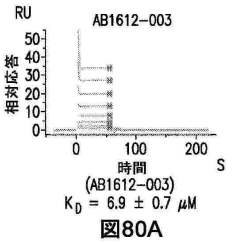


図80A

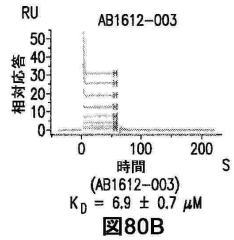


図80B

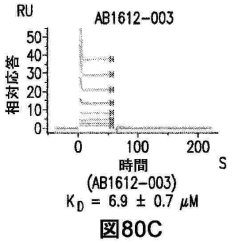


図80C

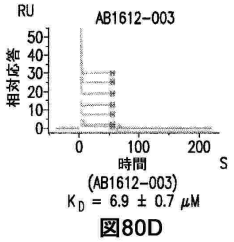


図80D

【図８０－２】

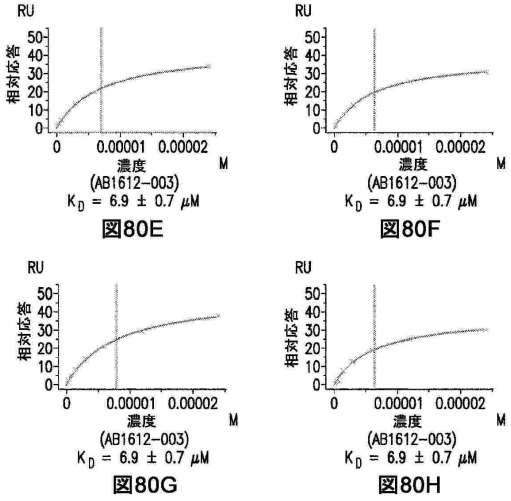


図80E　図80F

図80G　図80H

【図８０－３】

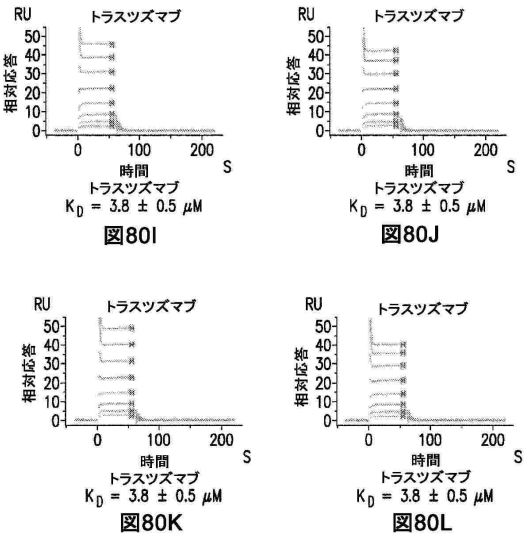


図80I　図80J

図80K　図80L

【図８０－４】

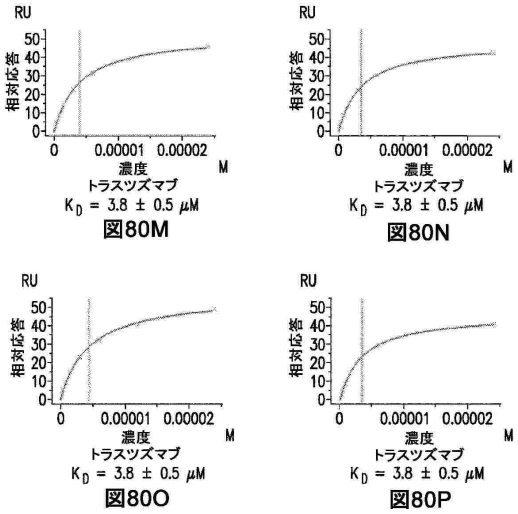


図80M　図80N

図80O　図80P

【図８１－１】

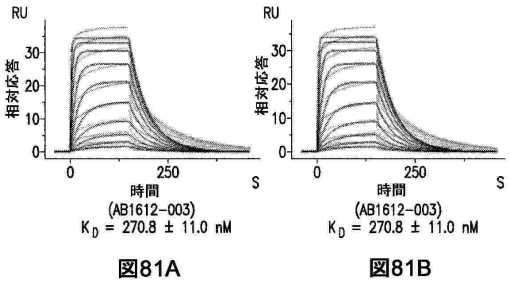


図81A　図81B

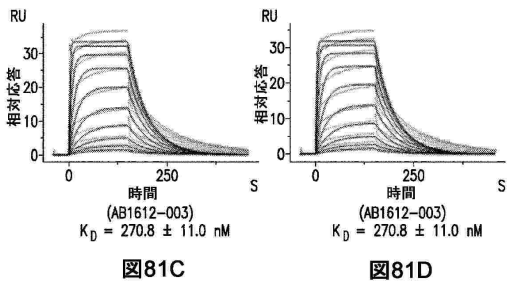


図81C　図81D

【図８１－２】

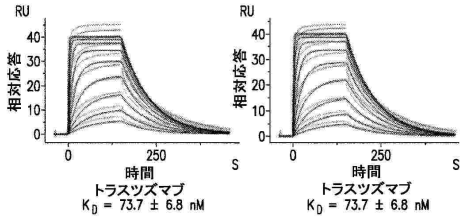


図81E

図81F

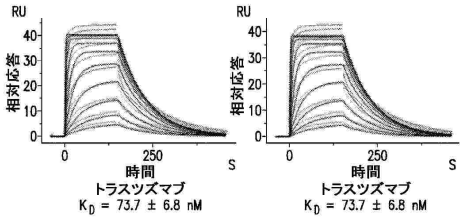


図81G

図81H

【図８２－１】

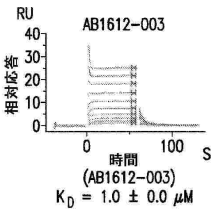


図82A

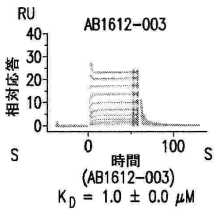


図82B

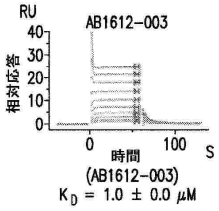


図82C

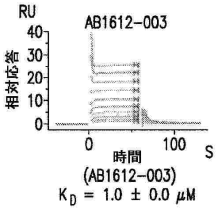


図82D

【図８２－２】

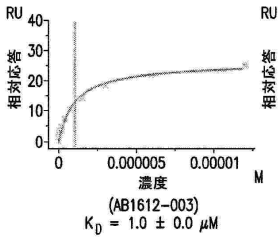


図82E

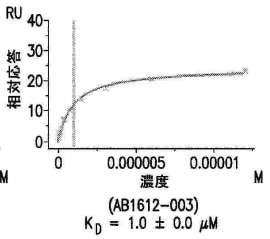


図82F

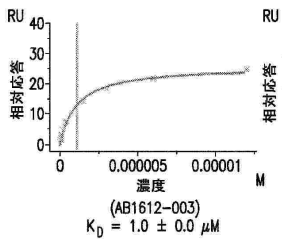


図82G

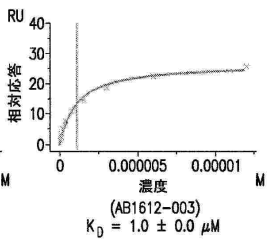


図82H

【図８２－３】

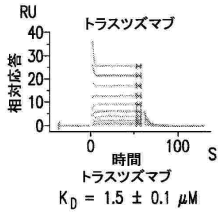


図82I

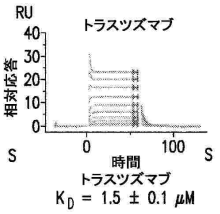


図82J

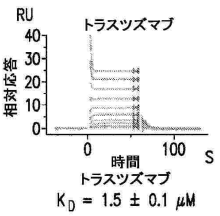


図82K

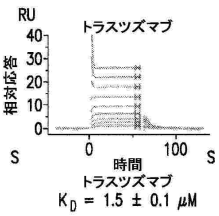


図82L

【図８２－４】

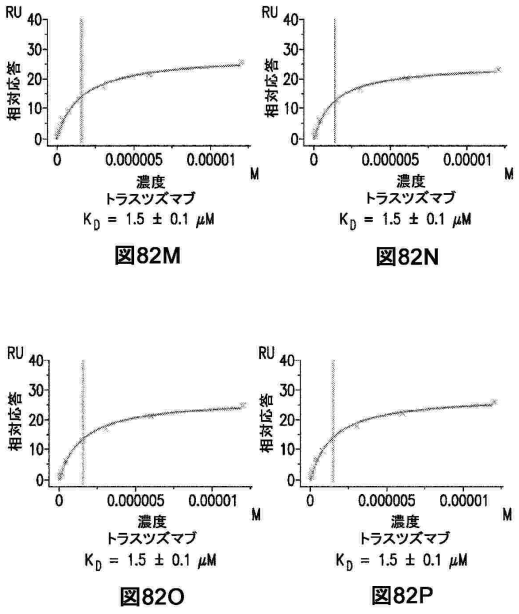


図82M　図82N

図82O　図82P

【図８３－１】

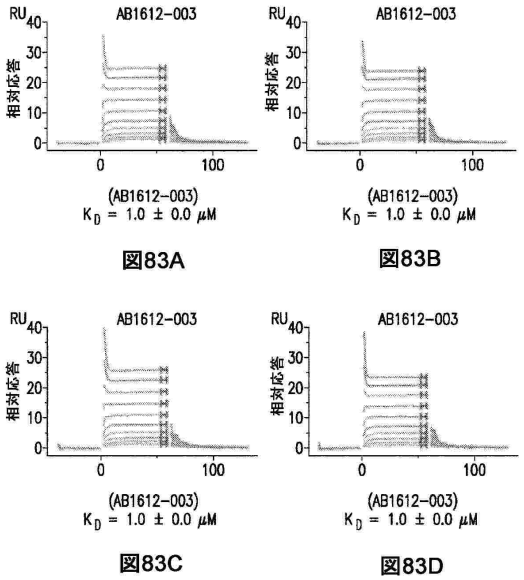


図83A　図83B

図83C　図83D

【図８３－２】

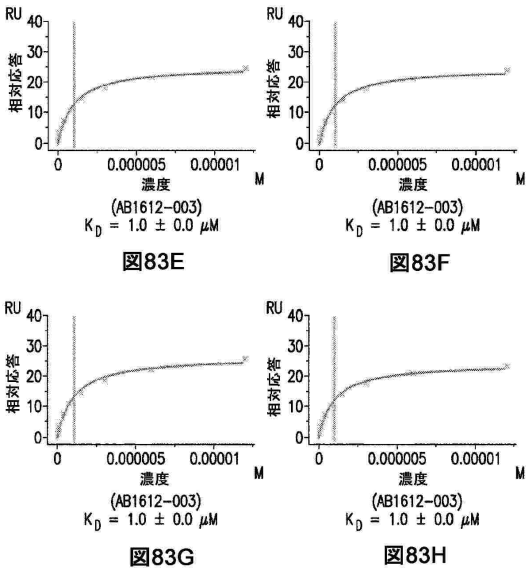


図83E　図83F

図83G　図83H

【図８３－３】

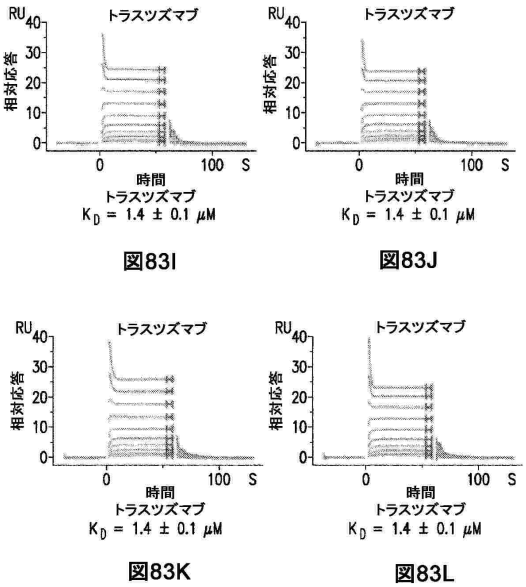


図83I　図83J

図83K　図83L

【図８３－４】

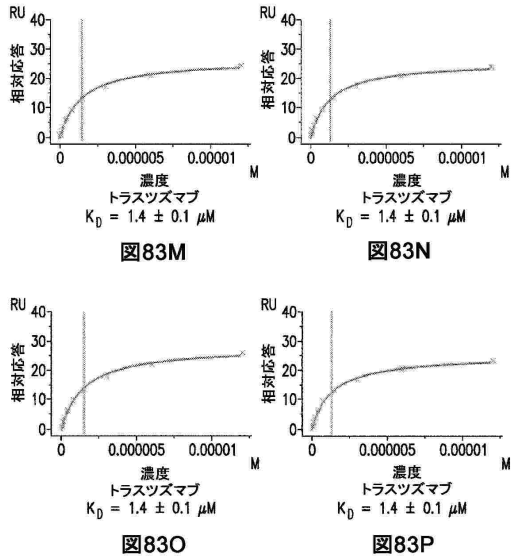


図83M　図83N

図83O　図83P

【図８４－１】

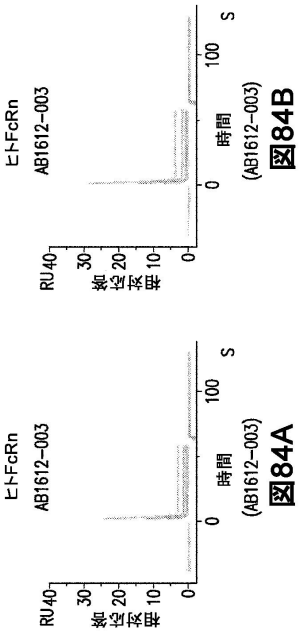


図84B　図84A

【図８４－２】

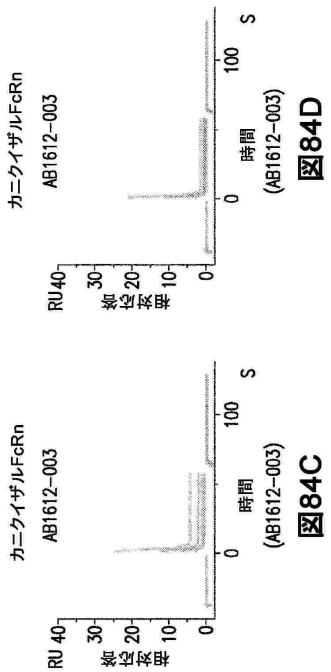


図84D　図84C

【図８４－３】

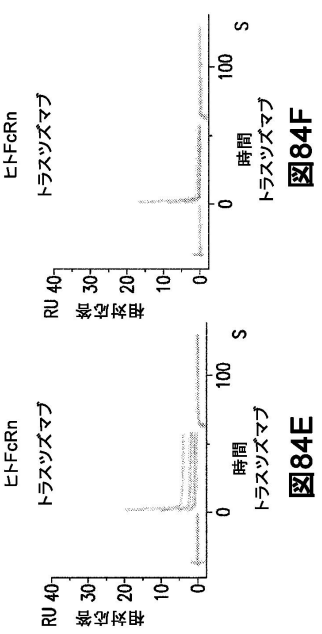
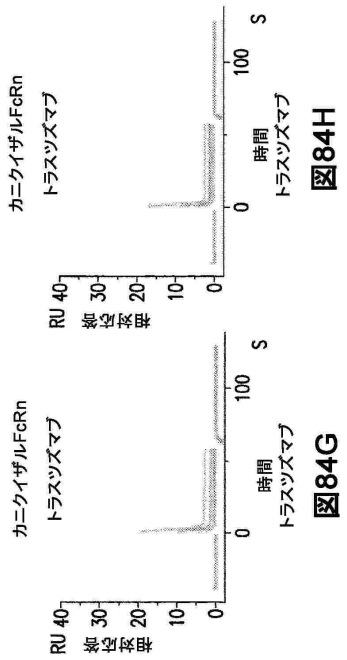


図84F　図84E

【図８４－４】



【図８５】

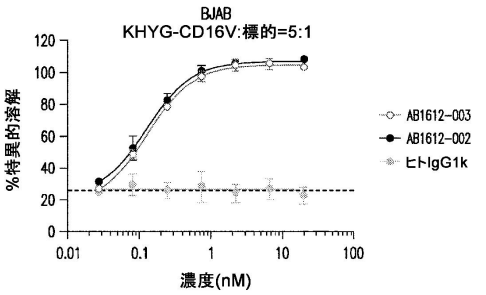


図85

【図８６－１】

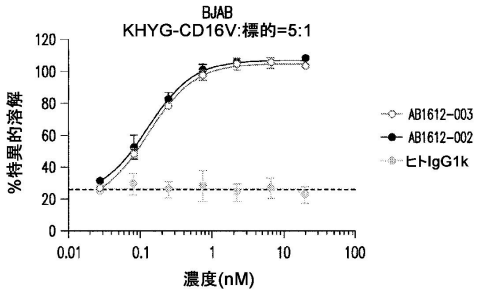


図86A

【図８６－２】

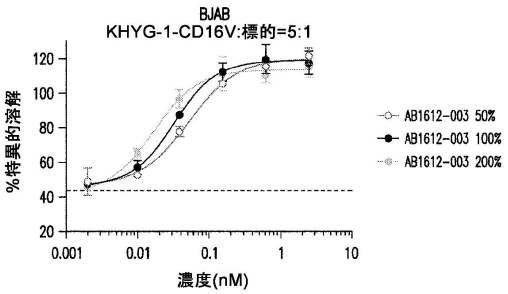


図86B

【図８７】

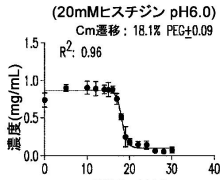


図87A

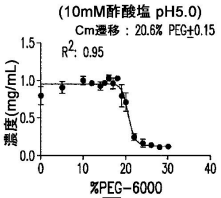


図87B

【図８８】

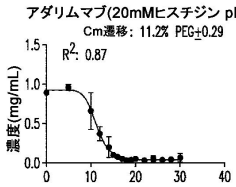


図88A

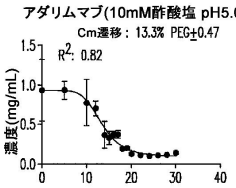


図88B

【図８９】

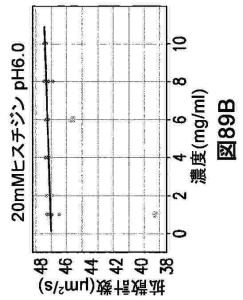


図89B

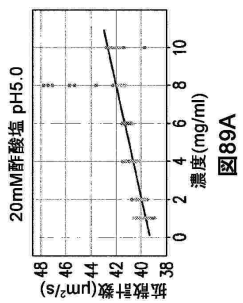


図89A

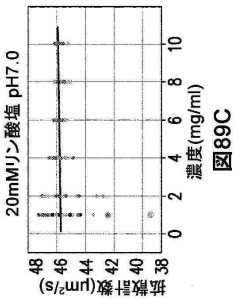


図89C

【図９０】

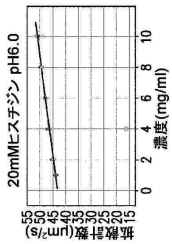


図90B

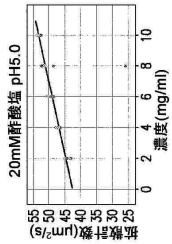


図90A

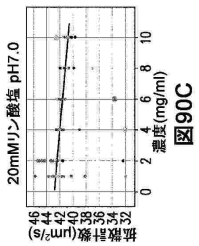


図90C

【図９１】

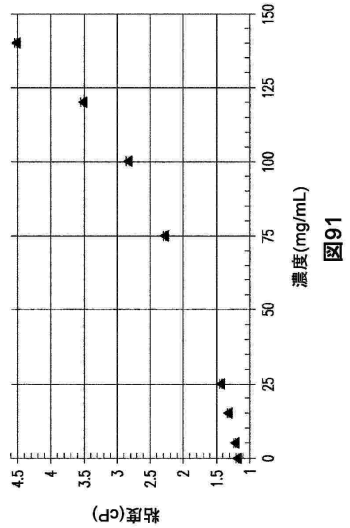


図91

【図９２】

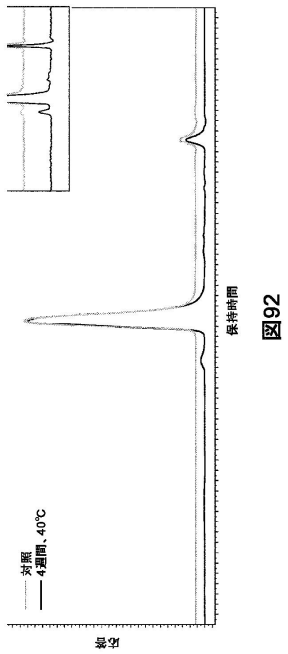


図92

【図９３】

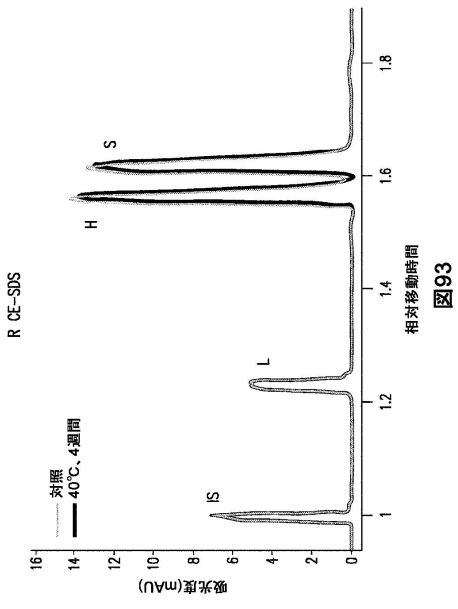


図93

【図９４】

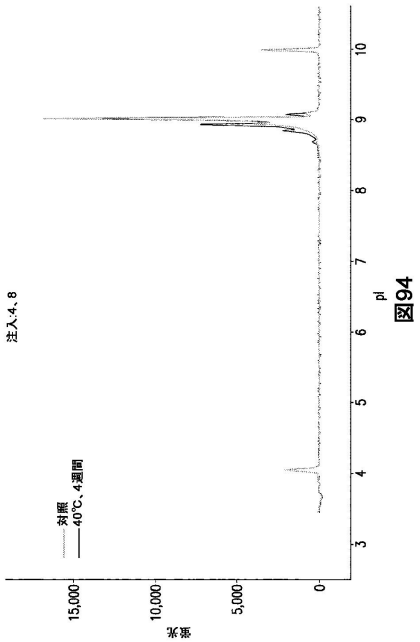


図94

【図９５－１】

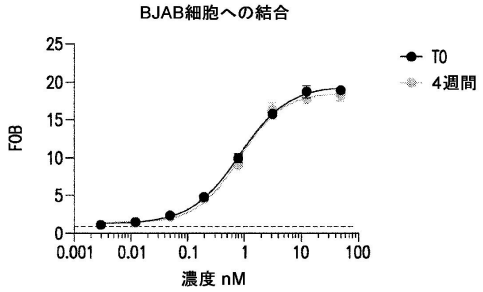


図95A

【図９５－２】

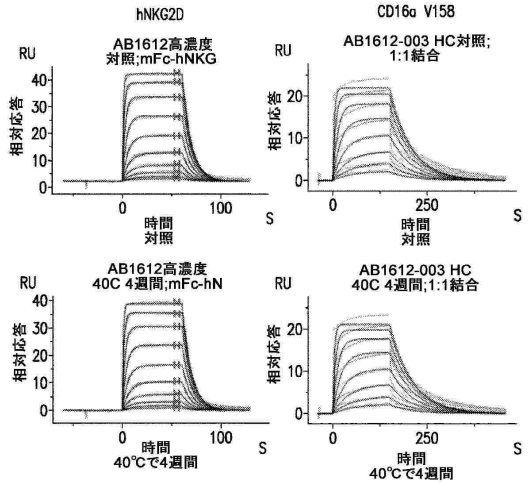


図95B

図95C

【図９６】

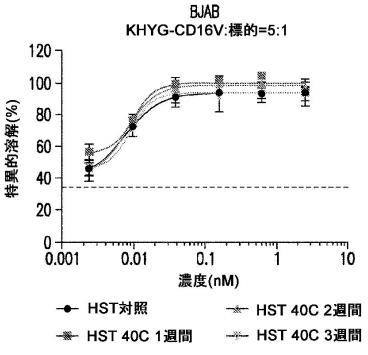


図96

【図９７】

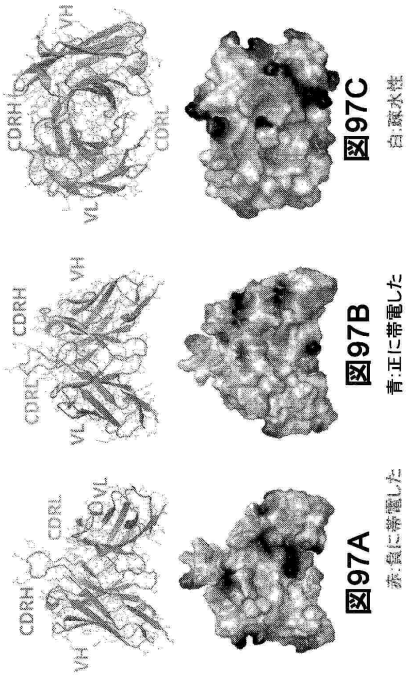


図97C

図97B

図97A

【図９８－１】

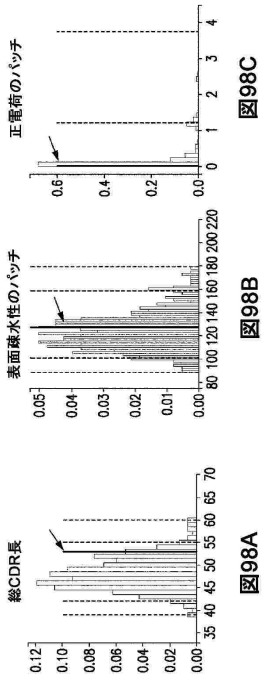


図98A　図98B　図98C

【図９８－２】

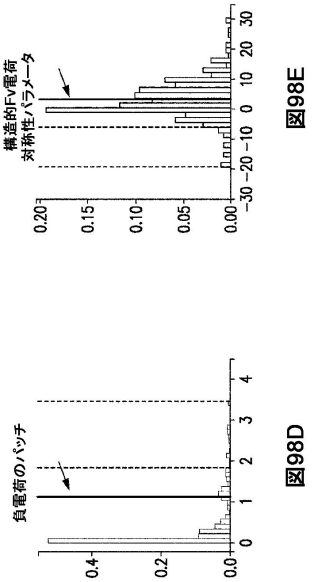


図98D　図98E

【図９９】

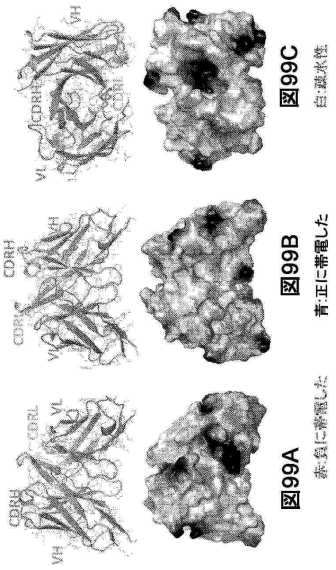


図99A　赤：負に帯電した
図99B　青：正に帯電した
図99C　白：疎水性

【図１００－１】

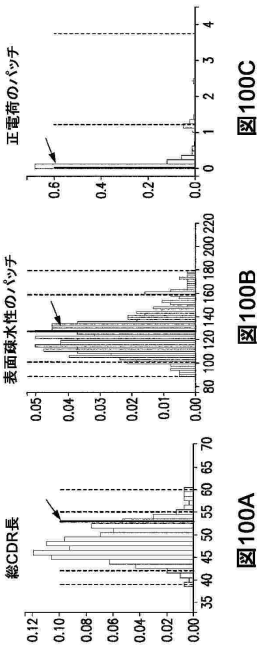


図100A　図100B　図100C

【図１００－２】

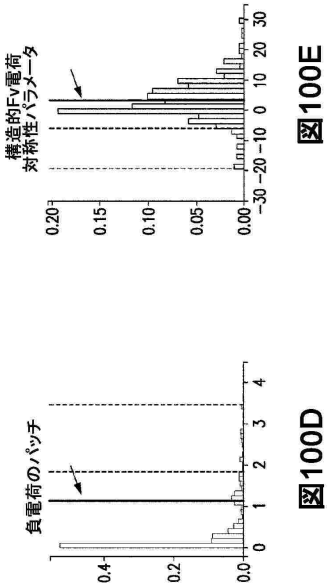


図100E

図100D

【図１０１】

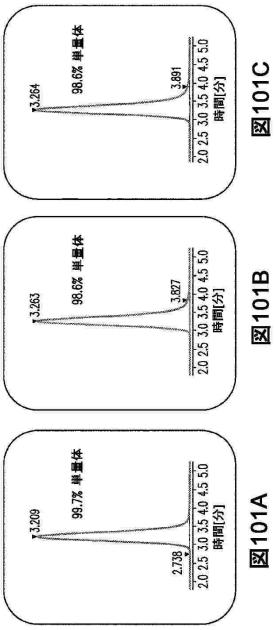


図101C

図101B

図101A

【図１０２】

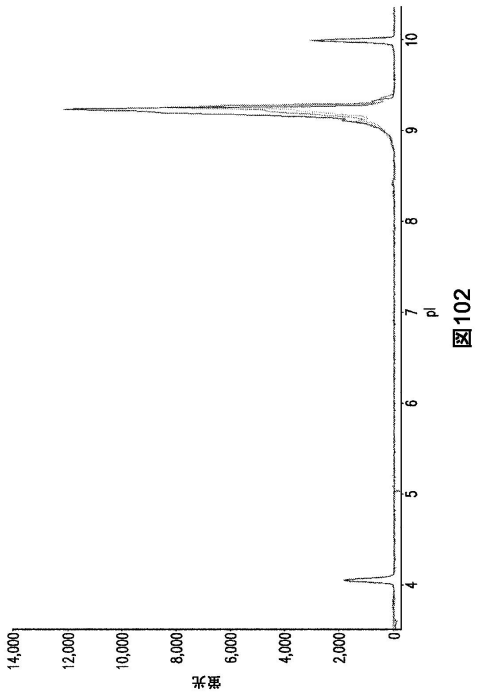


図102

【図１０３－１】

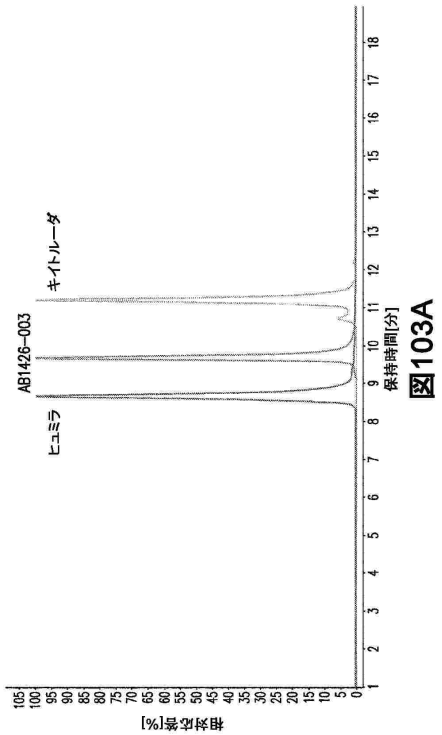


図103A

【図１０３－２】

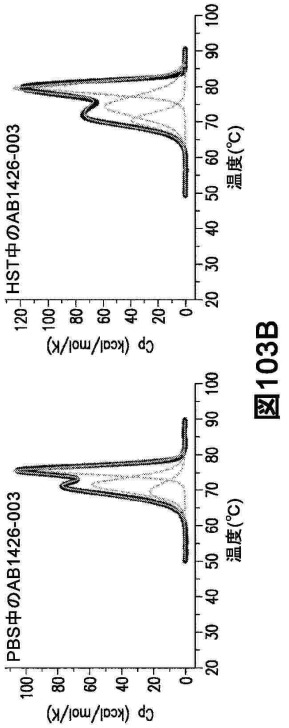


図103B

【図１０４】

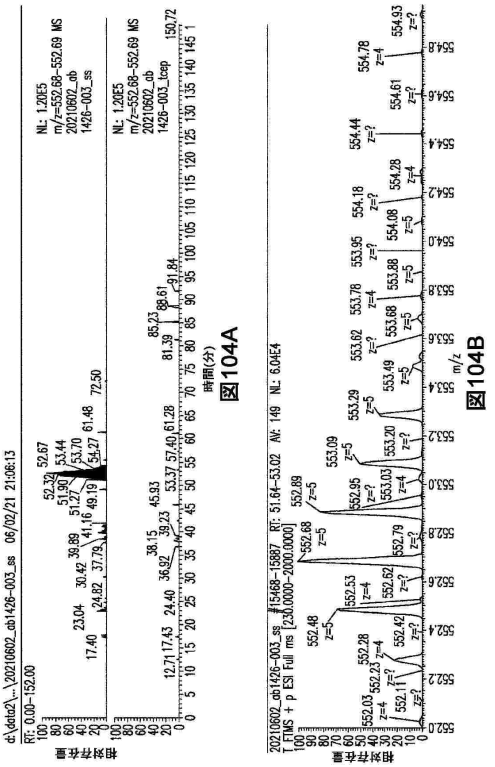


図104A

図104B

【図１０５－１】

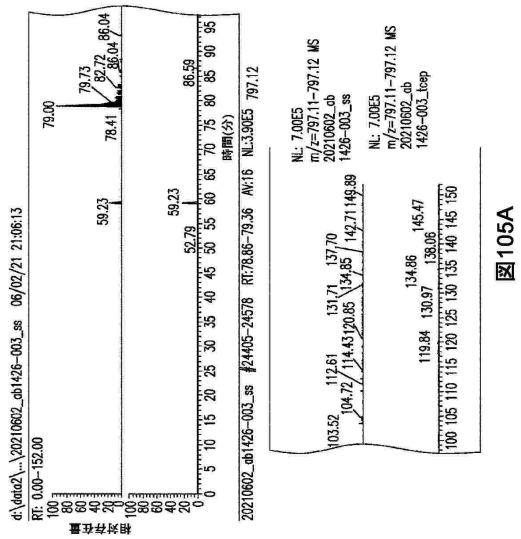


図105A

【図１０５－２】

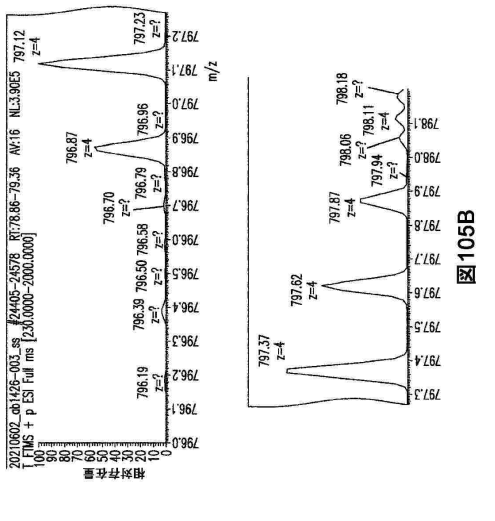


図105B

【図１０６】

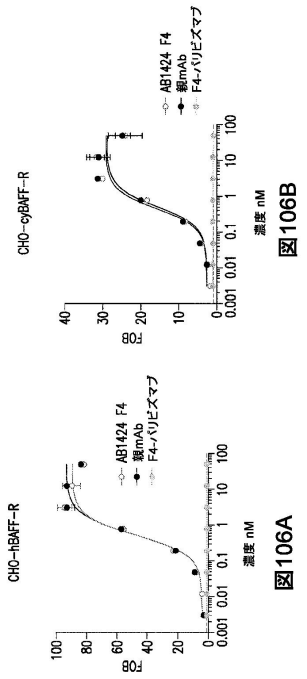


図106B

図106A

【図１０７－１】

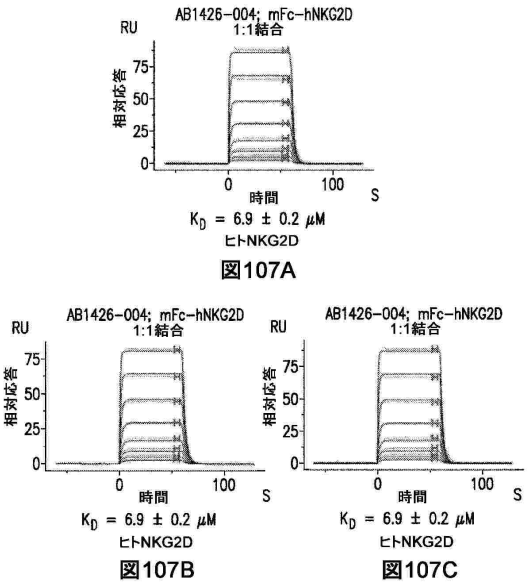


図107A

図107B

図107C

【図１０７－２】

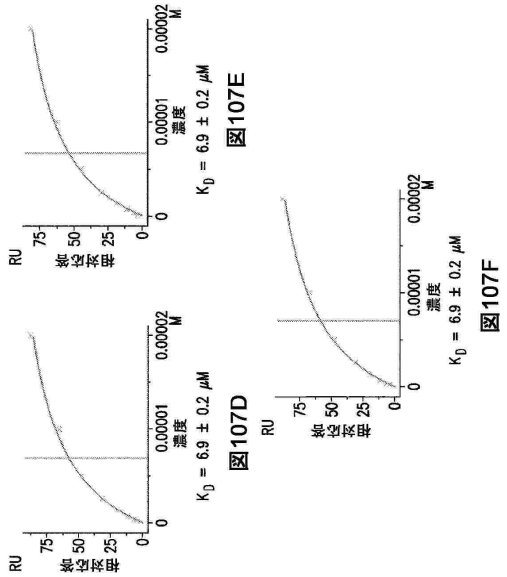


図107D

図107E

図107F

【図１０７－３】

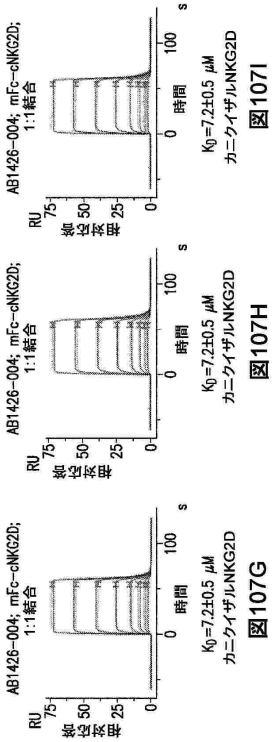


図107I

図107H

図107G

【図１０７－４】

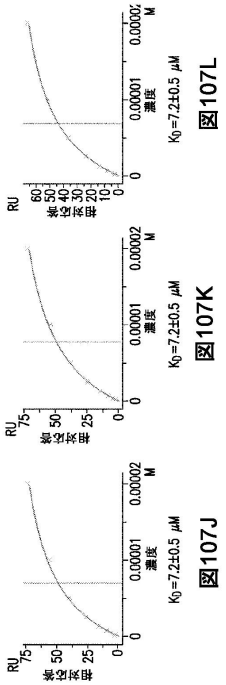


図107L

図107K

図107J

【図１０８－１】

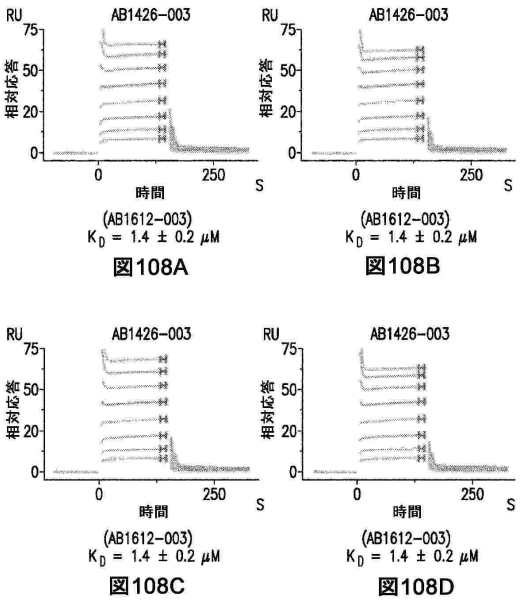


図108A

図108B

図108C

図108D

【図１０８－２】

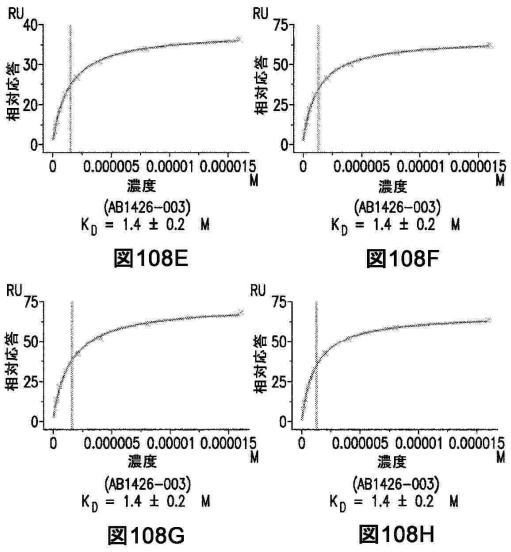


図108E

図108F

図108G

図108H

【図１０８－３】

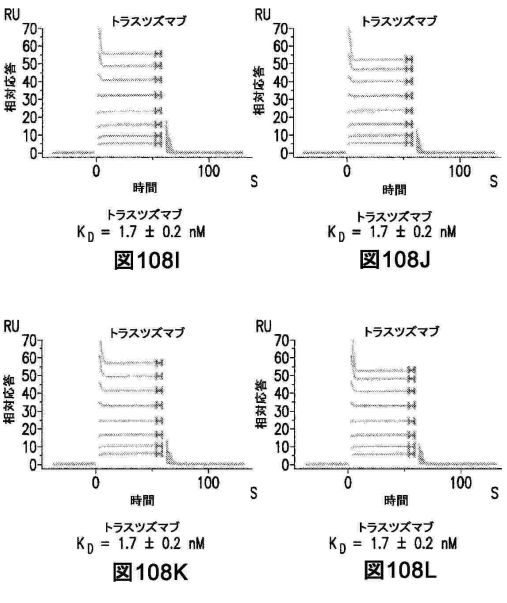


図108I

図108J

図108K

図108L

【図１０８－４】

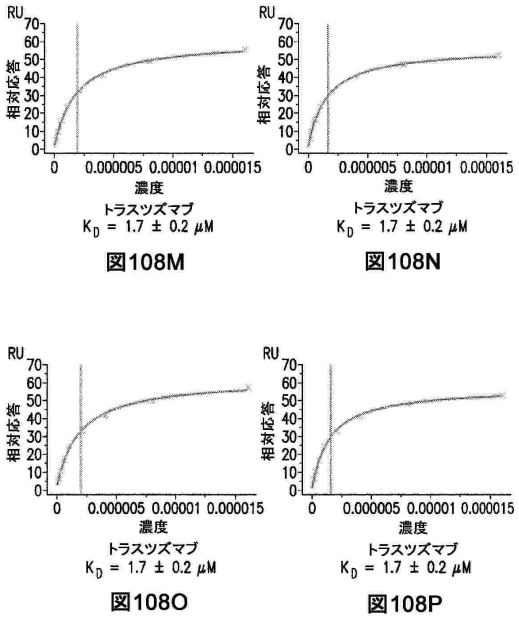


図108M　図108N

図108O　図108P

【図１０９－１】

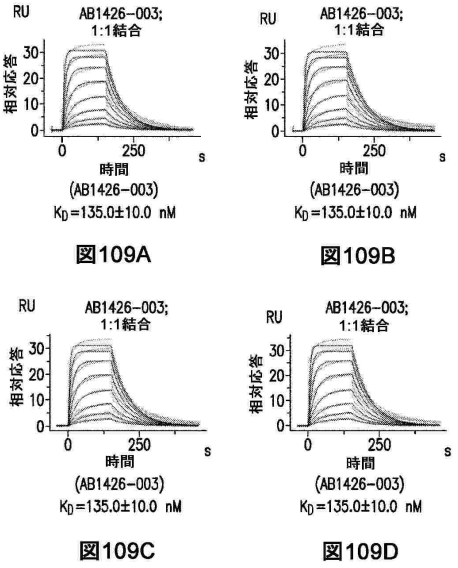


図109A　図109B

図109C　図109D

【図１０９－２】

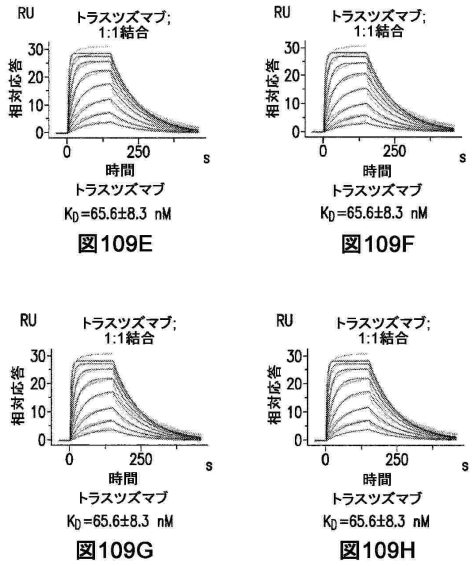


図109E　図109F

図109G　図109H

【図１１０－１】

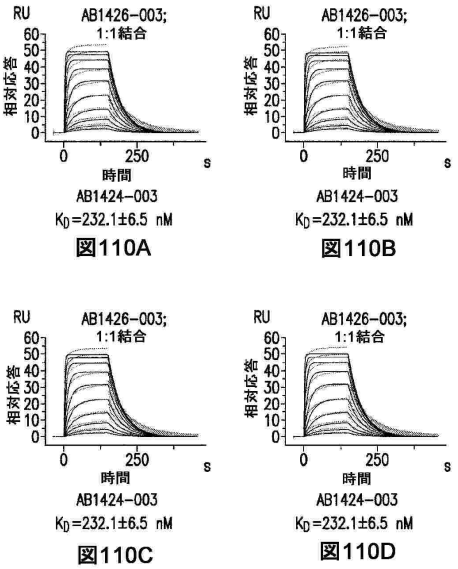


図110A　図110B

図110C　図110D

【図１１０－２】

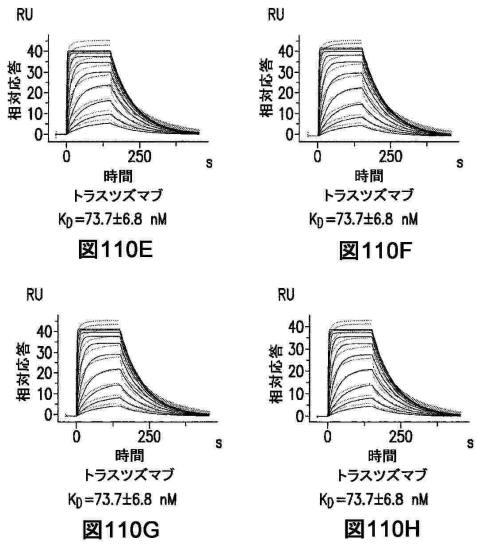


図110E　図110F

図110G　図110H

【図１１１－１】

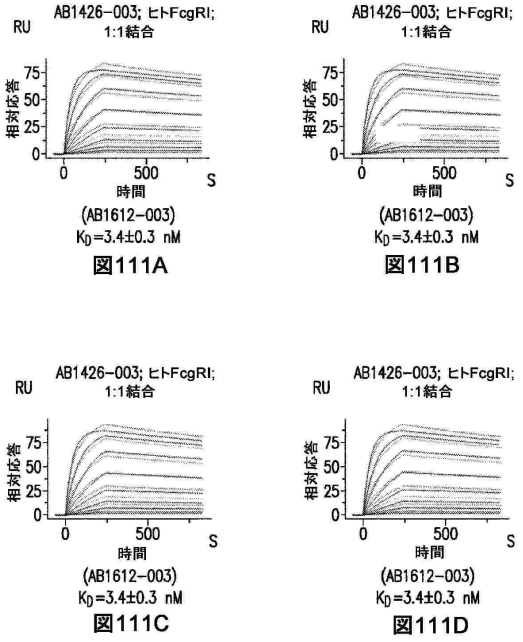


図111A　図111B

図111C　図111D

【図１１１－２】

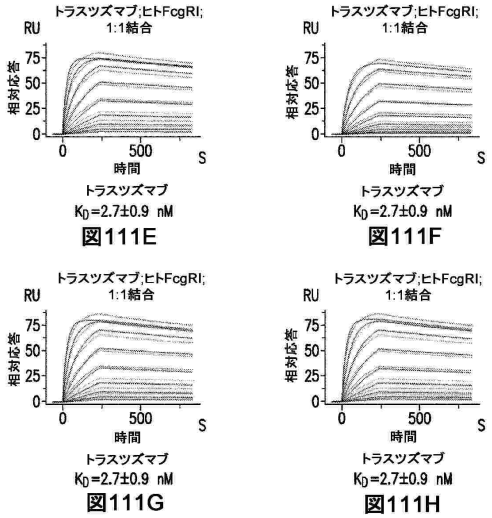


図111E　図111F

図111G　図111H

【図１１２－１】

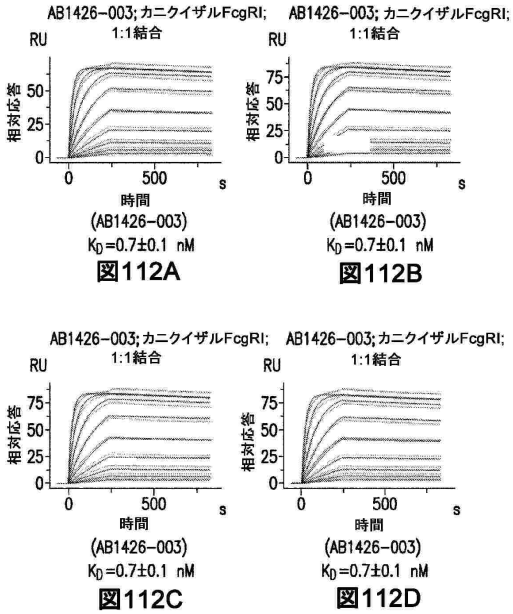


図112A　図112B

図112C　図112D

【図１１２－２】

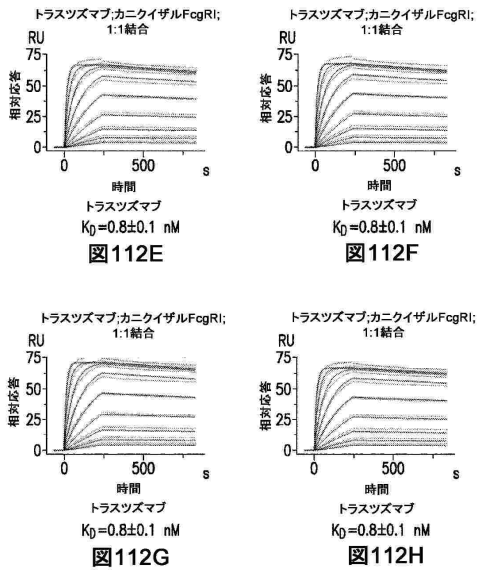


図112E　図112F

図112G　図112H

【図１１３－１】

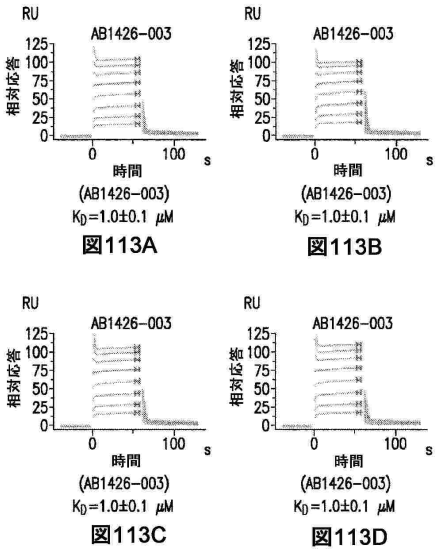


図113A　図113B

図113C　図113D

【図１１３－２】

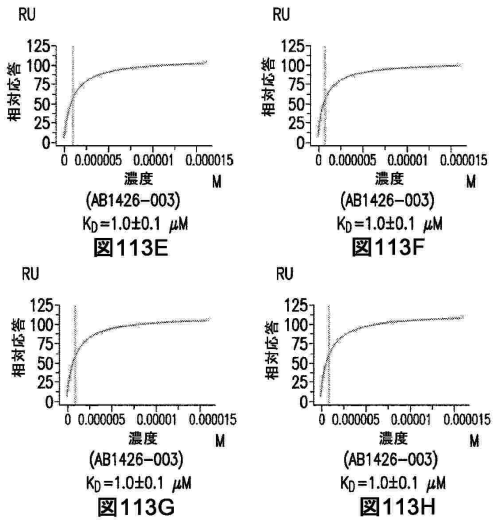


図113E　図113F

図113G　図113H

【図１１３－３】

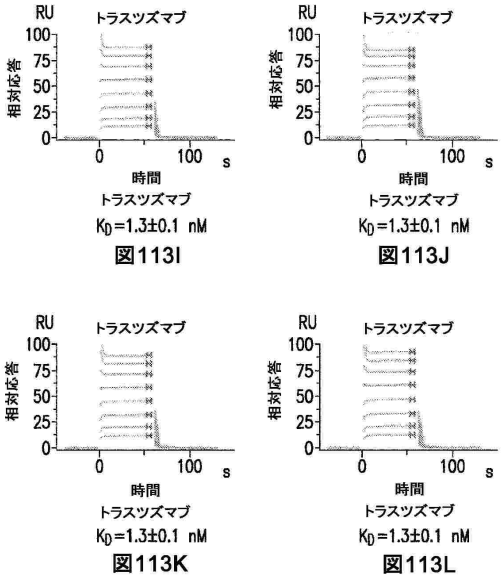


図113I　図113J

図113K　図113L

【図１１３－４】

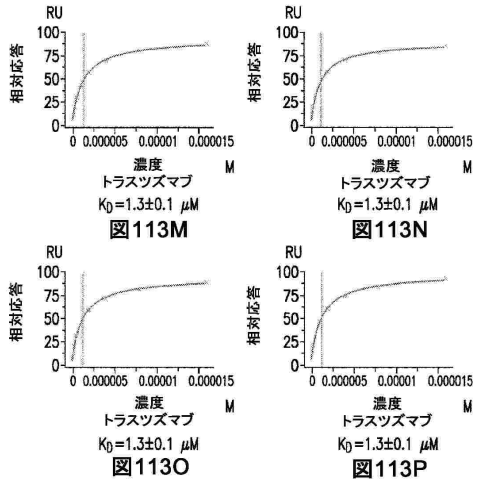


図113M　図113N

図113O　図113P

【図１１４－１】

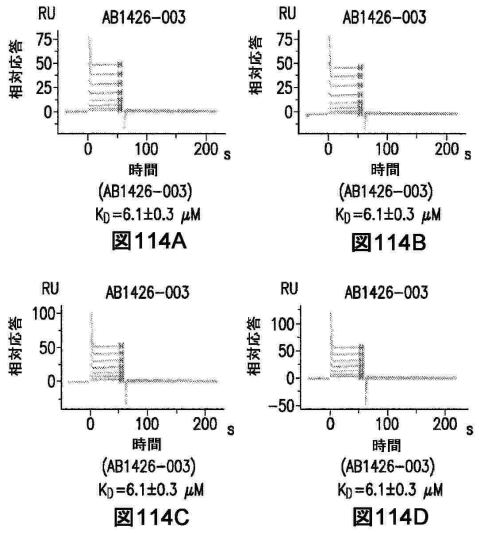


図114A　図114B

図114C　図114D

【図１１４－２】

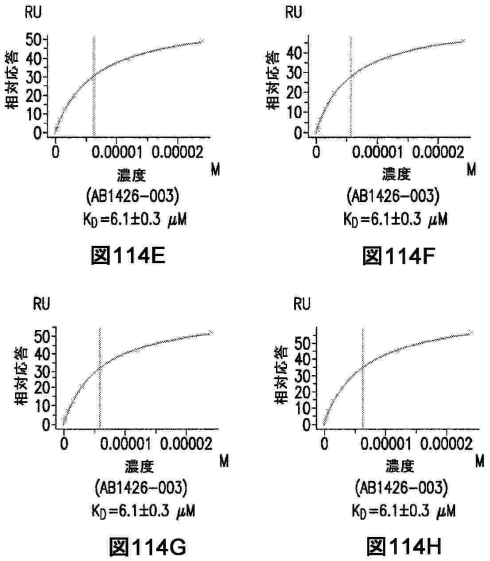


図114E　図114F

図114G　図114H

【図１１４－３】

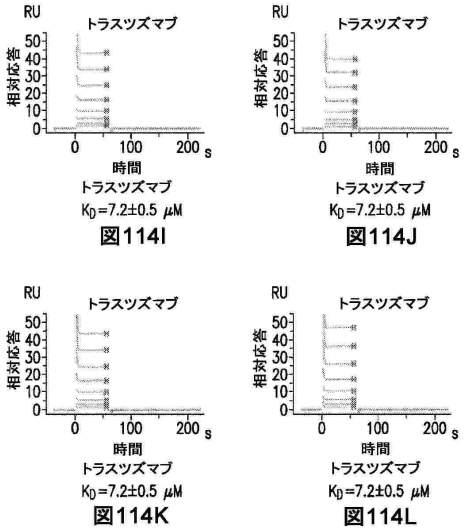


図114I　図114J

図114K　図114L

【図１１４－４】

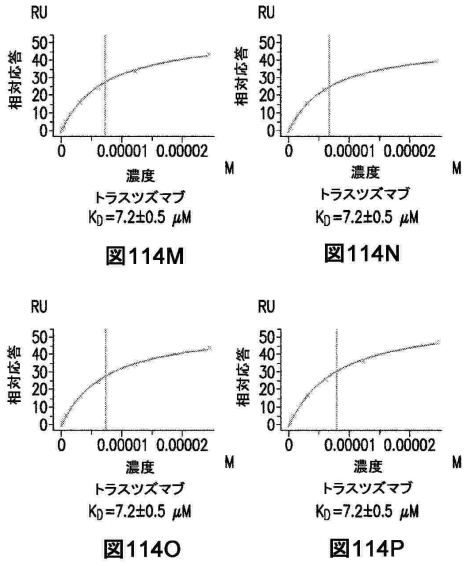


図114M　図114N

図114O　図114P

【図１１５－１】

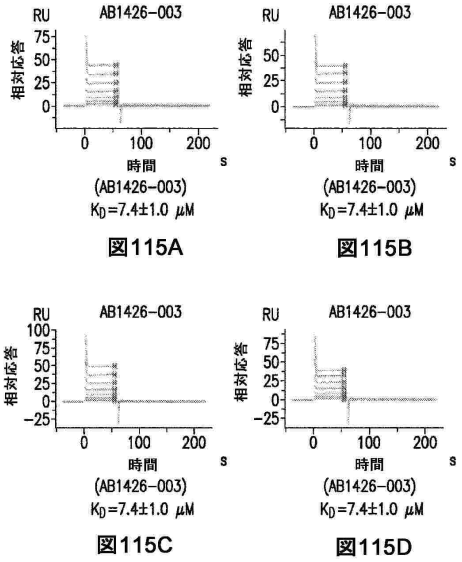


図115A　図115B

図115C　図115D

【図１１５－２】

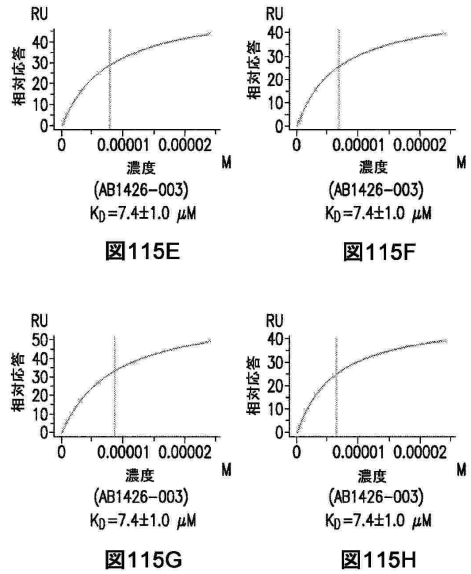


図115E　図115F

図115G　図115H

【図１１５－３】

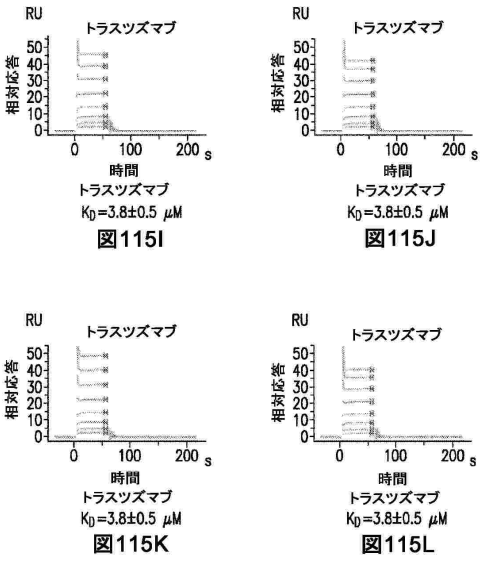


図115I　図115J

図115K　図115L

【図１１５－４】

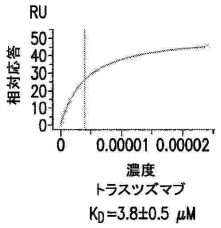


図115M

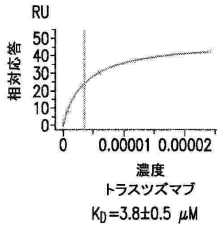


図115N

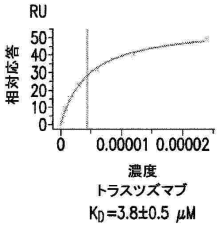


図115O

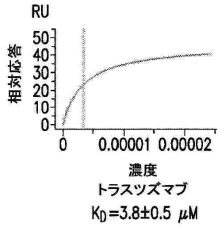


図115P

【図１１６－１】

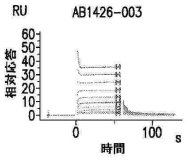


図116A

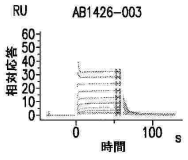


図116B

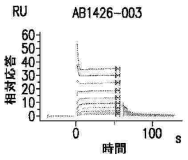


図116C

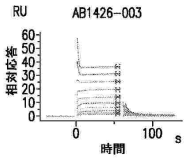


図116D

【図１１６－２】

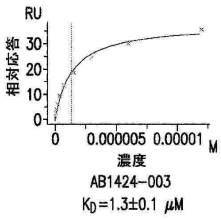


図116E

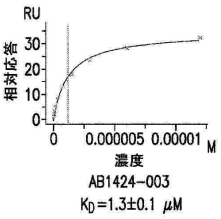


図116F

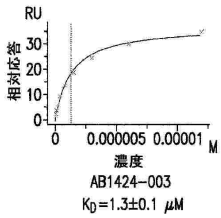


図116G

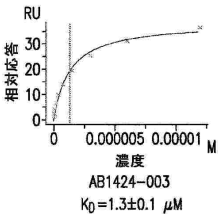


図116H

【図１１６－３】

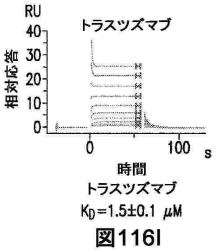


図116I

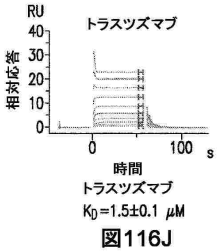


図116J

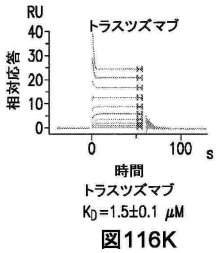


図116K

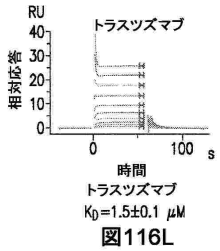
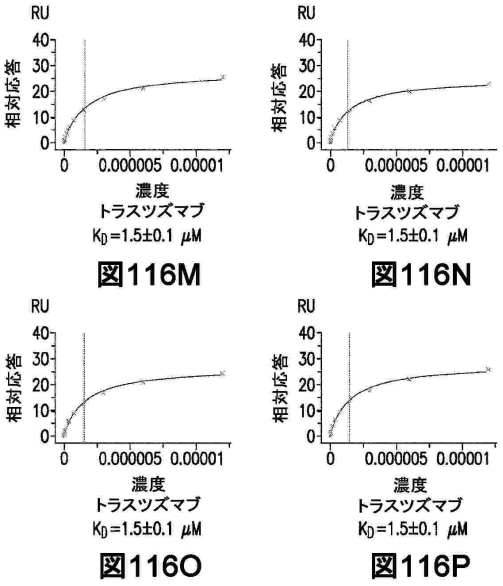
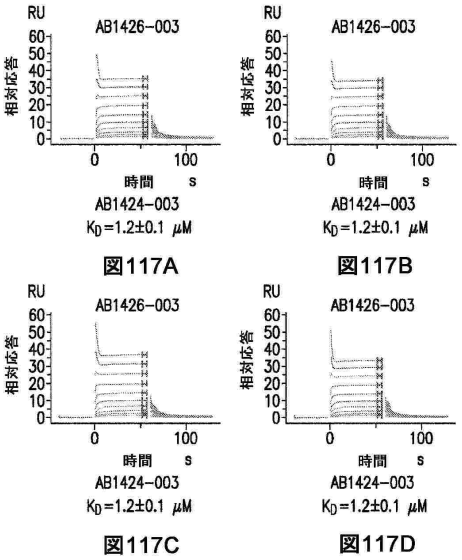


図116L

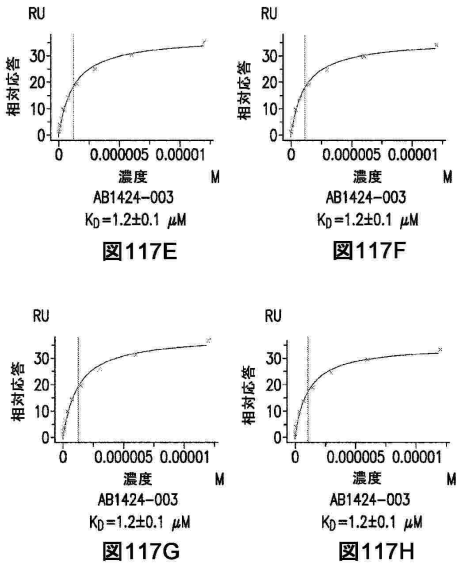
【図１１６－４】



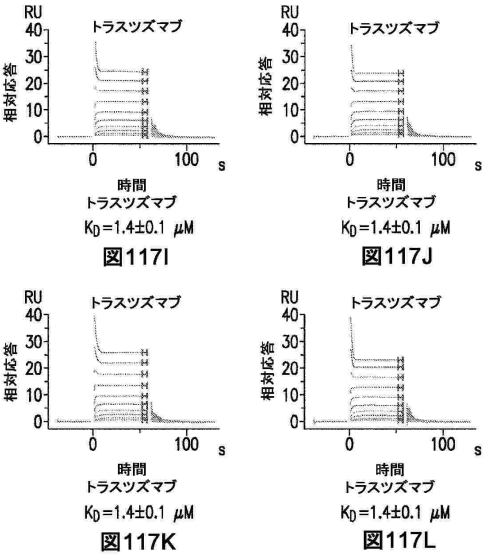
【図１１７－１】



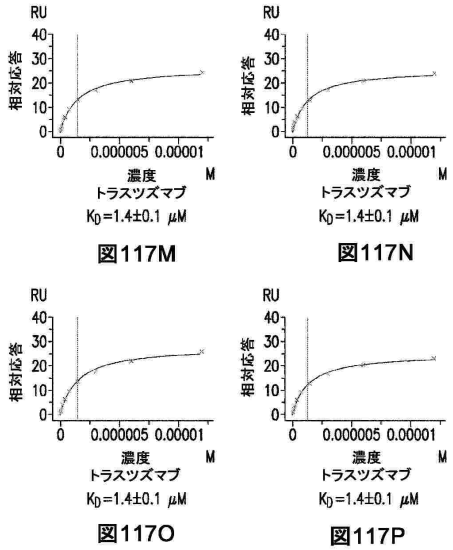
【図１１７－２】



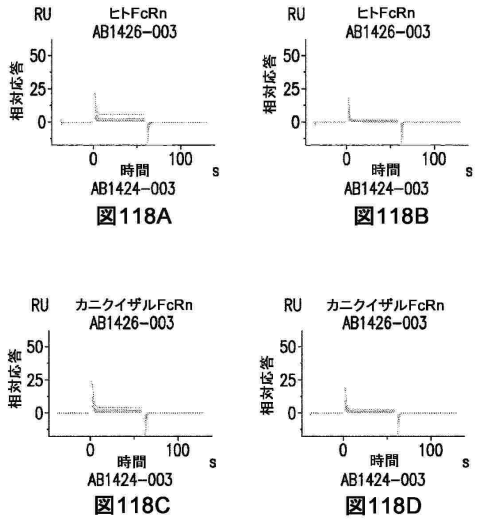
【図１１７－３】



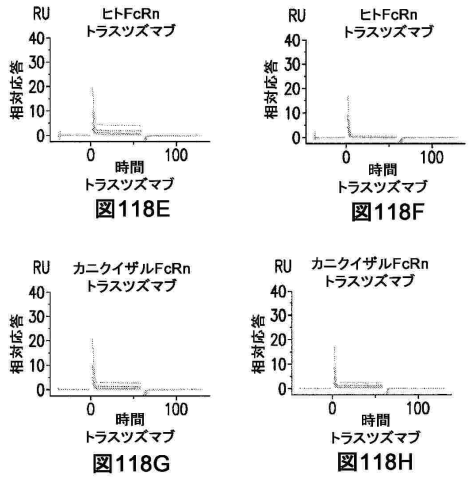
【図１１７－４】



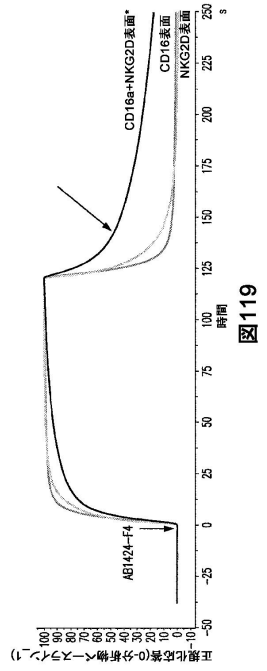
【図１１８－１】



【図１１８－２】



【図１１９】



【図１２０】

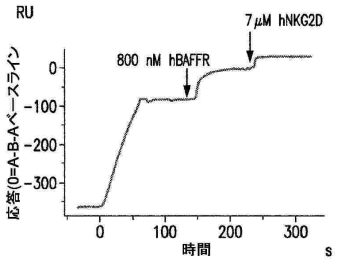


図120A

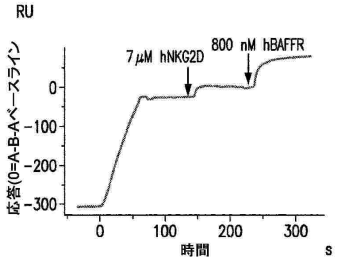


図120B

【図１２１－１】

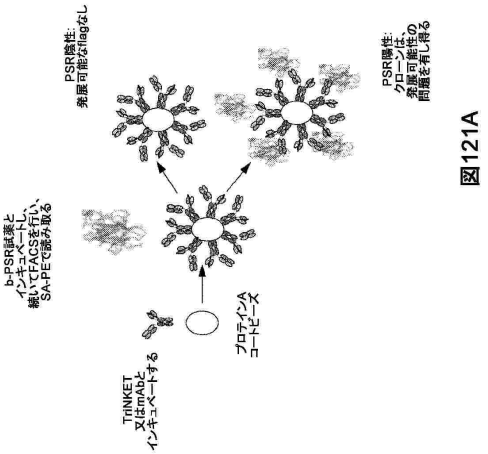


図121A

【図１２１－２】

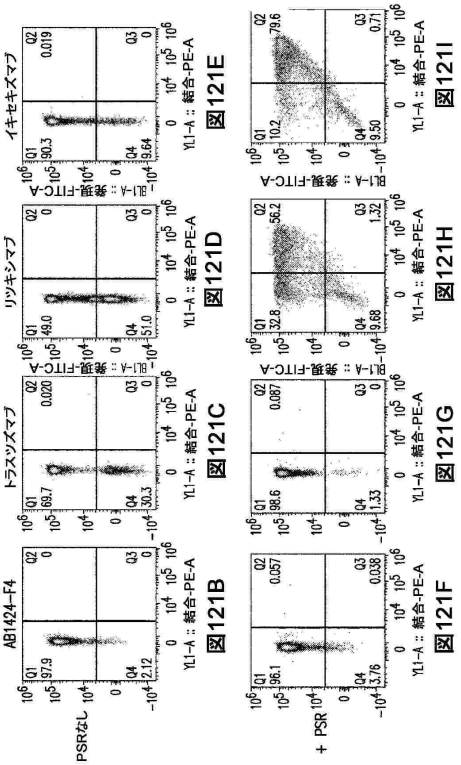


図121B
図121C
図121D
図121E
図121F
図121G
図121H
図121I

【図１２２】

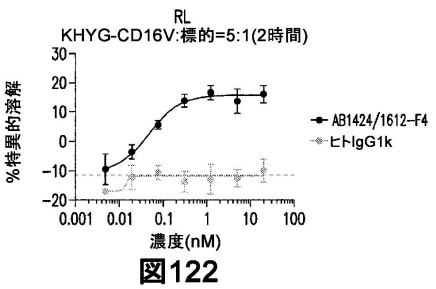


図122

【図１２３】

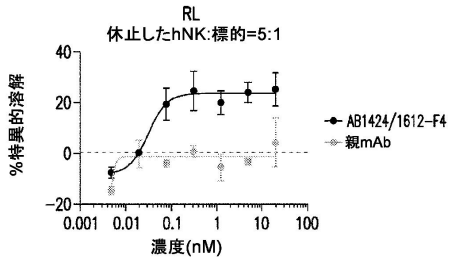


図123

【図１２４】

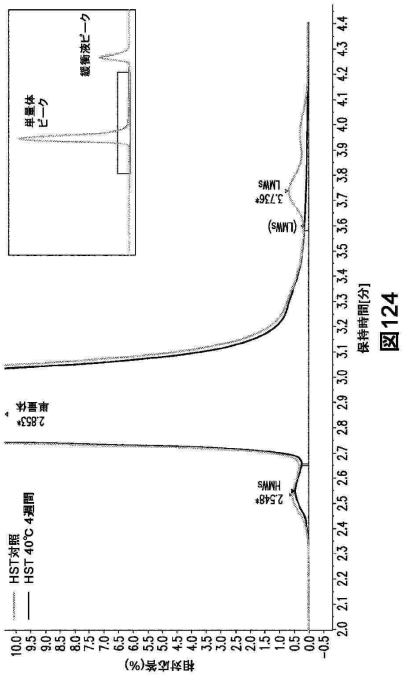


図124

【図１２５】

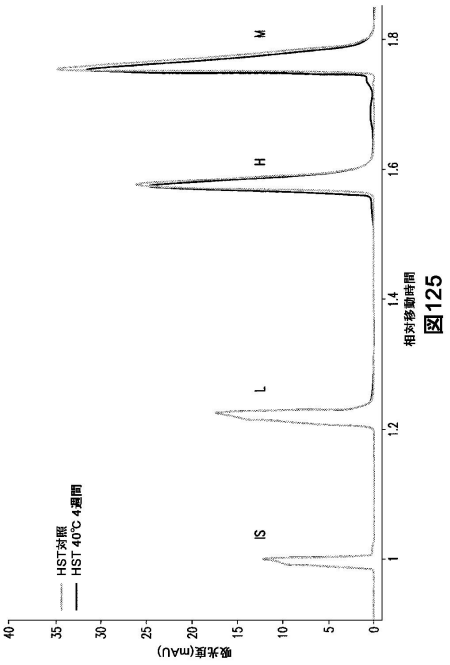


図125

【図１２６】

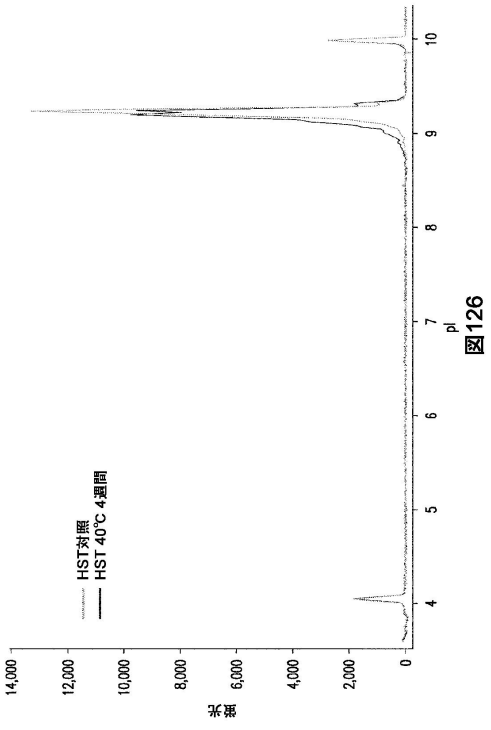


図126

【図１２７】

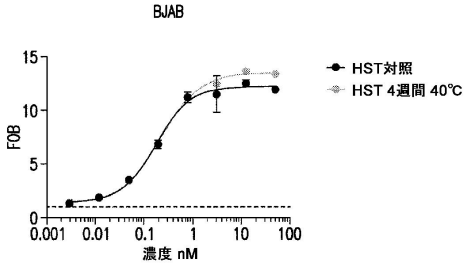


図127

【図１２８】

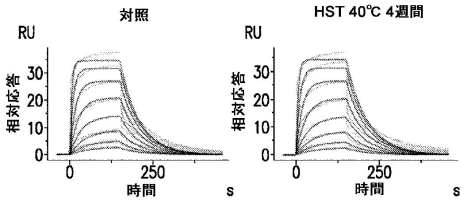


図128A　図128B

【図１２９】

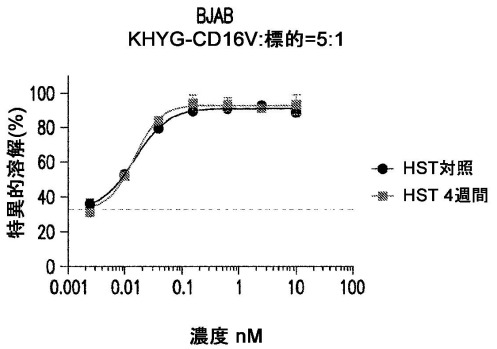


図129

【図１３０】

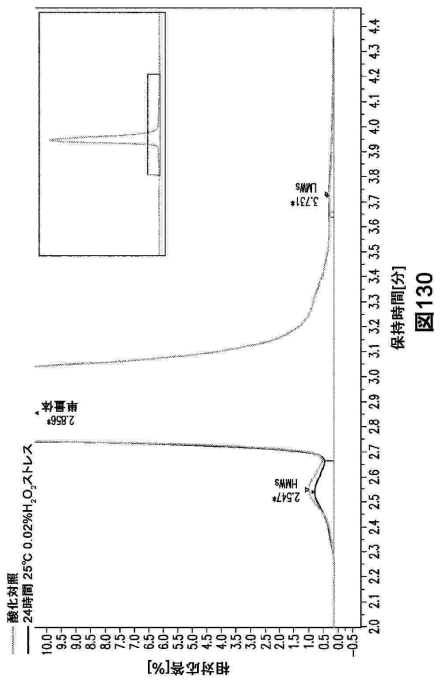


図130

【図１３１】

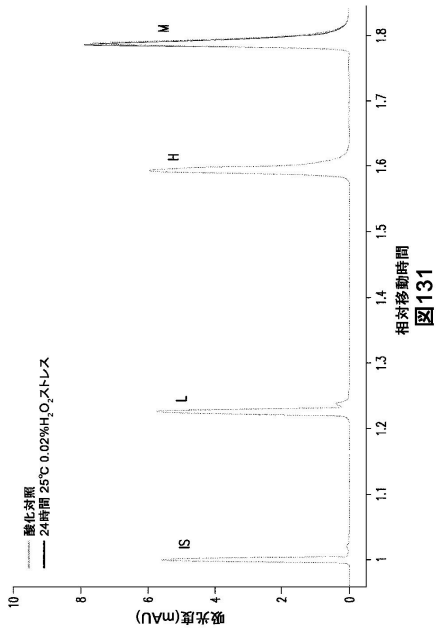


図131

【図１３２】

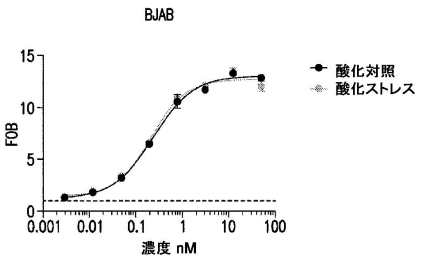


図132

【図１３３】

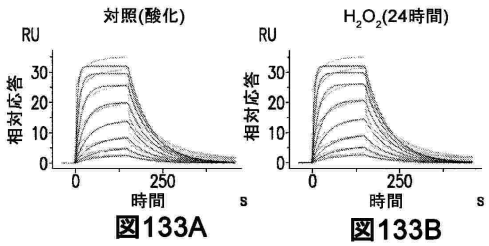


図133A　図133B

【図１３４】

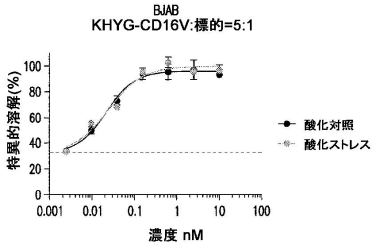


図134

【図１３５】

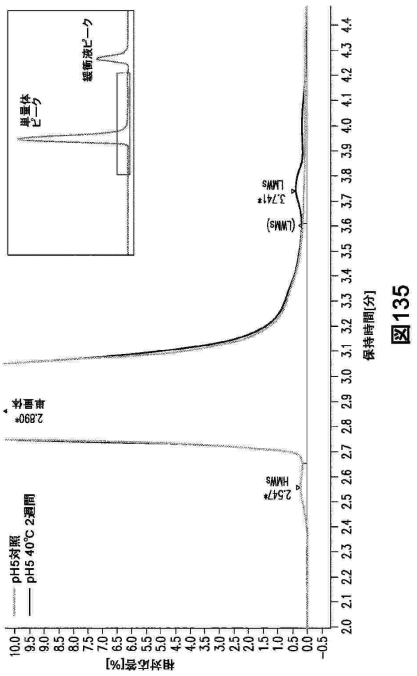


図135

【図１３６】

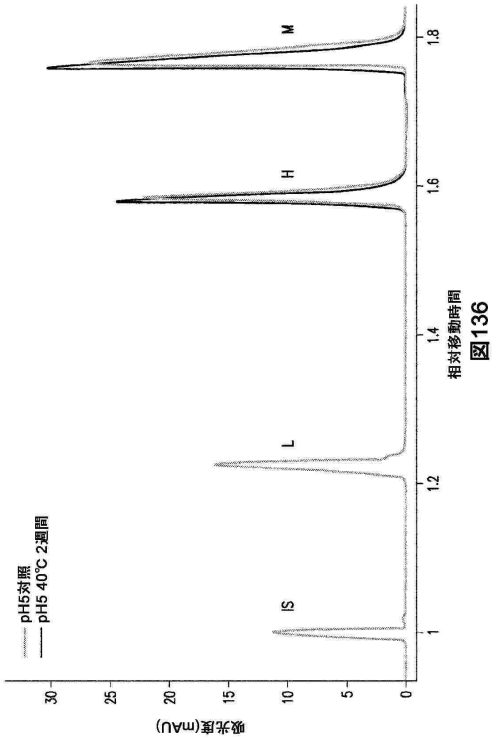


図136

【図１３７】

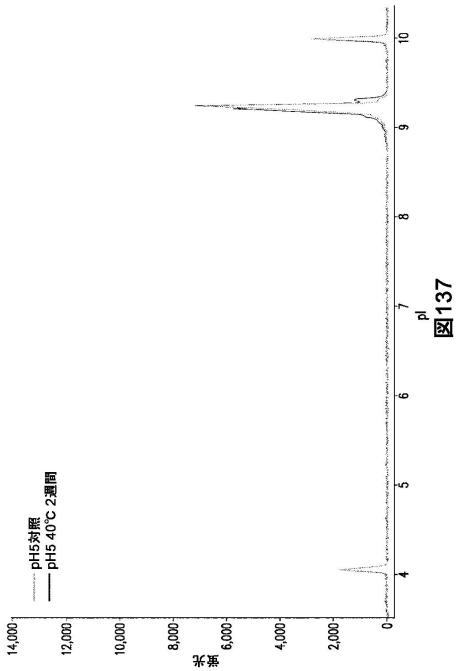


図137

【図１３８】

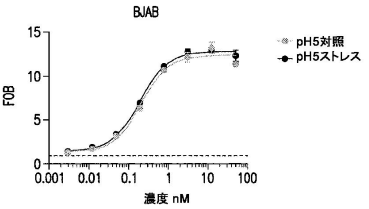


図138

【図１３９】

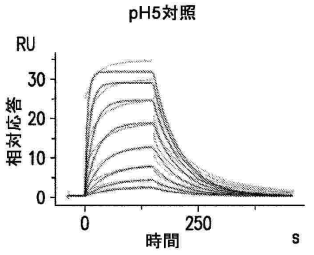


図139A

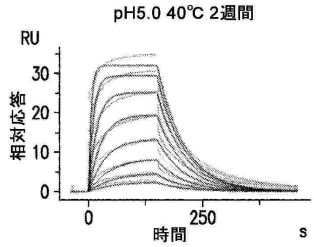


図139B

【図１４０】

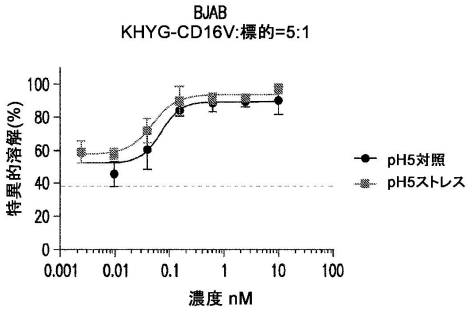


図140

【図１４１】

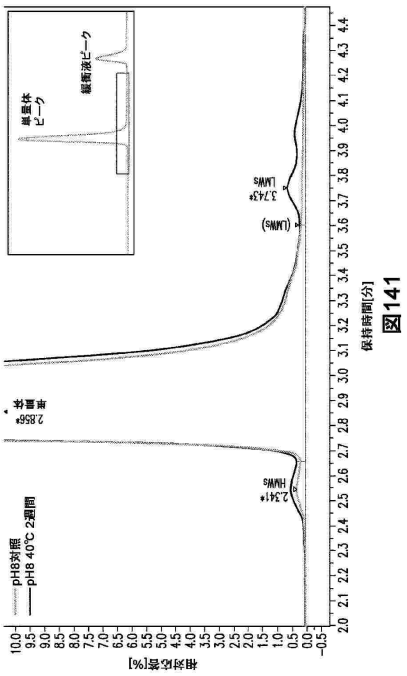


図141

【図１４２】

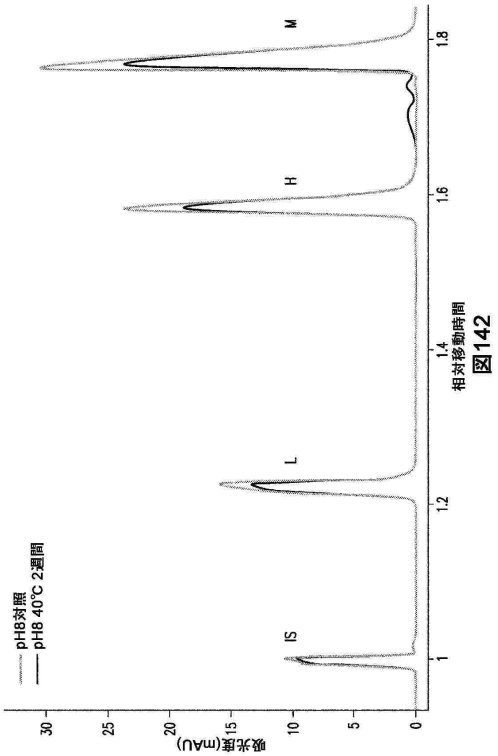


図142

【図１４３】

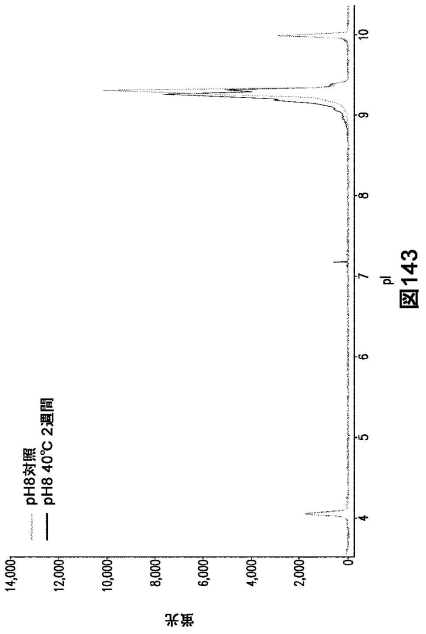


図143

【図１４４】

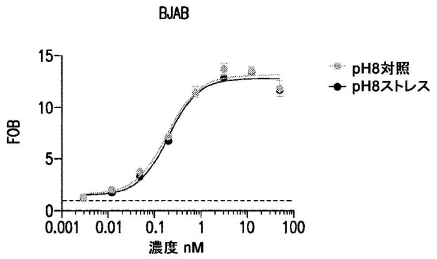


図144

【図１４５】

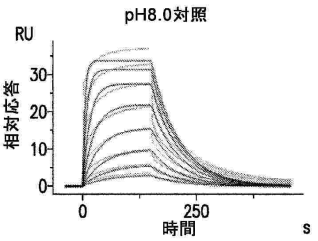


図145A

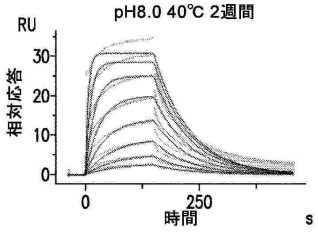


図145B

【図１４６】

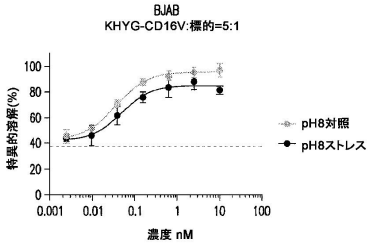


図146

【図１４７】

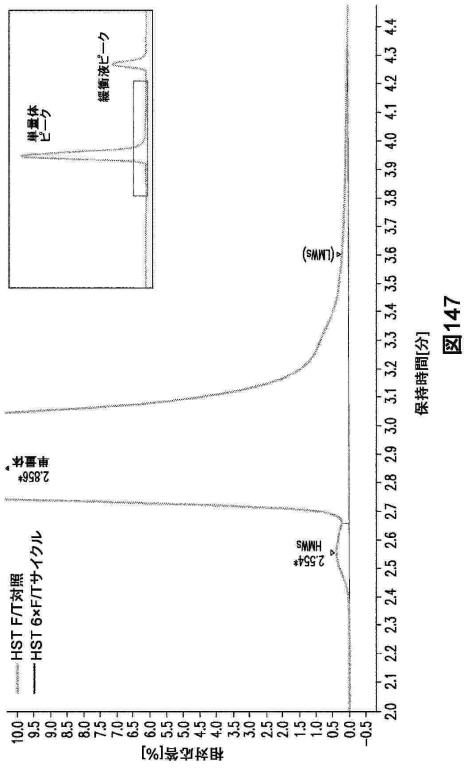


図147

【図１４８】

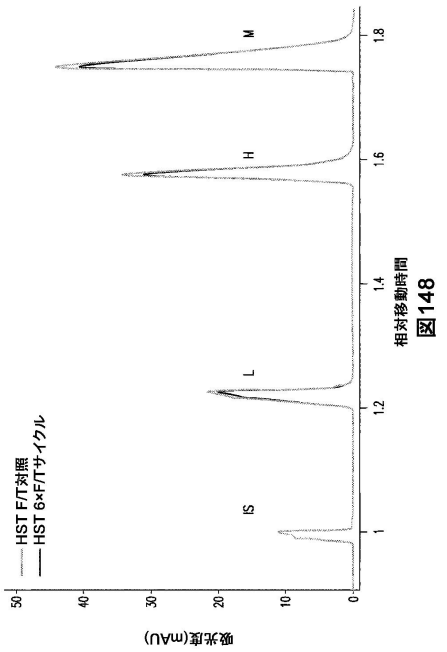


図148

【図１４９】

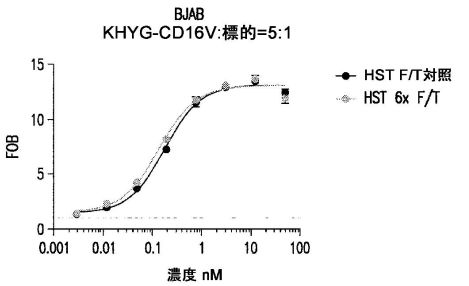


図149

【図１５０】

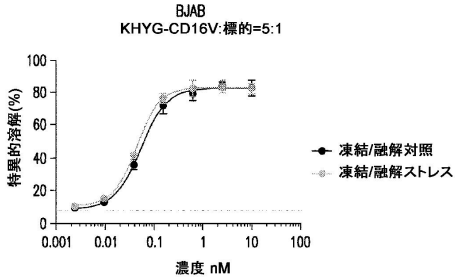


図150

【図１５１】

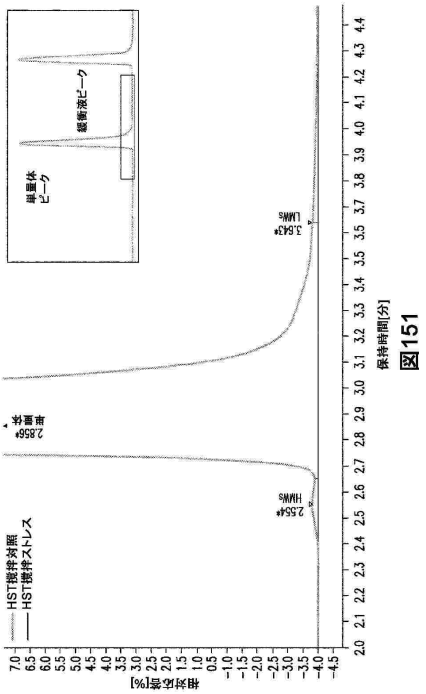


図151

【図１５２】

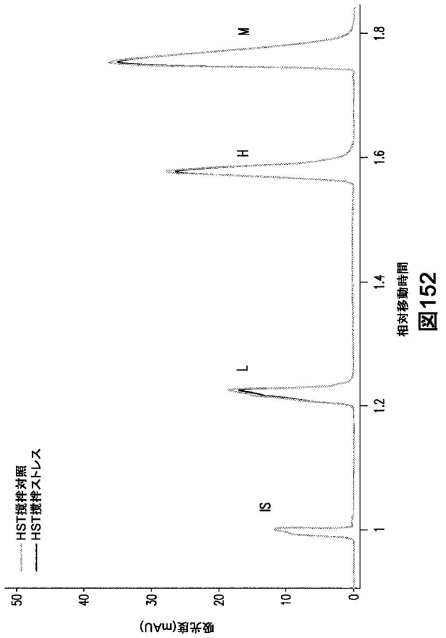


図152

【図１５３】

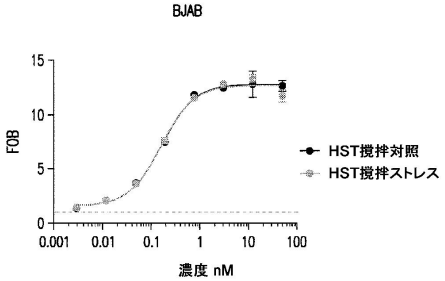


図153

【図１５４】

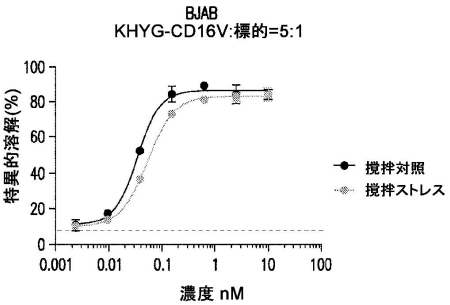


図154

【図１５５－１】

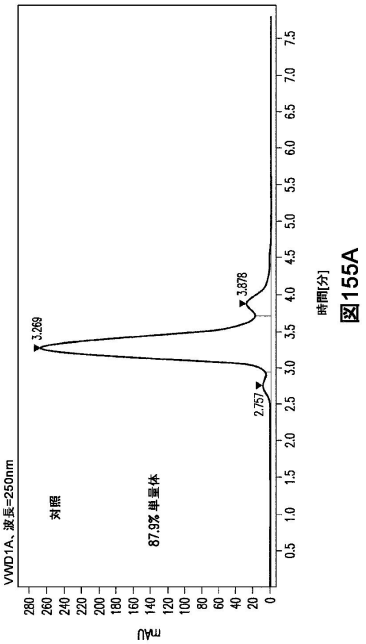


図155A

【図１５５－２】

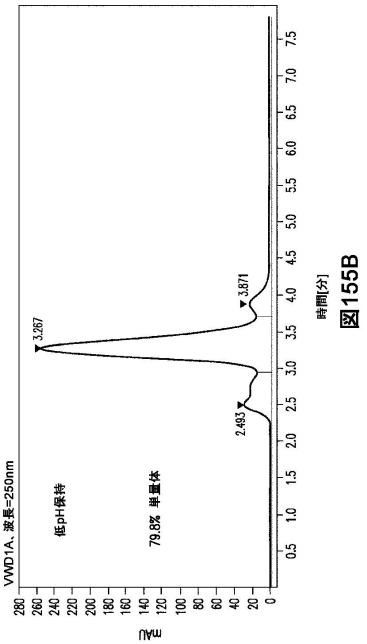


図155B

【図１５６】

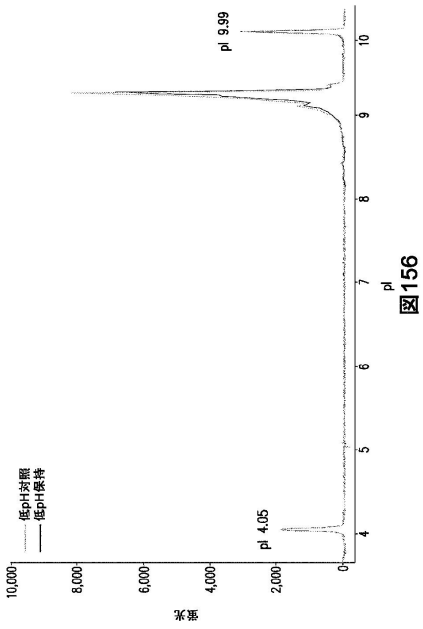


図156

【図１５７】

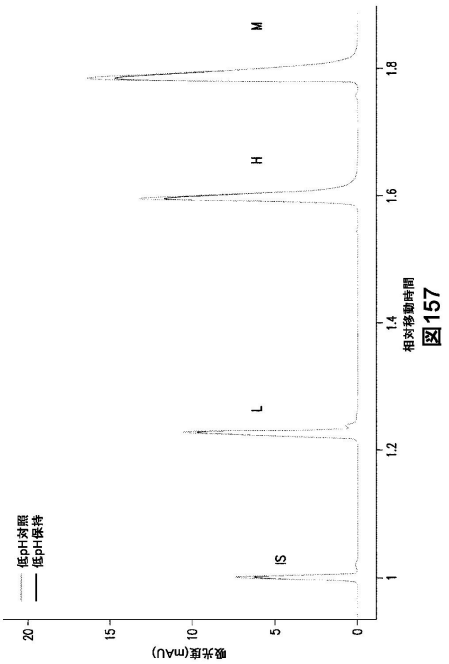


図157

【図１５８】

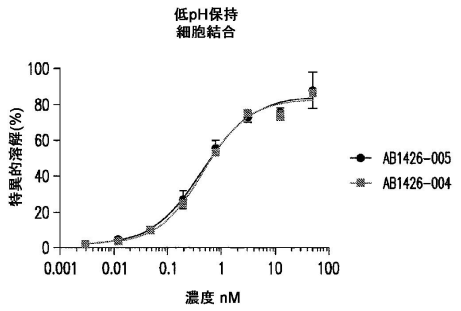


図158

【図１５９】

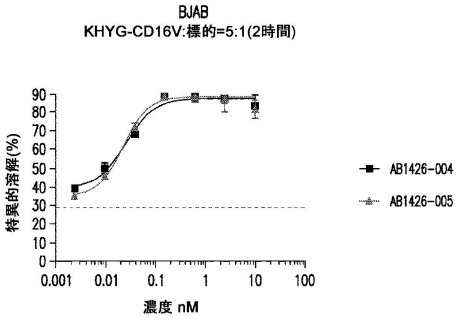


図159

【図１６０】

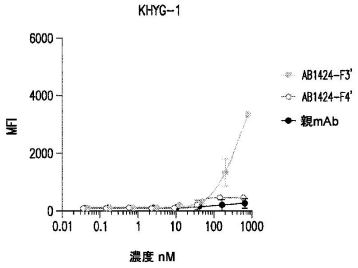


図160A

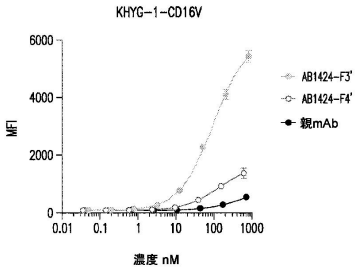


図160B

【図１６１】

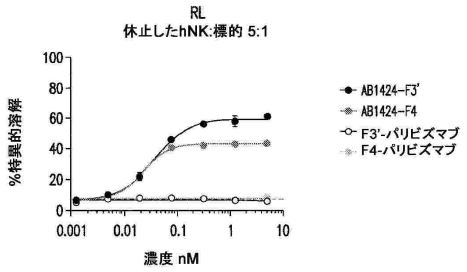


図161A

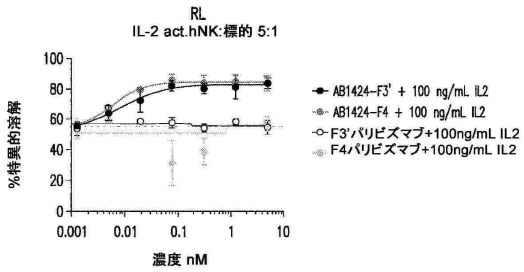


図161B

【図１６２】

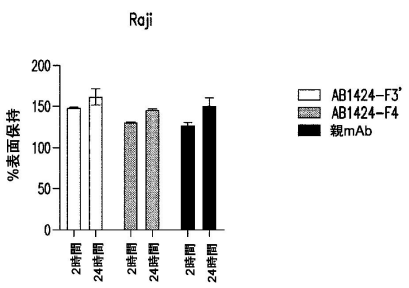


図162

【図１６３】

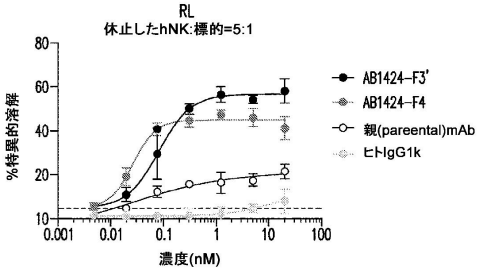


図163

【図１６４】

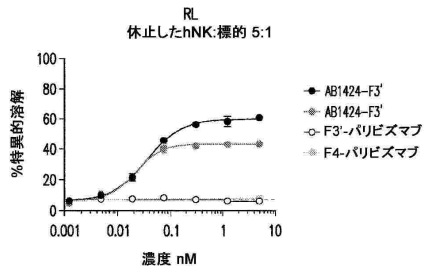


図164A

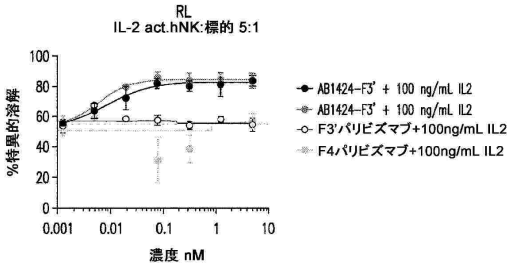


図164B

【図１６５】

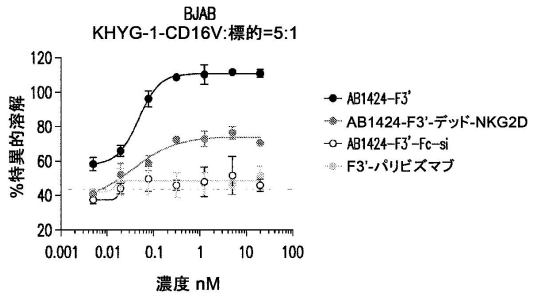


図165

【図１６６】

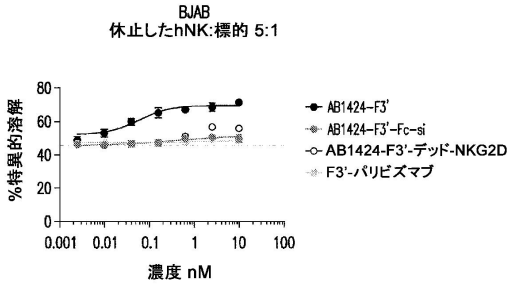


図166

【図１６７】

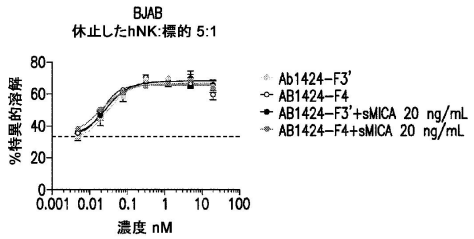


図167

【図１６８】

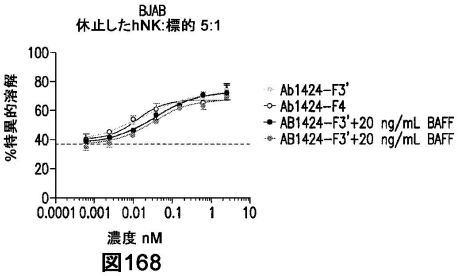


図168

【図１６９】

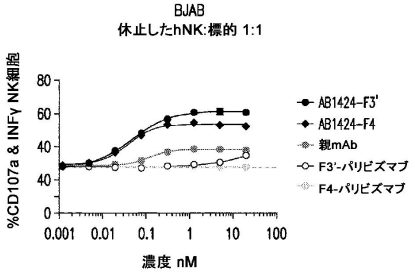


図169

【図１７０】

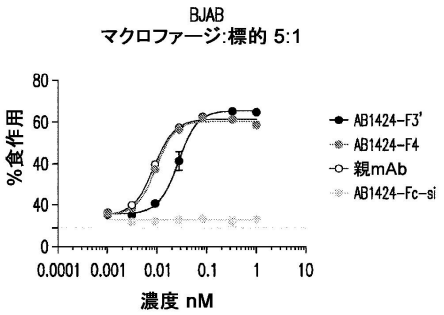


図170

【図１７１】

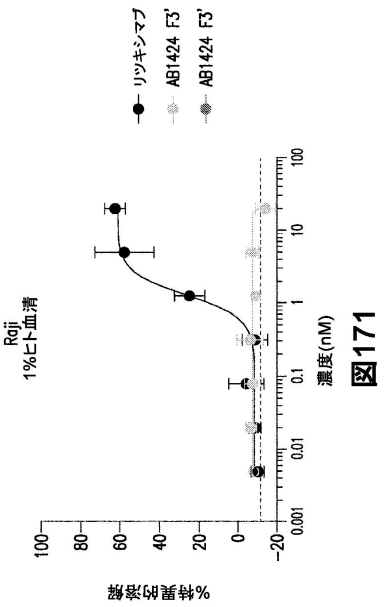


図171

【図１７２】

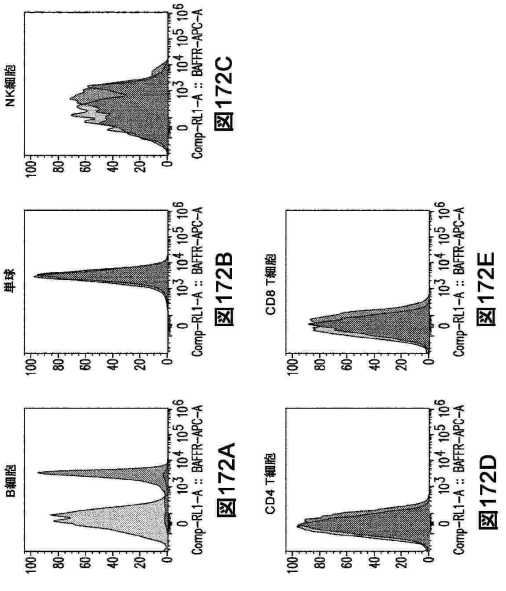


図172A
図172B
図172C
図172D
図172E

【図１７３－１】

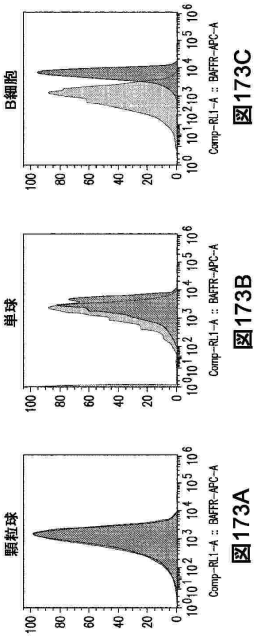


図173A
図173B
図173C

【図１７３－２】

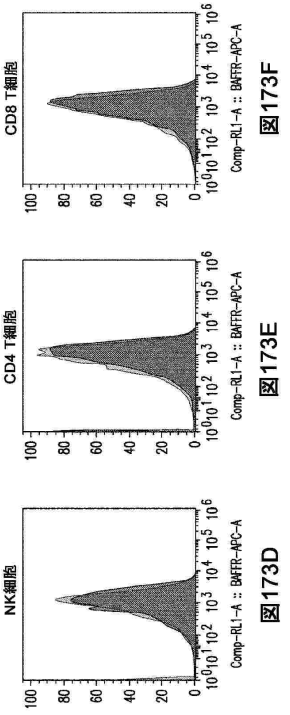


図173D　図173E　図173F

【図１７４】

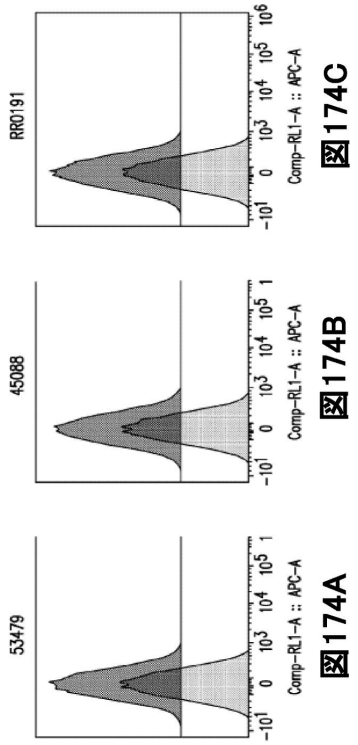


図174A　図174B　図174C

【図１７５】

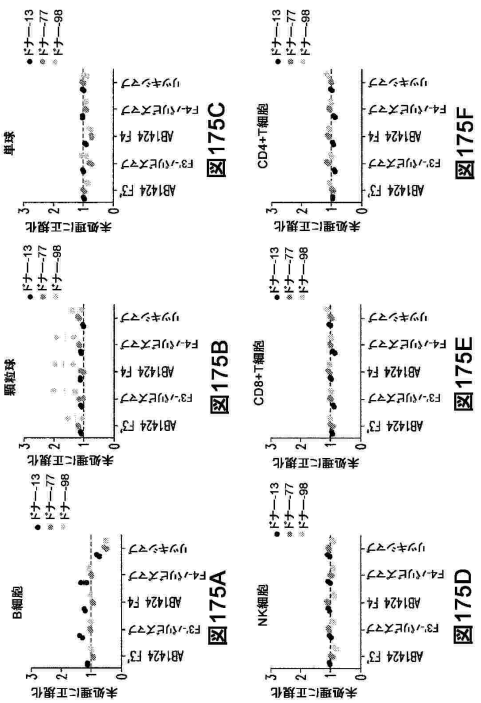


図175A　図175B　図175C　図175D　図175E　図175F

【図１７６】

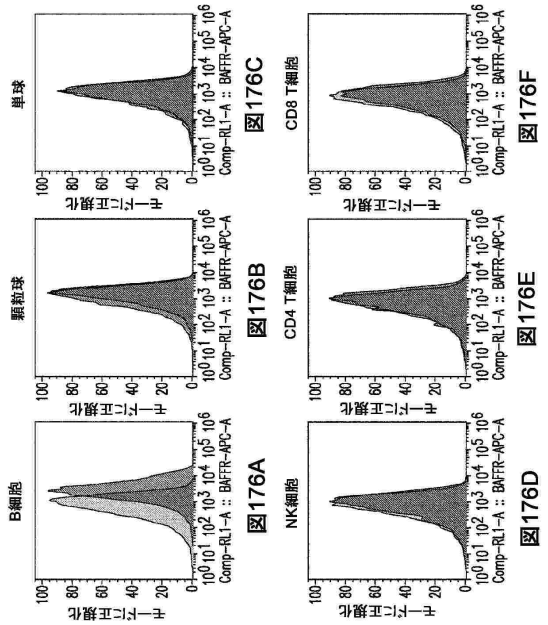
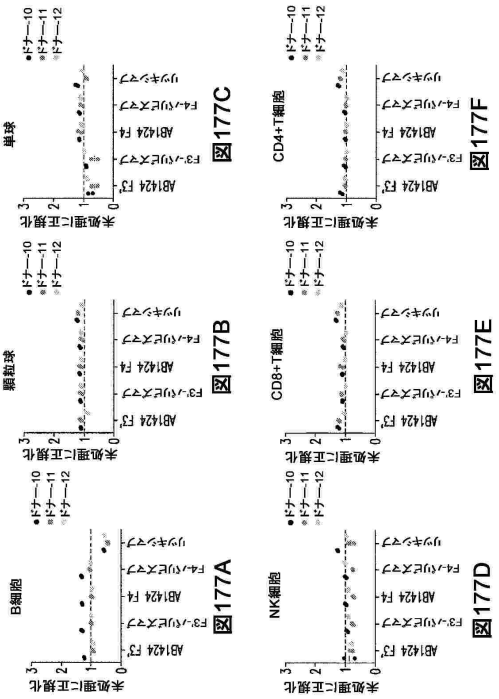


図176A　図176B　図176C　図176D　図176E　図176F

【図１７７】



【図１７８】

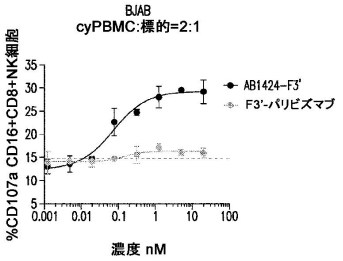


図178

【配列表】

<u>2024537779000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C07K 16/46 (2022.01)
ADD. - C07K 16/28; C12N 15/13; C12N 15/62 (2022.01)

CPC - INV. - C07K 16/468; C07K 16/28; A61K 39/39541 (2022.08)
ADD. - C07K 2317/31 (2022.08)

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)
See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/076564 A1 (DRAGONFLY THERAPEUTICS INC.) 22 April 2021 (22.04.2021) entire document	1-7, 23, 24
Y	US 2021/0269540 A1 (NOVARTIS AG) 02 September 2021 (02.09.2021) entire document	1-7, 23, 24
A	US 2017/0129961 A1 (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH et al) 11 May 2017 (11.05.2017) entire document	1-7, 23, 24, 47, 48, 57, 58
A	US 2015/0353637 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 10 December 2015 (10.12.2015) entire document	1-7, 23, 24, 47, 48, 57, 58 1-7, 23, 24, 47, 48, 57, 58
A	US 2020/0376034 A1 (DRAGONFLY THERAPEUTICS INC.) 03 December 2020 (03.12.2020) entire document	1-7, 23, 24, 47, 48, 57, 58
A	US 2020/0277383 A1 (DRAGONFLY THERAPEUTICS INC.) 03 September 2020 (03.09.2020) entire document	1-7, 23, 24, 47, 48, 57, 58
A	US 2021/0220404 A1 (GREENE et al) 22 July 2021 (22.07.2021) entire document	

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
12 November 2022	DEC 15 2022
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077083

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

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

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077083

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 8-22, 25-46, 49-56, 59-67
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395 N	
A61P	*35/02 (2006.01)*	A61P	35/02	
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00	
A61P	*37/04 (2006.01)*	A61P	37/04	
A61P	*37/02 (2006.01)*	A61P	37/02	
A61P	*29/00 (2006.01)*	A61P	29/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

２．ＴＷＥＥＮ

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　チョン，アン エフ

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　ドラビッチ，ステイシー ブイ

アメリカ合衆国０２１４０マサチューセッツ州ケンブリッジ、コンコード・ターンパイク２２３、ユニット３３２

(72)発明者　ファロン，ダニエル

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　フィッシャー，ベンジャミン

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　グリンバーグ，アシャ

アメリカ合衆国０２４２１マサチューセッツ州レキシントン、フォレン・ロード３７

(72)発明者　ハイン，ピャエ ピー

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　イワノフ，アレクサンダー

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　ジュオ，ゾン ショーン

台湾１１４タイペイ、ネイフー・ディストリクト、シンユン・ストリート、ナンバー１２９、エフ８－１

(72)発明者　レヴァンドフスキ，マーク

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　リィ，シンビ

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

(72)発明者　シュナイダー，マシュー

アメリカ合衆国０２４５１マサチューセッツ州ウォルサム、ゲイトハウス・ドライブ３５

Ｆターム（参考）　4B065　AA91X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085　AA14 AA16 BB11 DD31 DD33 DD34 DD35 DD36 DD62 EE01

4H045　AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA28 FA74