

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7138046号

(P7138046)

(45)発行日 令和4年9月15日(2022.9.15)

(24)登録日 令和4年9月7日(2022.9.7)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/00

Z N A

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

請求項の数 31 (全111頁)

(21)出願番号 特願2018-531487(P2018-531487)

(86)(22)出願日 平成28年12月15日(2016.12.15)

(65)公表番号 特表2019-502694(P2019-502694  
A)

(43)公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/066865

(87)国際公開番号 WO2017/106462

(87)国際公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

審査請求日 令和1年12月2日(2019.12.2)

(31)優先権主張番号 62/269,664

(32)優先日 平成27年12月18日(2015.12.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 398050098

バイオジェン・エムエイ・インコーポレ  
イテッド

Biogen MA Inc.

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセ  
ッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリー  
ト 2 2 5 番

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ブレイアー, マーティン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2  
1 4 4, サマービル, ウェストン ア  
ベニュー 4 3, ナンバービー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二特異性抗体基幹

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

第1重鎖可変ドメイン(第1VH)と第1軽鎖可変ドメイン(第1VL)とを含んでい  
る、抗体またはその抗原結合性断片であって、前記第1VHと前記第1VLとが対合して  
、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成しており、

(a) 前記第1VHが、ヒト免疫グロブリンE(IgE)のCH2ドメインのアミノ酸  
配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を  
含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介  
して繋がられているかのどちらかであり、前記第1VLが、ヒトIgEのCH2ドメイン  
のアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミ  
ノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リ  
ンカーを介して繋がられているかのどちらかであるか;あるいは

(b) 前記第1VHが、ヒト免疫グロブリンM(IgM)のCH2ドメインのアミノ酸  
配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を  
含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介  
して繋がられているかのどちらかであり、前記第1VLが、ヒトIgMのCH2ドメイン  
のアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも90%同一であるアミ  
ノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リ  
ンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、

前記第1ポリペプチドと前記第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成し、

10

20

( I ) 前記第 1 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋がられている ; または

( I I ) 前記第 2 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋がられている ; ならびに / あるいは

前記抗体またはその抗原結合性断片が、第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) と第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2 V L ) とを含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 3】

二特異性抗体であって、

( i ) ( a ) 第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) と第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) とを含んでいる第 1 抗原結合性断片 ( 第 1 F a b ) であって、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、第 1 F a b ; または

20

( b ) 第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) と第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) とを含んでいる第 1 抗原結合性断片 ( 第 1 F a b ) であって、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、第 1 F a b と、

30

( i i ) 第 2 V H と第 2 V L とを含んでいる第 2 F a b であって、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、第 2 F a b とを含み、

40

前記第 1 F a b 及び前記第 2 F a b が、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合するものであり、

前記第 1 F a b が前記第 2 F a b に連結されている、二特異性抗体。

【請求項 4】

( I ) 前記第 1 F a b がリンカーによって前記第 2 F a b に連結されているか ; または

( I I ) 前記第 1 F a b が異種ポリペプチドによって前記第 2 F a b に連結されているか ; または

( I I I ) 前記第 1 F a b がポリエチレングリコール ( P E G ) によって前記第 2 F a b に連結されている、請求項 3 に記載の二特異性抗体。

【請求項 5】

50

前記リンカーがペプチドリinkerである、請求項 4 に記載の二特異性抗体。

【請求項 6】

前記異種ポリペプチドが、ヒト血清アルブミンであるか；または X T E N である、請求項 4 に記載の二特異性抗体。

【請求項 7】

四価二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する全 I g G 抗体であって、前記全 I g G 抗体が第 1 C H 3 ドメイン及び第 2 C H 3 ドメインを含むものである、全 I g G 抗体；及び

( i i ) 第 1 F a b 及び第 2 F a b

を含み、

前記第 1 F a b が第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) 及び第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) を含むものであり、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、

前記第 2 F a b が第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) 及び第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2 V L ) を含むものであり、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 F a b と同じエピトープに特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており；

( a ) 前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V H が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 3 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 4 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであるか；あるいは

( b ) 前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V H が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 3 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 4 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり；

前記第 1 F a b が前記全 I g G 抗体の前記第 1 C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、前記第 2 F a b が前記全 I g G 抗体の前記第 2 C H 3 ドメインの C 末端に連結されている、四価二特異性抗体。

【請求項 8】

四価二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 F a b 及び第 2 F a b であって、

前記第 1 F a b が第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) 及び第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1

10

20

30

40

50

V L ) を含むものであり、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、

前記第 2 F a b が第 2 重鎖可変ドメイン (第 2 V H ) 及び第 2 軽鎖可変ドメイン (第 2 V L ) を含むものであり、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の前記第 1 エピトープに特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、第 1 F a b 及び第 2 F a b と ;

( i i ) 第 1 I g G C H 2 ドメイン及び第 1 I g G C H 3 ドメインを含んでいる第 1 重鎖と、第 2 I g G C H 2 ドメイン及び第 2 I g G C H 3 ドメインを含んでいる第 2 重鎖と、第 1 軽鎖と、第 2 軽鎖とを含む、全抗体であって、前記抗体が第 3 V H 及び第 3 V L ならびに第 4 V H 及び第 4 V L を含むものであり、前記第 3 V H と前記第 3 V L とが対合して、第 2 抗原のエピトープに特異的に結合する第 3 可変領域を形成しており、前記第 4 V H と前記第 4 V L とが対合して、前記第 2 抗原の同じエピトープに特異的に結合する第 4 可変領域を形成している全抗体と

を含み、

( a ) 前記第 3 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 3 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 4 V H が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 3 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 4 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 4 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドが前記第 1 I g G C H 2 ドメインの N 末端に連結されており、前記第 3 ポリペプチドが前記第 2 I g G C H 2 ドメインの N 末端に連結されているか ; または

( b ) 前記第 3 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 3 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 4 V H が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 3 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 4 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 4 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドが前記第 1 I g G C H 2 ドメインの N 末端に連結されており、前記第 3 ポリペプチドが前記第 2 I g G C H 2 ドメインの N 末端に連結されており、

前記第 1 F a b が前記第 1 I g G C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、前記第 2 F a b が前記第 2 I g G C H 3 ドメインの C 末端に連結されている、四価二特異性抗体。

#### 【請求項 9】

前記第 1 F a b が第 1 リンカーによって前記全抗体の前記第 1 C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、前記第 2 F a b が第 2 リンカーによって前記全抗体の前記第 2 C H 3

10

20

30

40

50

ドメインのC末端に連結されている、請求項7または8に記載の四価抗体。

【請求項10】

前記第1及び第2リンカーがペプチドリinkerである、請求項9に記載の四価抗体。

【請求項11】

ヘテロ二量体化モジュールであって、

(a)(i)配列番号11に示す配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する第1IgG1CH3ドメインであって、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がセリンである、第1IgG1CH3ドメインと；

(ii)配列番号11に示す配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する第2IgG1CH3ドメインであって、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである、第2IgG1CH3ドメインとを含むか；または

(b)(i)配列番号11に示す配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する第1IgG1CH3ドメインであって、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンである、第1IgG1CH3ドメインと；

(ii)配列番号11に示す配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する第2IgG1CH3ドメインであって、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置397のアミノ酸がイソロイシンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである、第2IgG1CH3ドメインとを含み、

(i)及び(ii)においてアミノ酸位置がEU付番方式に基づくものであり、

前記第1IgG1CH3ドメインと前記第2IgG1CH3とが対合してヘテロ二量体を形成している、ヘテロ二量体化モジュール。

【請求項12】

(I)第1IgG1CH2ドメイン及び第2IgG1CH2ドメインをさらに含み、前記第1IgG1CH2ドメインが前記第1IgG1CH3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第2IgG1CH2ドメインが前記第2IgG1CH3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、

(a)2本のポリペプチド鎖を含んでいる第1Fabをさらに含み、前記Fabの前記2本のポリペプチド鎖のうちの1本のC末端が、第1ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第1ヒンジ領域が前記第1IgG1CH2ドメインのN末端に繋がれているか；

(b)VHドメイン、CH1ドメイン、VLドメイン及びCLドメインをさらに含み、

(i)前記VHドメインのC末端がCH1ドメインのN末端に繋がれており、前記CH1ドメインのC末端が第1ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第1ヒンジ領域のC末端が、前記第1IgG1CH3ドメインに直接繋がられた前記第1IgG1CH2ドメインのN末端に繋がれており、

(ii)前記VLドメインのC末端が前記CLドメインのN末端に繋がれており、前記CLドメインのC末端が第2ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第2ヒンジ領域のC末端が、前記第2IgG1CH3ドメインに直接繋がられた前記第2IgG1CH2ドメインのN末端に繋がれており、

(iii)前記VHドメインと前記VLドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成しているか；または

(c)第1VH及び第1VLならびに第2VH及び第2VLをさらに含み、前記第1VHと前記第1VLとが対合して、第1抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成しており、前記第2VHと前記第2VLとが対合して、前記第1抗原の別のエпитープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成しているか；あるいは

(II)第1IgG4CH2ドメイン及び第2IgG4CH2ドメインをさらに含み、前記第1IgG4CH2ドメインが前記第1IgG1CH3ドメインのN末端に(i

）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインが、前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、

（ a ） 2 本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a b をさらに含み、前記 F a b の前記 2 本のポリペプチド鎖のうちの 1 本の C 末端が、第 1 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており、前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域が第 1 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられているか；

（ b ） V H ドメイン、C H 1 ドメイン、V L ドメイン及び C L ドメインをさらに含み、  
（ i ）前記 V H ドメインの C 末端が前記 C H 1 ドメインの N 末端に繋がられており、前記 C H 1 ドメインの C 末端が第 1 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており、前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた前記第 1 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられており、

10

（ i i ）前記 V L ドメインの C 末端が C L ドメインの N 末端に繋がられており、前記 C L ドメインの C 末端が第 2 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており、前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられており、

（ i i i ）前記 V H ドメインと前記 V L ドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成しているか；または

（ c ）第 1 V H 及び第 1 V L ならびに第 2 V H 及び第 2 V L をさらに含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の別のエピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、請求項 1 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

20

#### 【請求項 1 3】

要素（ I ）（ a ）が、第 2 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 F a b をさらに含む、請求項 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

#### 【請求項 1 4】

要素（ I ）（ c ）において、前記第 1 V L のアミノ酸配列が、前記第 2 V L のアミノ酸配列と同一である、請求項 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

30

#### 【請求項 1 5】

要素（ I I ）において、前記第 1 及び / または第 2 I g G 4 ヒンジ領域が S 2 2 8 P 突然変異（ E U 付番）を含む、請求項 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

#### 【請求項 1 6】

要素（ I I ）（ a ）が、第 2 I g G 4 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 F a b をさらに含む、請求項 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

#### 【請求項 1 7】

要素（ I I ）（ c ）において、前記第 1 V L のアミノ酸配列が、前記第 2 V L のアミノ酸配列と同一である、請求項 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

40

#### 【請求項 1 8】

二特異性抗体であって、

（ i ）第 1 V H 及び第 1 V L であって、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E（ I g E ）の C H 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 1 ）のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 1 ）のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる

50

第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成している、第 1 V H 及び第 1 V L と；

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L であって、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成している、第 2 V H 及び第 2 V L と；

10

( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( A ) ( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がセリンである、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと；

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンである、第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含むか；または

( B ) ( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がロイシンである、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと；

20

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 3 9 7 のアミノ酸がイソロイシンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンである第 2 I g G 1 C H 3 とを含み、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、ヘテロ二量体化モジュールとを含む、二特異性抗体。

#### 【請求項 1 9】

二特異性抗体であって、

30

( i ) 第 1 V H 及び第 1 V L であって、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成している、第 1 V H 及び第 1 V L と；

40

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L であって、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成している、第 2 V H 及び第 2 V L と；

( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( A ) ( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジ

50

ンであり、位置 409 のアミノ酸がセリンである、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと；

( b ) 配列番号 11 に示す配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 370 のアミノ酸がセリンであり、位置 405 及び 409 のアミノ酸がリジンである、第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含むか；または

( B ) ( a ) 配列番号 11 に示す配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 364 及び 370 のアミノ酸がリジンであり、位置 409 のアミノ酸がロイシンである、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと；

( b ) 配列番号 11 に示す配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインであって、位置 370 のアミノ酸がセリンであり、位置 397 のアミノ酸がイソロイシンであり、位置 405 及び 409 のアミノ酸がリジンである、第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含み、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、ヘテロ二量体化モジュールとを含む、二特異性抗体。

#### 【請求項 20】

請求項 18 または 19 に記載の二特異性抗体であって、

( I ) 2 つの I g G 1 C H 2 ドメイン；または

( I I ) 2 つの I g G 4 C H 2 ドメイン

をさらに含む、ならびに / あるいは

( a ) 単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含むか；

( b ) 単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含むか；

( c ) 単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V L と前記第 2 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含むか；または

( d ) 単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V L と前記第 2 ポリペプチドと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、

二特異性抗体。

#### 【請求項 21】

要素 ( I I ) ( a ) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V H と前記 C H 1 ドメインと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、請求項 20 に記載の二特異性抗体。

#### 【請求項 22】

要素 ( I I ) ( b ) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V H と前記 C H 1 ドメインと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、請求項 20 に記載の二特異性抗体。

#### 【請求項 23】

要素 ( I I ) ( c ) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V L と前記 C L ドメインと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、請求項 20 に記載の二特異性抗体。

#### 【請求項 24】

要素 ( I I ) ( d ) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V L と前記 C L ドメインと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、請求項 20 に記載の二特異性抗体。

#### 【請求項 25】

前記第 1 ポリペプチド及び / または前記第 2 ポリペプチドが、

( a ) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列；

( b ) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 107 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列；

10

20

30

40

50



- (c) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 107 ;
- (d) 鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号 1 の 2 つのシステイン残基のうちの少なくとも 1 つに存在するシステイン以外のアミノ酸 ;
- (e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列 ;
- (f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ;
- (g) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112 ; または
- (h) 鎖間ジスルフィド結合を形成することができる配列番号 2 のシステイン残基におけるシステイン以外のアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 4 及び 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

## 【請求項 26】

前記第 1 ポリペプチドが、

- (a) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ; または

(b) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 または 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 27】

前記第 2 ポリペプチドが、

- (a) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ; または

(b) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 または 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

## 【請求項 28】

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、

- (a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列 ;
  - (b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 107 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ;
  - (c) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 107 ;
  - (d) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列 ;
  - (e) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ; または
  - (f) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112
- を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

30

## 【請求項 29】

前記第 1 ポリペプチド及び前記第 3 ポリペプチドが各々、

- (a) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ; または

(b) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の四価抗体。

40

## 【請求項 30】

前記第 2 ポリペプチド及び前記第 4 ポリペプチドが各々、

- (a) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列 ; または

(b) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の四価抗体。

## 【請求項 31】

50

( i ) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び / もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 または配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか ; または、

( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び / もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 または配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有し、

配列番号 1 の前記 N グリコシル化モチーフが N I T 配列であり、配列番号 2 の前記 N グリコシル化モチーフが N A S 配列である、

請求項 1 ~ 4、1 8 ~ 2 4 または 2 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本願は、2015年12月18日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 2 6 9 , 6 6 4 号に対する優先権の利益を主張するものであり、その内容を参照により全体的に本明細書に援用する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

二特異性抗体の生物学的薬剤としての使用は、主に、従来型の 2 つの単一特異性抗体の併用によって獲得することができない新規作用機序をもたらす潜在性ゆえに、益々関心を集めている。そのため、二特異性抗体を生成する効率的な方法が模索されている。生物学的薬剤としての二特異性抗体を作製する初期の試みは、単一特異性抗体の化学的結合と m A b 発現細胞の融合とを伴うものであったが、効率の低さ及び大量の副生成物による精製の必要性がこれらの方策の欠点である。タンパク質工学及び分子生物学において進歩した方法は、多様な新規二特異性抗体構成の作製を可能にした。しかしながら、これらの操作された二特異性抗体構成の、変化した生化学的 / 生物物理学的特性、血中半減期または安定性は、好ましくない場合がある。よって、これらの問題のいくつかを克服し得る二特異性抗体を作製するための効率的な基幹は有用であろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 3 】

本願は、異なるエピトープに結合する任意の 2 つの抗体を二特異性抗体に変換することができる抗体基幹技術に関する。この基幹技術は、一部において、F c 領域をその C H 3 ドメインにおけるリジン再配置によって操作して二特異性抗体の 2 本の重鎖のヘテロ二量体化を引き起こすことを含む。さらに、この技術は、二特異性抗体の軽鎖の誤対合を防止すべく二特異性抗体の 2 つの F a b アームのうち的一方を改変することを含む。具体的には、二特異性抗体の片方の F a b アームの C H 1 ドメイン及び C L ドメインを I g E C H 2 ドメインまたは I g M C H 2 ドメインで置き換える。ある場合には、二特異性抗体の片方の F a b アームの C H 1 ドメイン及び C L ドメインが I g E C H 2 ドメイン ( または I g M C H 2 ドメイン ) の断片で置き換わっており、当該断片は、なおも I g E C H 2 ドメイン ( または I g M C H 2 ドメイン ) と二量体化することができるものである。

【 0 0 0 4 】

一態様において、本開示は、第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) と第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) とを含んでいる、抗体またはその抗原結合性断片であって、第 1 V H と第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成している、当該抗体またはその抗原結合性断片を提供する。第 1 V H は、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7

10

20

30

40

50

と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに直接繋がられているかまたはリンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1VLは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに直接繋がられているかまたはリンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。

【0005】

この態様の特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドはFcドメインに直接繋がられている。ある場合には、FcドメインはIgG1抗体のCH2及びCH3ドメインを含む。ある場合には、FcドメインはIgG4抗体のCH2及びCH3ドメインを含む。ある場合には、FcドメインはIgG4抗体のCH2とIgG1抗体のCH3ドメインとを含む。これら全ての実施形態のうちのいくつかでは、FcドメインはIgG4抗体のヒンジ領域(例えばIgG4P-すなわち、S228P突然変異を有するIgG4ヒンジ領域)を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチドは、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。具体的な実施形態において、第1ポリペプチドは、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2ポリペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。具体的な実施形態において、第2ポリペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸9~107に示すアミノ酸配列とは12個以下のアミノ酸残基が異なっている。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号1の2つのシステイン残基のうちの少なくとも1つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは各々、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、IgE CH2ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している(例えば、アスパラギン及び/またはスレオニン残基が別のアミノ酸で置換されている)。特定の実施形態では、第1ポリペプチドまたは第2ポリペプチドは、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、IgE CH2ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している。特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、第2重鎖可変ドメイン(第2VH)と第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)とを含み、第2VHと第2VLとが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。特定の実施形態では、第2VHはCH1ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2VLはCLドメインに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。特定の実施形態では、本開示は、上記の抗体または抗原結合性断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記の1つ以上のポリヌクレオチドを含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、上記の抗体または抗原結合性断片を作る方法であって、上記の抗体または抗原結合性断片の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から抗体または抗原結合性断片を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された抗体または抗原結合性断片は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

第2の態様において、本開示は、第1 V Hと第1 V Lとを含んでいる、抗体またはその抗原結合性断片を提供し、第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成している。第1 V Hは、ヒト免疫グロブリンM ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 V L は、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。

10

## 【 0 0 0 7 】

この態様の特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは F c ドメインに直接繋がられている。ある場合には、F c ドメインは I g G 1 抗体の C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。ある場合には、F c ドメインは I g G 4 抗体の C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。ある場合には、F c ドメインは I g G 4 抗体の C H 2 と I g G 1 抗体の C H 3 ドメインとを含む。これら全ての実施形態のうちのいくつかでは、F c ドメインは I g G 4 抗体のヒンジ領域 ( 例えば I g G 4 P - すなわち、S 2 2 8 P 突然変異を有する I g G 4 ヒンジ領域 ) を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号 2 のシステイン残基においてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは各々、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、I g M C H 2 ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している ( 例えば、アスパラギン及び/またはセリン残基が別のアミノ酸で置換されている ) 。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチドまたは第2ポリペプチドは、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、I g M C H 2 ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している。特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、第2重鎖可変ドメイン ( 第2 V H ) と第2軽鎖可変ドメイン ( 第2 V L ) とを含み、第2 V H と第2 V L とが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。特定の実施形態では、第2 V H は C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2 V L は C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。特定の実施形態では、本開示は、上記の抗体または抗原結合性断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記の1つ以上のポリヌクレオチドを含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、上記の抗体または抗原結合性断片を作る方法であって、上記の抗体または抗原結合性断片の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から抗体または抗原結合性断片を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された抗体または抗原結合性断片は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

20

30

40

## 【 0 0 0 8 】

50

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1 V Hと第1 V Lとを含んでいる第1抗原結合性断片(第1 F a b)を含み、第1 V Hと第1 V Lとが対合して第1可変領域を形成している、当該二特異性抗体を提供する。第1 V Hは、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9 ~ 107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 V Lは、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9 ~ 107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。二特異性抗体はさらに、第2 V Hと第2 V Lとを含んでいる第2 F a bを含み、第2 V Hと第2 V Lとが対合して第2可変領域を形成しており、第2 V HはC H 1 ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2 V LはC L ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 F a b及び第2 F a bは、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合するものであり、第1 F a bは第2 F a bに連結されている。

10

#### 【0009】

この態様のいくつかの実施形態では、第1 F a bはリンカーによって第2 F a bに連結される。特定の実施形態では、第1 F a bは異種ポリペプチドによって第2 F a bに連結される。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはX T E N(例えば、A E 144、A E 288)である。いくつかの実施形態では、第1 F a bはポリエチレングリコール(P E G)によって第2 F a bに連結される。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは各々、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9 ~ 107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9 ~ 107を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチドは、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチドは、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第2ポリペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2ポリペプチドは、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸9 ~ 107に示すアミノ酸配列とは12個以下のアミノ酸残基が異なっている。他の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、鎖間ジスルフィド結合を形成することができる配列番号1の2つのシステイン残基のうちの少なくとも1つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、I g E C H 2 ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している。例えば、I g E C H 2 ドメインのN結合型グリコシル化部位のアスパラギン及び/またはスレオニンが別のアミノ酸で置換されてこのモチーフのグリコシル化を防止していてもよい。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

20

30

40

#### 【0010】

50

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1 V Hと第1 V Lとを含んでいる第1抗原結合性断片(第1 F a b)を含み、第1 V Hと第1 V Lとが対合して第1可変領域を形成している、当該二特異性抗体を提供する。第1 V Hは、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 V Lは、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。二特異性抗体はさらに、第2 V Hと第2 V Lとを含んでいる第2 F a bを含む。第2 V Hと第2 V Lとが対合して第2可変領域を形成しており、第2 V HはC H 1 ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2 V LはC L ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 F a b及び第2 F a bは、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合する。第1 F a bは第2 F a bに連結されている。

#### 【0011】

この態様のいくつかの実施形態では、第1 F a bはリンカーによって第2 F a bに連結される。特定の実施形態では、第1 F a bは異種ポリペプチドによって第2 F a bに連結される。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはX T E N(例えば、A E 1 4 4、A E 2 8 8)である。いくつかの実施形態では、第1 F a bはポリエチレングリコール(P E G)によって第2 F a bに連結される。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは各々、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7~112と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7~112を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、鎖間ジスルフィド結合を形成することができる配列番号2のシステイン残基においてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように、I g M C H 2 ドメインまたはその断片においてN結合型グリコシル化部位の突然変異を含有している。例えば、I g M C H 2 ドメインのN結合型グリコシル化部位のアスパラギン及び/またはセリンが別のアミノ酸で置換されてこのモチーフのグリコシル化を防止していてもよい。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

#### 【0012】

別の態様において、本開示は、四価二特異性抗体であって、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する全 I g G 抗体を含み、全 I g G 抗体が第1 C H 3 ドメイン及び第2 C H 3 ドメインを含むものであり;さらに、第1 F a b及び第2 F a bを含む、当該四価二特異性抗体を提供する。第1 F a bは、第1重鎖可変ドメイン(第1 V H)及び第1軽鎖可変ドメイン(第1 V L)を含み、第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原の第2エ

10

20

30

40

50

ピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成している。第2Fabは、第2重鎖可変ドメイン(第2VH)及び第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)を含み、第2VHと第2VLとが対合して、第1Fabと同じエピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成している。第1VHは、ヒト免疫グロブリンE(IgE)のCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1VLは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2VHは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2VLは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1Fabは、全IgG抗体の第1CH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは、全IgG抗体の第2CH3ドメインのC末端に連結されている。

#### 【0013】

この態様のいくつかの実施形態では、第1Fabは第1リンカーによって全抗体の第1CH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは第2リンカーによって全抗体の第2CH3ドメインのC末端に連結されている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1VHのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1VLのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2VHのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2VLのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第3ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第4ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1及び第2リンカーはペプチドリリンカーである。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び第3ポリペプチドは各々、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び第3ポリペプチドは各々、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第2ポリペプチド及び第4ポリペプチドは各々、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2ポリペプチド及び第4ポリペプチドは各々、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸9~107に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる

10

20

30

40

50

発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

#### 【0014】

別の態様において、本開示は、四価二特異性抗体であって、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する全IgG抗体を含み、全IgG抗体が第1CH3ドメイン及び第2CH3ドメインを含むものであり；さらに、第1Fab及び第2Fabを含む、当該四価二特異性抗体を提供する。第1Fabは、第1重鎖可変ドメイン（第1VH）及び第1軽鎖可変ドメイン（第1VL）を含み、第1VHと第1VLとが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成している。第2Fabは、第2重鎖可変ドメイン（第2VH）及び第2軽鎖可変ドメイン（第2VL）を含み、第2VHと第2VLとが対合して、第1Fabと同じエピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成している。第1VHは、ヒト免疫グロブリンM（IgM）のCH2ドメインのアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに（i）直接繋がられているかまたは（ii）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1VLは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに（i）直接繋がられているかまたは（ii）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2VHは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに（i）直接繋がられているかまたは（ii）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2VLは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに（i）直接繋がられているかまたは（ii）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1Fabは、全IgG抗体の第1CH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは、全IgG抗体の第2CH3ドメインのC末端に連結されている。

#### 【0015】

この態様のいくつかの実施形態では、第1Fabは第1リンカーによって全抗体の第1CH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは第2リンカーによって全抗体の第2CH3ドメインのC末端に連結されている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1VHのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1VLのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第1ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第1リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2VHのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第2VLのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第3ポリペプチドのN末端とを繋げている。特定の実施形態では、第2リンカーは、全抗体の第1CH3ドメインのC末端と第4ポリペプチドのN末端とを繋げている。いくつかの実施形態では、第1及び第2リンカーはペプチドリリンカーである。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7～112と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、

10

20

30

40

50



第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7～112を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸7～112に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

10

#### 【0016】

別の態様において、本開示は、四価二特異性抗体であって、第1Fab及び第2Fabを含み、第1Fabが第1重鎖可変ドメイン(第1VH)及び第1軽鎖可変ドメイン(第1VL)を含むものであり、第1VHと第1VLとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成しており、第2Fabが第2重鎖可変ドメイン(第2VH)及び第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)を含むものであり、第2VHと第2VLとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成している、当該四価二特異性抗体に関する。四価二特異性抗体はさらに、第1IgGCH2ドメイン及び第1IgGCH3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2IgGCH2ドメイン及び第2IgGCH3ドメインを含んでいる第2重鎖と、第1軽鎖と、第2軽鎖とを含む、全抗体を含み、当該抗体が、第3VH及び第3VLならびに第4VH及び第4VLを含むものであり、第3VHと第3VLとが対合して、第2抗原のエピトープに特異的に結合する第3可変領域を形成しており、第4VHと第4VLとが対合して、第2抗原の同じエピトープに特異的に結合する第4可変領域を形成している。第3VHは、ヒト免疫グロブリンE(IgE)のCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第3VLは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第4VHは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第4VLは、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドは第1IgGCH2ドメインのN末端に連結されており、第3ポリペプチドは第2IgGCH2ドメインのN末端に連結されている。第1Fabは第1IgGCH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは第2IgGCH3ドメインのC末端に連結されている。

20

30

40

#### 【0017】

この態様のいくつかの実施形態では、第1Fabは第1リンカーによって全抗体の第1CH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは第2リンカーによって全抗体の第2CH3ドメインのC末端に連結されている。特定の実施形態では、第1及び第2リンカーはペプチドリinkerである。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9～

50

107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107を含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び第3ポリペプチドは各々、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び第3ポリペプチドは各々、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第2ポリペプチド及び第4ポリペプチドは各々、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2ポリペプチド及び第4ポリペプチドは各々、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド、第2ポリペプチド、第3ポリペプチド及び/または第4ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸9~107に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

#### 【0018】

別の態様において、本開示は、四価二特異性抗体であって、第1Fab及び第2Fabを含み、第1Fabが第1重鎖可変ドメイン(第1VH)及び第1軽鎖可変ドメイン(第1VL)を含むものであり、第1VHと第1VLとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成しており、第2Fabが第2重鎖可変ドメイン(第2VH)及び第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)を含むものであり、第2VHと第2VLとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成している、当該四価二特異性抗体に関する。四価二特異性抗体はさらに、第1IgGCH2ドメイン及び第1IgGCH3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2IgGCH2ドメイン及び第2IgGCH3ドメインを含んでいる第2重鎖と、第1軽鎖と、第2軽鎖とを含む、全抗体を含み、当該抗体が、第3VH及び第3VLならびに第4VH及び第4VLを含むものであり、第3VHと第3VLとが対合して、第2抗原のエピトープに特異的に結合する第3可変領域を形成しており、第4VHと第4VLとが対合して、第2抗原の同じエピトープに特異的に結合する第4可変領域を形成している。第3VHは、ヒト免疫グロブリンM(IgM)のCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第3VLは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第4VHは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第4VLは、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドは第1IgGCH2ドメインのN末端に連結されており、第3ポリペプチドは第2IgGCH2ドメインのN末端に連結されている。第1Fabは第1IgGCH3ドメインのC末端に連結されており、第2Fabは第2IgGCH3ドメインのC末端に連結されている。

#### 【0019】

この態様のいくつかの実施形態では、第 1 F a b は第 1 リンカーによって全抗体の第 1 C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、第 2 F a b は第 2 リンカーによって全抗体の第 2 C H 3 ドメインの C 末端に連結されている。特定の実施形態では、第 1 及び第 2 リンカーはペプチドリリンカーである。いくつかの実施形態では、第 1 ポリペプチド、第 2 ポリペプチド、第 3 ポリペプチド及び/または第 4 ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第 1 ポリペプチド、第 2 ポリペプチド、第 3 ポリペプチド及び/または第 4 ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 ポリペプチド、第 2 ポリペプチド、第 3 ポリペプチド及び/または第 4 ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 を含む。特定の実施形態では、第 1 ポリペプチド、第 2 ポリペプチド、第 3 ポリペプチド及び/または第 4 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することとを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

#### 【 0 0 2 0 】

さらに別の態様において、本開示は、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がセリンであり；さらに、配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンである、当該ヘテロ二量体化モジュールを提供する。アミノ酸位置は E U 付番方式に基づくものである。第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと第 2 I g G 1 C H 3 とが対合してヘテロ二量体を形成している。

#### 【 0 0 2 1 】

この態様の特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第 1 I g G 1 C H 2 ドメイン及び第 2 I g G 1 C H 2 ドメインを含み、第 1 I g G 1 C H 2 ドメインは第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第 2 I g G 1 C H 2 ドメインは第 2 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。

#### 【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、2 本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a b を含み、F a b の 2 本のポリペプチド鎖のうちの 1 本の C 末端が、第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており、第 1 ヒンジ領域が第 1 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられている。

#### 【 0 0 2 3 】

他の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの C 末端と、第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 ヒンジ領域の N 末端とを繋げるリンカーを含む。特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第 2 ヒンジ領域を介して第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 F a b を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、V H ドメイン、C H 1 ドメイン、V L ドメイン及び C L ドメインを含む。V H ドメインの C 末端は C H 1 ドメインの N 末端に繋がられており、C H 1 ドメインの C 末端は第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており

10

20

30

40

50

、第1ヒンジ領域のC末端は、第1 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がられた第1 I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋がられている。V LドメインのC末端はC LドメインのN末端に繋がられており、C LドメインのC末端は第2ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第2ヒンジ領域のC末端は、第2 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がられた第2 I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋がられている。V HドメインとV Lドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している。

【0025】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1 V H及び第1 V Lならびに第2 V H及び第2 V Lを含む。第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成している。第2 V Hと第2 V Lとが対合して、第1抗原の別のエ

10

【0026】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1 I g G 4 C H 2ドメイン及び第2 I g G 4 C H 2ドメインを含み、第1 I g G 4 C H 2ドメインは第1 I g G 1 C H 3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2 I g G 4 C H 2ドメインは第2 I g G 1 C H 3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、2本のポリペプチド鎖を含んでいる第1 F a bを含み、F a bの2本のポリペプチド鎖のうちの1本のC末端が、第1 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第1 I g G 4 ヒンジ領域が第1 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がられている。ある場合には、第1 I g G 4 ヒンジ領域はS 2 2 8 P突然変異(E U付番)を含む。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、第1 I g G 1 C H 3ドメインのC末端と、第2 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がられた第2 I g G 4 ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンカーを含む。特定の場合には、第2 I g G 4 ヒンジ領域はS 2 2 8 P突然変異(E U付番)を含む。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、第2 I g G 4 ヒンジ領域を介して第2 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がられた第2 F a bを含む。特定の場合には、第2 I g G 4 ヒンジ領域はS 2 2 8 P突然変異(E U付番)を含む。

20

【0027】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、V Hドメイン、C H 1ドメイン、V Lドメイン及びC Lドメインを含む。V HドメインのC末端はC H 1ドメインのN末端に繋がられており、C H 1ドメインのC末端は第1 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第1 I g G 4 ヒンジ領域のC末端は、第1 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がられた第1 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がられている。V LドメインのC末端はC LドメインのN末端に繋がられており、C LドメインのC末端は第2 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第2 I g G 4 ヒンジ領域のC末端は、第2 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がられた第2 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がられている。V HドメインとV Lドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している。ある場合には、第1 I g G 4 ヒンジ領域及び第2 I g G 4 ヒンジ領域は各々、S 2 2 8 P突然変異(E U付番)を含む。

30

40

【0028】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1 V H及び第1 V Lならびに第2 V H及び第2 V Lを含む。第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成している。第2 V Hと第2 V Lとが対合して、第1抗原の別のエпитープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。ある場合には、第1 V Lのアミノ酸配列は第2 V Lのアミノ酸配列と同一である。

【0029】

特定の実施形態では、本開示は、上記ヘテロ二量体化モジュールをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを特徴とする。ある場合には、1つ以上のポリヌクレオチドを含んで

50

いる1つ以上の発現ベクターを特徴とする。他の場合には、1つ以上のポリヌクレオチドまたは1つ以上の発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールを製造する方法が包含される。方法は、ヘテロ二量体化モジュールの発現をもたらす条件下で宿主細胞を培養すること及びその単離を含む。

#### 【0030】

別の態様において、本開示は、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第1IgG1CH3ドメインを含み、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンであり；さらに、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第2IgG1CH3ドメインを含み、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置397のアミノ酸がイソロイシンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである、当該ヘテロ二量体化モジュールに関する。アミノ酸位置はEU付番方式に基づくものである。第1IgG1CH3ドメインと第2IgG1CH3とが対合してヘテロ二量体を形成している。

10

#### 【0031】

この態様の特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは第1IgG1CH2ドメイン及び第2IgG1CH2ドメインを含み、第1IgG1CH2ドメインは第1IgG1CH3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第2IgG1CH2ドメインは第2IgG1CH3ドメインのN末端に(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。

20

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、2本のポリペプチド鎖を含んでいる第1Fabを含み、Fabの2本のポリペプチド鎖のうちの1本のC末端が、第1ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第1ヒンジ領域が第1IgG1CH2ドメインのN末端に繋がられている。

#### 【0033】

他の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1IgG1CH3ドメインのC末端と、第2IgG1CH2ドメインのN末端に繋がられた第2ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンカーを含む。特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第2ヒンジ領域を介して第2IgG1CH2ドメインのN末端に繋がられた第2Fabを含む。

30

#### 【0034】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、VHドメイン、CH1ドメイン、VLドメイン及びCLドメインを含む。VHドメインのC末端はCH1ドメインのN末端に繋がられており、CH1ドメインのC末端は第1ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第1ヒンジ領域のC末端は、第1IgG1CH3ドメインに直接繋がられた第1IgG1CH2ドメインのN末端に繋がられている。VLドメインのC末端はCLドメインのN末端に繋がられており、CLドメインのC末端は第2ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第2ヒンジ領域のC末端は、第2IgG1CH3ドメインに直接繋がられた第2IgG1CH2ドメインのN末端に繋がられている。VHドメインとVLドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している。

40

#### 【0035】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1VH及び第1VLならびに第2VH及び第2VLを含む。第1VHと第1VLとが対合して、第1抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成している。第2VHと第2VLとが対合して、第1抗原の別のエピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。ある場合には、第1VLのアミノ酸配列は第2VLのアミノ酸配列と同一である。

#### 【0036】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1IgG4CH2ドメイン及び第2IgG4CH2ドメインを含み、第1IgG4CH2ドメインは第1IgG1

50

C H 3 ドメインのN末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、第 2 I g G 4 C H 2 ドメインは第 2 I g G 1 C H 3 ドメインのN末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、2本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a b を含み、F a b の2本のポリペプチド鎖のうちの1本のC末端が、第 1 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第 1 I g G 4 ヒンジ領域が第 1 I g G 4 C H 2 ドメインのN末端に繋がられている。ある場合には、第 1 I g G 4 ヒンジ領域は S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインのC末端と、第 2 I g G 4 C H 2 ドメインのN末端に繋がられた第 2 I g G 4 ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンカーを含む。10  
特定の場合には、第 2 I g G 4 ヒンジ領域は S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールは、第 2 I g G 4 ヒンジ領域を介して第 2 I g G 4 C H 2 ドメインのN末端に繋がられた第 2 F a b を含む。特定の場合には、第 2 I g G 4 ヒンジ領域は S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、V H ドメイン、C H 1 ドメイン、V L ドメイン及びC L ドメインを含む。V H ドメインのC末端はC H 1 ドメインのN末端に繋がられており、C H 1 ドメインのC末端は第 1 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第 1 I g G 4 ヒンジ領域のC末端は、第 1 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた第 1 I g G 4 C H 2 ドメインのN末端に繋がられている。V L ドメインのC末端はC L ドメインのN末端に繋がられており、C L ドメインのC末端は第 2 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がられており、第 2 I g G 4 ヒンジ領域のC末端は、第 2 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた第 2 I g G 4 C H 2 ドメインのN末端に繋がられている。V H ドメインとV L ドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している。ある場合には、第 1 I g G 4 ヒンジ領域及び第 2 I g G 4 ヒンジ領域は各々、S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む。20

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第 1 V H 及び第 1 V L ならびに第 2 V H 及び第 2 V L を含む。第 1 V H と第 1 V L とが対合して、第 1 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成している。第 2 V H と第 2 V L とが対合して、第 1 抗原の別のエピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している。ある場合には、第 1 V L のアミノ酸配列は第 2 V L のアミノ酸配列と同一である。30

【 0 0 3 9 】

特定の実施形態では、本開示は、上記ヘテロ二量体化モジュールをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを特徴とする。ある場合には、1つ以上のポリヌクレオチドを含んでいる1つ以上の発現ベクターを特徴とする。他の場合には、1つ以上のポリヌクレオチドまたは1つ以上の発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。ある場合には、ヘテロ二量体化モジュールを製造する方法が包含される。方法は、ヘテロ二量体化モジュールの発現をもたらす条件下で宿主細胞を培養すること及びその単離を含む。40

【 0 0 4 0 】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第 1 V H 及び第 1 V L を含み、第 1 V H と第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成している、当該二特異性抗体を提供する。第 1 V H は、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第 1 V L は、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第 1 ポリペプチドと第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。二特異性抗50

体はさらに、第2 V H及び第2 V Lを含み、第2 V Hと第2 V Lとが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。第2 V HはC H 1ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2 V LはC Lドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。C H 1ドメインとC Lドメインとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第1 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンである、当該ヘテロ二量体化モジュールを含む。ヘテロ二量体化モジュールはさらに、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第2 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである。上記のアミノ酸位置は全てE U付番方式に基づくものである(I g E C H 2ドメインが、第1 I g G 1 C H 3ドメインまたは第2 I g G 1 C H 3ドメインを含んでいるポリペプチドの一部であってもよいことに留意することが重要である。)

10

#### 【0041】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1 V H及び第1 V Lを含み、第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成している、当該二特異性抗体を提供する。第1 V Hは、ヒト免疫グロブリンE(I g E)のC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 V Lは、ヒトI g EのC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、第2 V H及び第2 V Lを含み、第2 V Hと第2 V Lとが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。第2 V HはC H 1ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2 V LはC Lドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。C H 1ドメインとC Lドメインとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第1 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンである、当該ヘテロ二量体化モジュールを含む。ヘテロ二量体化モジュールはさらに、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第2 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置397のアミノ酸がイソロイシンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである。上記のアミノ酸位置は全てE U付番方式に基づくものである(I g E C H 2ドメインが、第1 I g G 1 C H 3ドメインまたは第2 I g G 1 C H 3ドメインを含んでいるポリペプチドの一部であってもよいことに留意することが重要である。)

20

30

40

#### 【0042】

上記2つの態様のいくつかの実施形態では、二特異性抗体は2つのI g G 1 C H 2ドメインを含む。上記2つの態様のいくつかの実施形態では、二特異性抗体は2つのI g G 4 C H 2ドメインを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Hと第1ポリペプチドと第1 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Hと第1ポリペプチドと第2 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。他の実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Lと第2ポリペプチドと第1 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。さらに他の実施形態では、単一のポリペプチド鎖

50

が第 1 V L と第 2 ポリペプチドと第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の単一のポリペプチド鎖が第 2 V H と C H 1 ドメインと第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の単一のポリペプチド鎖が第 2 V H と C H 1 ドメインと第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の単一のポリペプチド鎖が第 2 V L と C L ドメインと第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の単一のポリペプチド鎖が第 2 V L と C L ドメインと第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、第 1 ポリペプチド及び/または第 2 ポリペプチドは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第 1 ポリペプチド及び/または第 2 ポリペプチドは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、第 1 ポリペプチド及び/または第 2 ポリペプチドは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 を含む。他の実施形態では、第 1 ポリペプチドは、配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、第 1 ポリペプチドは、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第 2 ポリペプチドは、配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 2 ポリペプチドは、配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第 1 ポリペプチド及び/または第 2 ポリペプチドは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている。いくつかの実施形態では、第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは各々、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号 1 の 2 つのシステイン残基のうちの少なくとも 1 つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドは、第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドが N 結合型グリコシル化部位においてグリコシル化されないように、N 結合型グリコシル化部位において 1 つ以上の突然変異を有する。他の実施形態では、第 1 ポリペプチドまたは第 2 ポリペプチドは、第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドが N 結合型グリコシル化部位においてグリコシル化されないように、N 結合型グリコシル化部位において 1 つ以上の突然変異を有する。これらの突然変異は、N 結合型グリコシル化部位のアスパラギンまたはスレオニンまたはセリンからその他のアミノ酸（複数可）への突然変異であり得る。

#### 【 0 0 4 3 】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第 1 V H 及び第 1 V L を含み、第 1 V H と第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成している、当該二特異性抗体を提供する。第 1 V H は、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 ）のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第 1 V L は、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 ）のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第 1 ポリペプチドと第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、第 2 V H 及び第 2 V L を含み、第 2 V H と第 2 V L とが対合して、第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している。第 2 V H は C H 1 ドメインに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第 2 V L は C L ドメインに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、C H 1 ドメインと C L ドメインとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がセリンであり；さらに、配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジン



である、当該ヘテロ二量体化モジュールを含む。上記のアミノ酸位置はE U付番方式に基づくものである。

【0044】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1 V H及び第1 V Lを含み、第1 V Hと第1 V Lとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成している、当該二特異性抗体に関する。第1 V Hは、ヒト免疫グロブリンM (I g M) のC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1 V Lは、ヒトI g MのC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7~112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、第2 V H及び第2 V Lを含み、第2 V Hと第2 V Lとが対合して、第1抗原の第2エピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している。第2 V HはC H 1ドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかである。第2 V LはC Lドメインに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、C H 1ドメインとC Lドメインとが対合して二量体を形成している。二特異性抗体はさらに、ヘテロ二量体化モジュールであって、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第1 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンであり；さらに、配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第2 I g G 1 C H 3ドメインを含み、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置397のアミノ酸がイソロイシンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンである、当該ヘテロ二量体化モジュールを含む。上記のアミノ酸位置はE U付番方式に基づくものである。

【0045】

上記2つの態様のいくつかの実施形態では、二特異性抗体は2つのI g G 1 C H 2ドメインを含む。上記2つの態様のいくつかの実施形態では、二特異性抗体は2つのI g G 4 C H 2ドメインを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Hと第1 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Hと第2 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。他の実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Lと第1 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。さらに他の実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第1 V Lと第2 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第2 V Hと第2 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第2 V Hと第1 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、単一のポリペプチド鎖が第2 V Hと第2 I g G 1 C H 3ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは配列番号2に示すアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7~112と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列のアミノ酸7~112を含む。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び/または第2ポリペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている。いくつかの実施形態では、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは各々、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号2のシステイン残基においてシステイン以外のアミノ酸を含有している。特定の実施形態では、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドは、第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドがN結合型グリコシル化部位においてグリコシル化されないように、N結合型グリコシル化部位において1つ以上の突然変異を有する。他の実施形態では、第1ポリペプチドまたは第2ポリペプチドは、第1ポリペプ

チド及び第2ポリペプチドがN結合型グリコシル化部位においてグリコシル化されないように、N結合型グリコシル化部位において1つ以上の突然変異を有する。これらの突然変異は、N結合型グリコシル化部位のアスパラギンまたはスレオニンまたはセリンからその他のアミノ酸（複数可）への突然変異であり得る。特定の実施形態では、本開示は、上記二特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記二特異性抗体を含んでいる発現ベクターが提供される。他の実施形態では、二特異性抗体または発現ベクターを含んでいる宿主細胞が提供される。さらに他の実施形態では、二特異性抗体を作る方法であって、二特異性抗体の発現をもたらす条件下で上記宿主細胞を培養することと、細胞培養物から二特異性抗体を単離することを含む、当該方法が提供される。特定の実施形態では、単離された二特異性抗体は、無菌組成物として、それを必要とするヒト対象への投与のために製剤化される。

10

#### 【0046】

特に定義していない限り、本明細書中で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野において通常の技量を有する者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法または材料と同様または等価である方法または材料を本発明の実施または試験において使用することはできるが、典型的な方法及び材料を以下に記載する。本明細書中で言及する全ての刊行物、特許出願、特許及びその他の参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。係争の場合には、定義を含めた本願によって立証されよう。材料、方法及び実施例は、例示的なものに過ぎず、限定することは意図されない。

20

#### 【0047】

本発明のその他の特徴及び利点は以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0048】

【図1】非対称抗体における誤対合による望ましくない副生成物の模式図である。この図は、2つの抗体が共発現する場合に軽鎖及び/または重鎖の誤対合によっていくつかの望ましくない副生成物が形成され得ることを示す。所望の非対称抗体は少ない部分を構成し得、その所望の抗体の精製は困難を呈し得る。

【図2】リジン再配置によるCH3ヘテロ二量体化の模式図である。ヒトIgG1の野生型CH3ドメインの通常の前・尾ホモ二量体においてリジン370及びリジン409は積み重なっている。単量体Aにおける突然変異S364K/K409S及び単量体Bにおける突然変異K370S/F405Kは、積み重なったリジンの配向を逆転させて、A/Bヘテロ二量体の形成を可能としながらホモ二量体における衝突をもたらす（下側）。こうしてリジン再配置は重鎖ヘテロ二量体化に効果的である方策を提供する。上に言及したアミノ酸位置はEU付番に基づくものである。

30

【図3A】IgG/Fcヘテロ二量体のSDS-PAGE分析の描写である。プロテインA精製した分量分のヘテロ二量体をSDS pageで分析した。IgG1とFcとのヘテロ二量体が主な種である。ノブ・イントゥ・ホール型である2つの画分を装填した。不完全設計MP1は、多量のヘテロ二量体を示すが、Fc二量体の形成を抑制する突然変異が欠けておりそれゆえにFc単量体を含有していない。

40

【図3B】LC-MSによって推定された成分のモル比及び相対量を示す棒グラフである。

【図3C】DSCによって決定された精製テロ二量体の融解温度の描写である。

【図4A】ヘテロ二量体化突然変異体の発現及び半抗体形成を示す。CHO細胞を、同じFab(M60-A02抗EGFR)を含有する様々な比率のmp4a及びmp4b重鎖でトランスフェクトした。発現したタンパク質における半抗体形成をSDS-PAGEによって分析した。

【図4B】半抗体形成を定量するために使用した一連の質量スペクトルを示す。試料のMSスペクトルは、トランスフェクション比1:1で最大量のヘテロ二量体と最少のホモ二量体とが存在することを示した。

50

【図 5 A】軽鎖対合問題に対する本願の解決策の 1 つである E - f a b の作出の模式図である。E - f a b において C H 1 及び C L は、天然の二量体を形成するものである I g E C H 2 ( C 2 ) ドメインで置き換わっている。

【図 5 B】I g フォールドの全体的類似性を示す、ヒト C 2 ドメイン ( 白 ) とヒト I g G 1 C H 1 / カッパ定常ドメイン ( 黒 ) との構造の重ね合わせである。C 2 ドメインは、界面の上側部分では様々な角度及びより長い距離で対合しているが、下側の界面ではより密にパッキングされている。ストランド A の始まる場所にある P r o ( 球として表されている ) は、C H 1 / C L 及び C 2 ドメインにおいて非常に似通った位置及び配向にある。

【図 5 C】ヒト I g G 1 C H 1 及びカッパ定常ドメインならびに C 2 ドメインならびに E - F a b 重軽鎖の配列アラインメントである。配列は上に示されている I M G T 付番に整列しており、I g フォールドの 7 つのストランドは矢印で示されており、ストランド A の始まる場所にある保存された P r o は下線の付いた太字で示されている。E - F a b における a g l y 突然変異 ( N 3 8 Q ) 及び鎖間ジスルフィドシステインも下線の付いた太字で示されている。

10

【図 5 D】ヒト、チンパンジー、マウス、ラット及びウサギに由来する I g E C H 2 ドメインの配列アラインメントである。同一の残基は点で示されている。

【図 6 A】軽鎖対合について試験する方策の模式図である。F a b A の重鎖 ( H C A ) は H S A と融合しており、他方、F a b B の軽鎖 ( L C B ) は N 末端において G F P でタグ付けした。鎖の正しい対合は F a b の分子量によって確認することができる。

20

【図 6 B】S D S - p a g e による F a b 対合の分析である。示されている H S A タグ付抗 E G F R M 6 0 - A 0 2 F a b または E - F a b は、G F P タグ付 F a b 抗 I G F - 1 R C 0 6 と共発現させた ( 表 3 も参照のこと ) 。重軽鎖の正しい対合によって非還元条件下で 1 1 4 k D a 及び 7 4 k D a にバンドが生じ、他方、4 7 k D a または 1 4 0 k D a のバンドは誤対合を指し示している。

【図 6 C】S D S - p a g e による F a b 対合の分析である。抗 I G F - 1 R F a b C 0 6 を E - f a b として組み立て、別の抗 I G F - 1 R F a b ( G 1 1 ) との軽鎖対合を、図 6 B に示すように試験した。

【図 6 D】O c t e t によって試験したときの抗 I G F - 1 R E - F a b の結合性を描写するグラフである。F a b を個々に発現させ、プロテイン A スピニングカラムで精製し、H i s チップ上に装填した可溶性 I G F 1 - R に対する O c t e t 結合性 ( 3 0 0 n M 、 1 0 0 n M 及び 3 0 n M ) において使用した。

30

【図 7】E - F a b 及びリジン再配置を有する非対称 I g G の模式図である。軽鎖対合の問題を解決するために、片方の F a b アームの定常ドメインが E - F a b で置き換わっている一方で、もう片方の F a b アームは野生型 I g G C H 1 / C L ドメインを含有する。ヘテロ二量体化を強化すべくリジン再配置突然変異が 2 本の重鎖の C H 3 ドメインに含まれている。

【図 8 A】C H O - S 細胞で発現した E G F R / I G F - I R 二特異性抗体及び上清の S D S - P A G E による分析である。E 体である E 0 及び E 2 が E - F a b として抗 E G F R を含有する一方、I g G 1 ヘテロ二量体対照は軽鎖解決策を含有していない。

40

【図 8 B】図 8 A の非対称 I g G についての質量分析を表したものの、それは、E 体では軽鎖誤対合を示していないが、対照では誤対合 L C を有する抗体を著しい量で示している。重鎖ホモ二量体はどちらの試料においても検出できなかった。

【図 8 C】H i s タグ付 E G F R に対する二特異性抗体の結合性を描写するグラフである。C H O - S 細胞からの未希釈の上清を、h i s タグ付リガンド ( 5 μ g / m L ) 装填後に O c t e t 結合性において使用した。

【図 8 D】H i s タグ付 I G F - 1 R に対する二特異性抗体の結合性を描写するグラフである。C H O - S 細胞からの未希釈の上清を、h i s タグ付リガンド ( 5 μ g / m L ) の装填後の O c t e t 結合性において使用した。

【図 9】図 9 A は、トラスツズマブ / セツキシマブ二特異性抗体と 2 つの抗原との同時結

50

合性を描写するグラフである。H i s タグ付可溶性 H E R 2 ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップ上に装填して、次のステップでの二特異性抗体 ( 2 0 0 n M ) の捕捉に備えた。その後の E G F R ( 1 5  $\mu$  g / m l ) の結合性は、二特異体による両方のリガンドとの同時結合性を実証している。図 9 B は、図 9 A に示す実験とは逆の結果を描写するグラフである。最初に E G F R を装填し、その後に二特異性抗体及び H E R 2 を結合させた。

【図 1 0】図 1 0 A は、様々なエルボーリンカー配列を有する E f a b 構築物を示す。抗 H E R 2 抗体であるトラスツズマブを E f a b として操作した。軽鎖中に含ませた様々なエルボーリンカー配列を表中に列挙する。配列は、エルボー配列 ( 太字 ) の他に可変ドメインの最後の 5 つのアミノ酸と I g E C H 2 ドメインの最初の 5 つのアミノ酸とを含む。図 1 0 B は、O c t e t 結合性試験のグラフである。C H O 細胞において ( 図 9 の場合と同様に ) E f a b をセツキシマブとの非対称 I g G として発現させ、精製し、抗 H i s チップ上に装填した H i s タグ付 H E R 2 ( 5  $\mu$  g / m l ) と共に O c t e t 結合性試験において使用した ( 1 0 0 n M ) 。図 1 0 C は、S D S - p a g e による F a b 対合の分析である。I g M C H 2 ドメインが I g E C H 2 ドメインと同じく良好に軽鎖対合を解決することができるか否かを評価するために、2 つの F a b ( 抗 E G F R M 6 0 及び抗 I G F - 1 R C 0 6 ) を共発現させた ( 片方の F a b は H S A と融合させ、もう片方の F a b は G F P と融合させた ) 。F a b のカップ及び C H 1 定常ドメインを I g M C H 2 ドメインで置き換えた ( 結果として生じた分子は M - F a b と命名した ) 。鎖対合についての S D S - P A G E による分析によって、M - F a b は、対照において顕著に認められた M 6 0 と C 0 6 との間での軽鎖誤対合を解決したことが示された。図 1 0 D は、O c t e t 結合性試験のグラフである。C H O - S において E f a b 及び M - F a b を F a b ( F c を欠く ) として発現させ、H E R 2 との結合性を O c t e t によって試験するために上清を使用した。

【図 1 1】図 1 1 A は、m p 3 ヘテロ二量体突然変異を含有する I g G 1 a g l y ( T 2 9 9 A ) 定常領域と共に通常の F a b としての抗 E G F R M 6 0 - A 0 2 E f a b 及び抗 I G F 1 R M 1 3 . C 0 6 を含んでいる、C H O 細胞において発現させプロテイン A によって精製した二特異性抗体のゲルの写真を示す。図 1 1 B は、同時結合性に関して二特異体を試験した O c t e t 試験の結果を示す。上側のパネルでは、H i s タグ付可溶性 I G F 1 R ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップに結合させ、次いで二特異性抗体またはそれぞれの m A b と結合させた。第 3 ステップでは、第 2 抗原 ( E G F R ) を、示されているような抗体 - 抗原複合体と結合させた。第 3 ステップにおいて E G F R のない対照と比較したときの陽性信号は、同時結合性を実証している。下側のパネルでは、H i s タグ付可溶性 E G F R ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップに結合させ、次いで二特異性抗体またはそれぞれの m A b と結合させた。第 3 ステップでは、第 2 抗原 ( I G F 1 R ) を、示されているような抗体 - 抗原複合体と結合させた。第 3 ステップにおいて I G F 1 R のない対照と比較したときの陽性信号は、同時結合性を実証している。

【図 1 2】図 1 2 A は、E f a b と m p 4 ヘテロ二量体を含有する I g G 4 P / I g G 1 定常領域とを有する二特異性抗体の模式図である。抗体はさらに、定常ドメイン ( I g G 4 P / I g G 1 a g l y ) に N 2 9 7 Q 置換を含む。図 1 2 B は、抗 H E R 2 抗体ベルツズマブと抗 I G F 1 R 抗体 C 0 6 とを両配向で使用して作製した、( A ) に示すような二特異性抗体のゲルの写真であり、最初に付ける抗体の名前を常に E f a b とした。プロテイン A 精製した分量分の C H O 細胞由来のヘテロ二量体を S D S - P A G E で分析した。図 1 2 C は、可溶性 I G F 1 R と H E R 2 タンパク質とを使用する O c t e t によって試験したときの結合性の結果を示す。上側のパネルでは、H i s タグ付可溶性 I G F 1 R ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップに結合させ、次いで二特異性抗体またはそれぞれの m A b と結合させた。第 3 ステップでは、第 2 抗原 ( H E R 2 ) を、示されているような抗体 - 抗原複合体と結合させた。第 3 ステップにおいて H E R 2 のない対照と比較したときの陽性信号は、同時結合性を実証している。下側のパネルでは、H i s タグ付可溶性 H E R 2 ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップに結合させ、次いで二特異性抗体またはそれぞれの m A b と結合させた。第 3 ステップでは、第 2 抗原 ( I G F 1 R ) を、示されてい

10

20

30

40

50

るような抗体 - 抗原複合体と結合させた。第 3 ステップにおいて I G F 1 R のない対照と比較したときの陽性信号は、同時結合性を実証している。

【図 1 3】図 1 3 A は、重鎖の C 末端と融合している E f a b を有する I g G (「M a b - F a b」) の模式図である。図 1 3 B は、トラスツズマブと抗 I G F - 1 R 抗体 C 0 6 との M a b - F a b のゲルの写真である。トラスツズマブと抗 I G F - 1 R 抗体 C 0 6 との M a b - F a b を、C H O 細胞で一過的に発現させ、プロテイン A で精製した。S D S - P A G E は、タンパク質が正しく会合して約 2 4 0 k D a の M a b - F a b を形成したことを示している。図 1 3 C は、O c t e t によって試験した場合の結果を示す。H i s タグ付可溶性 I G F 1 R または H E R 2 ( 5  $\mu$  g / m l ) を O c t e t チップ上に装填して次のステップでの二特異性抗体 ( 2 0 0 n M ) の捕捉を可能にした。その後の第 2 リガンド ( 1 5  $\mu$  g / m l ) の結合性は、二特異性抗体による両リガンドの同時結合性を実証している。

10

【図 1 4】図 1 4 A は、L C - F c 融合及び F c ヘテロ二量体突然変異を含んでいる一価抗体の模式図である。図 1 4 B は、C H O 細胞から産生された L C - F c 一価抗体及び対応する二価 I g G 1 ( 抗 E G F R M 6 0 - A 0 2 ) についてのゲルの写真である。プロテイン A 精製した材料の S D S - P A G E は、一価 L C - F c 抗体の巧みな会合を示している。図 1 4 C は、様々な濃度での O c t e t 結合性試験において一価 L C - F c 及び二価 I g G を描写するグラフである。一価 L C - F c は強い結合性を欠き、抗原 - 抗体複合体の解離がみられる。

【図 1 5】図 1 5 A は、H A S ( 左 )、ペプチドリinker ( 右 ) によって通常の F a b に繋がれた E f a b を有する二特異性抗体の模式図を提供する。図 1 5 B は、C H O 細胞で発現させ、プロテイン A 精製し、S D S - P A G E で分析した、図 1 5 A に示すような 2 例の二特異体のゲルの写真である。抗 E G F R 抗体及び抗 I G F 1 R 抗体である M 6 0 - A 0 2 及び M 1 3 . C 0 6 を、両配向でそれぞれ E f a b または通常の F a b として使用した。図 1 5 C は、O c t e t 結合性試験において使用した精製二特異体のグラフである。これらの二特異体による両抗原の同時結合性は、二特異体が最初に E G F R と結合してその後に I G F - 1 R と結合した場合にのみ認められた。図 1 5 D は、O c t e t 結合性試験において使用した精製二特異体のグラフである。これらの二特異体による両抗原の同時結合性は、二特異体が最初に I G F - 1 R と結合してその後に E G F R と結合した場合には認められなかった。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 9 】

詳細な説明

二特異性抗体は、新しい治療作用機序を獲得する潜在性を有する、新興の部類の生物学的薬剤である。しかしながら、二特異性抗体を発現させかつ適切に形成させることに関連するいくつかの課題が存在する。具体的には、4 つの異なる鎖からなる非対称 I g G の形態で二特異性抗体を効率的に発現させるには 2 つの問題：いわゆる重鎖誤対合問題、及び軽鎖誤対合問題を解決しなくてはならない。2 つの異なる重鎖及び 2 つの異なる軽鎖が存在する場合、それらは異なるいくつかの並び替えで誤対合する可能性がある ( 図 1 を参照のこと ) 。したがって、適切に対合した二特異性抗体を形成させるには、2 つの重鎖がヘテロ二量体を形成せねばならず、各重鎖はその同族軽鎖と対合せねばならない。本開示は、異なるエピトープと結合するいかなる 2 つの抗体も非対称 I g G の形態の二特異性抗体に変換することができる二特異性抗体基幹を提供する。基幹は、リジン再配置と呼ばれる重鎖ヘテロ二量体化方策及び、抗体の可変ドメインの操作を必要としない軽鎖誤対合問題の解決策に基づく。一実施形態において、基幹は、二特異性抗体の 2 本の重鎖のヘテロ二量体化を引き起こすべく C H 3 ドメインにおいてリジン再配置によって操作された、F c 領域を含有している。別の実施形態では、片方の F a b アームの C H 1 及び C L ドメインが、I g E C H 2 ドメイン ( または I g M C H 2 ドメイン ) または I g E C H 2 ドメイン ( または I g M C H 2 ドメイン ) となおも対合することができるその断片で置き換わっている。この F a b の操作は、二特異性抗体の軽鎖の誤対合を軽減または防止するこ

30

40

50

とができる。本開示は、二特異性抗体基幹の設計、操作及び試験について記載し、それは共発現によって2つの抗体から非対称IgGを効率的に生み出すことができる。

#### 【0050】

軽鎖誤対合問題に対する解決策

図1に示されているような二特異性抗体における軽鎖(LC)：重鎖(HC)対の正しい会合をもたらすために、本明細書において開示する解決策は、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を、これらの鎖の定常ドメイン(すなわち、CL及びCH1ドメイン)がIgフォールドドメイン(または重軽鎖のIgフォールドドメイン間で安定なジスルフィド結合型二量体をなおも形成することができるその断片)で置き換えられるように軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を改変することである。

10

#### 【0051】

ある場合には、CH1及びCLドメインを置き換えるIgフォールドドメインは、IgEのCH2ドメイン(「CH2E」)、またはもう1つのCH2Eとの安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができるその断片である。典型的なCH2Eドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化1】

```

1      V C S R D F T P P T   V K I L Q S S C D G   G G H F P P T I
Q L   L C L V S G Y T P G   T I N I T W L E D G
5 1      Q V M D V D L S T A   S T T Q E G E L A S   T Q S E L T L S
Q K   H W L S D R T Y T C   Q V T Y Q G H T F E
1 0 1   D S T K K C A       (配列番号1)

```

20

上に示す配列において、鎖間ジスルフィド結合の形成に關与することができる2つのシステインは太字で示され；ドメイン内ジスルフィド結合を形成することができる2つのシステインは太字のイタリック体で示され；N結合型グリコシル化部位には下線を引いている。

#### 【0052】

別の場合には、重軽鎖のCH1及びCLドメインを置き換えるIgフォールドドメインは、IgMのCH2ドメイン(「CH2M」)、または安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができるその断片である。典型的なCH2Mドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

30

#### 【化2】

```

1      V I A E L P P K V S   V F V P P R D G F F   G N P R K S K L
I C   Q A T G F S P R Q I   Q V S W L R E G K Q
5 1      V G S G V T T D Q V   Q A E A K E S G P T   T Y K V T S T L
T I   K E S D W L G Q S M   F T C R V D H R G L
1 0 1   T F Q Q N A S S M C   V P       (配列番号2)

```

上に示す配列中、鎖間ジスルフィド結合の形成に關与することができるシステインは太字で表され；ドメイン内ジスルフィド結合を形成することができる2つのシステインはイタリック体で示され；N結合型グリコシル化部位には下線を引いている。

40

#### 【0053】

本開示は、軽鎖対合問題に対する解決策を利用する数例の抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、次式：

VH1構築物：VH1-L-X-CH2E(またはCH2M)；及び

VL1構築物：VL1-L-X-CH2E(またはCH2M)

を有するアミノ酸配列を特徴とし、式中、「VH1」及び「VL1」は、対合して第1エピトープに対する第1抗原結合部位を形成する重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインであり；「L」は任意でのリンカー(以下でさらに説明する)であり；「X」は任意でのエ

50

ルボー領域（以下でさらに説明する）であり；「C H 2 E」は、配列番号 1、または配列番号 1（例えば配列番号 1 のアミノ酸 9 ~ 1 0 7）と安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができるその断片を指し、「C H 2 M」は、配列番号 2、または配列番号 2（例えば配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 1 1 2）と安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができるその断片を指す。特定の実施形態では、V H 1 及び V L 1 構築物には「L」及び「X」の片方または両方が存在していない。

#### 【 0 0 5 4 】

別の実施形態では、抗体は、次式：

V H 1 構築物：V H 1 - X - L - C H 2 E（または C H 2 M）、及び

V L 1 構築物：V L 1 - X - L - C H 2 E（または C H 2 M）

を有するアミノ酸配列を特徴とする。

#### 【 0 0 5 5 】

さらなる実施形態において、抗体は、次式：

V H 1 構築物：V H 1 - L - X - L - C H 2 E（または C H 2 M）、及び

V L 1 構築物：V L 1 - L - X - L - C H 2 E（または C H 2 M）

を有するアミノ酸配列を特徴とする。

#### 【 0 0 5 6 】

上記 V H 1 構築物において C H 2 E を使用する場合には、対応する V L 1 構築物においても C H 2 E を使用する、ということは理解されるべきである。同様に、上記 V H 1 構築物において C H 2 M を使用する場合には、対応する V L 1 構築物においても C H 2 M を使用する。上記の対合した V H 1 及び V L 1 の構築物において C H 2 E 及び C H 2 M ドメインは、アミノ酸配列が同一であってもよいものの、それらが同一である必要はない。それらは例えば、1 2 個以下、1 1 個以下、1 0 個以下、9 個以下、8 個以下、7 個以下、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個もしくは 1 2 個のアミノ酸が異なってもよい。特定の実施形態では、上記の V H 1 及び V L 1 構築物の C H 2 E ドメインは、配列番号 1 とは 1 2 個以下、1 1 個以下、1 0 個以下、9 個以下、8 個以下、7 個以下、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個のアミノ酸位置（複数可）で異なっている。特定の実施形態では、上記の V H 1 及び V L 1 構築物の C H 2 M ドメインは、配列番号 2 とは 1 2 個以下、1 1 個以下、1 0 個以下、9 個以下、8 個以下、7 個以下、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個のアミノ酸位置（複数可）で異なっている。これらの違いは、アミノ酸の置換、欠失及び/または挿入の結果であり得る。例えば、配列番号 1 または 2 の N グリコシル化部位を改変することができる（例えば、配列番号 1 の N I T 配列において、N 残基を Q に変更することができ、または T 残基を A または C に変更することができ；配列番号 2 の N A S 配列において、N 残基を Q に変更することができ、または S 残基を A または C に変更することができる）。あるいは、またはさらに、ドメイン内ジスルフィド結合を形成する 1 つ以上のシステインを V H 1 及び V L 1 構築物のうちの片方の C H 2 E（または C H 2 M）ドメインにおいてのみ突然変異させてもよい。特定の場合には、V H 1 及び V L 1 構築物の両方の C H 2 E ドメイン（または C H 2 M ドメイン）において鎖間ジスルフィド結合形成に關与する 1 つ以上のシステインを（例えば保存性のアミノ酸で）置換する。また、C H 2 E ドメイン（または C H 2 M ドメイン）のホモ二量体化を防止する突然変異（例えば、配列番号 1 の位置 1 7 においてセリンを例えばイソロイシンまたはスレオニンで置換すること；及び配列番号 1 の位置 1 0 3 においてスレオニンを例えばグリシンまたはセリンで置換すること）を生じさせてもよい。ヒト、チンパンジー、マウス、ラット及びウサギに由来する I g E C H 2 ドメインのアラインメント（図 5 D）により、全ての種の間で保存されておらず生物活性を排除せずに置換することができる可能性のあるアミノ酸残基が、識別される。

#### 【 0 0 5 7 】

ある場合には、C H 2 E ドメインに対するアミノ酸置換は保存的であることができる。保存的な置換とは、あるアミノ酸で同様の特性を有する別のアミノ酸を置換することであ

10

20

30

40

50

る。保存的な置換としては、例えば、以下の群のうちに含まれる置換が挙げられる：バリン、アラニン及びグリシン；ロイシン、バリン及びイソロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン及びグルタミン；セリン、システイン及びスレオニン；リジン及びアルギニン；ならびにフェニルアラニン及びチロシン。非極性疎水性アミノ酸としては、例えば、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、例えば、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンが挙げられる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられる。負に帯電した（酸性）アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。上記の極性、塩基性または酸性の群のうちの1つのメンバーに対する、同じ群の別のメンバーによるいかなる置換も、保存的な置換として見なすことができる。

10

#### 【0058】

ある場合には、CH<sub>2</sub>Eドメインに対するアミノ酸置換は非保存性であり得る。非保存性の置換としては、例えば、(i)電気的に陽性の側鎖を有する残基（例えば、Arg、HisまたはLys）を（またはそれによって）電気的に陰性の残基（例えば、GluまたはAsp）で（またはそれを）置換するもの、(ii)親水性残基（例えば、SerまたはThr）を（またはそれによって）疎水性残基（例えば、Ala、Leu、Ile、PheまたはVal）で（またはそれを）置換するもの、(iii)システインまたはプロリンを（またはそれによって）その他の任意の残基で（またはそれを）置換するもの、または(iv)嵩高い疎水性または芳香族の側鎖を有する残基（例えば、Val、Ile、PheまたはTrp）を（またはそれによって）より小さい側鎖を有する（例えば、Ala、Ser）かもしくは側鎖を有しない（例えば、Gly）残基で（またはそれを）置換するものが挙げられる。

20

#### 【0059】

特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物のCH<sub>2</sub>Eドメインは、配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%同一であり、VH1及びVL1構築物のCH<sub>2</sub>Eドメインはなおも対合し合うことができる。特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物のCH<sub>2</sub>Eドメインは、配列番号3に示すアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%同一であり、VH1及びVL1構築物のCH<sub>2</sub>Eドメインはなおも対合し合うことができる。

30

#### 【0060】

特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物においてCH<sub>2</sub>Mドメインを採用する場合、CH<sub>2</sub>Mドメインは、配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%同一であり、VH1及びVL1構築物のCH<sub>2</sub>Mドメインはなおも対合し合うことができる。

40

#### 【0061】

アミノ酸配列同士のパーセント同一性は、BLAST2.0プログラムを使用して決定することができる。配列比較は、ギャップなしのアラインメントを用いかつデフォルトパラメータ（Blossom62行列、ギャップ存在コストは11、1残基あたりのギャッ

50



ブコストは1、ラムダ比率は0.85)を使用して行うことができる。BLASTプログラムで使用する数学的アルゴリズムについては、Altschul et al., Nucleic Acids Research, 25:3389-3402(1997)に記載されている。

#### 【0062】

特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物の両方において使用されるCH2Eドメインは配列番号1と100%同一である。いくつかの実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Eドメインは、配列番号1の断片、例えば、配列番号1のN及び/またはC末端のアミノ酸が欠けたものであり、なおかつそれは配列番号1によってコードされるポリペプチドと安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができる。例えば、配列番号1の断片は、配列番号1のN及び/またはC末端において20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個または1個のアミノ酸(複数可)が欠けたものであってもよい。特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Eドメインは、配列番号1のアミノ酸2~107、3~107、4~107、5~107、6~107、7~107、8~107、9~107、10~107、11~107、12~107、13~107、14~107、15~107、16~107、17~107、18~107、19~107、または20~107を含むかまたはそれからなる。他の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Eドメインは、配列番号1のアミノ酸2~106、3~106、4~106、5~106、6~106、7~106、8~106、9~106、10~106、11~106、12~106、13~106、14~106、15~106、16~106、17~106、18~106、19~106、または20~106を含むかまたはそれからなる。さらに他の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Eドメインは、配列番号1のアミノ酸2~105、3~105、4~105、5~105、6~105、7~105、8~105、9~105、10~105、11~105、12~105、13~105、14~105、15~105、16~105、17~105、18~105、19~105、または20~105を含むかまたはそれからなる。特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Eドメインは、配列番号1のアミノ酸9~107、9~106、9~105、9~104、9~103、9~102、9~101、9~100、9~99、9~98、または9~97を含むかまたはそれからなる。これら全ての実施形態では、配列番号1に示すアミノ配列と比べて1~12個(1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個)の置換が、上記のVH1及びVL1構築物において使用される片方または両方のCH2Eドメインに存在していてもよい。例えば、N結合型グリコシル化部位が突然変異していてもよく(例えば、NIT部位のアスパラギンがグルタミンで置換されていてもよく、またはNIT部位のスレオニンがアラニンまたはシステインで置換されていてもよく)；鎖間ジスルフィド結合形成に關与するシステインのうちの片方もしくは両方が別のアミノ酸(例えば、保存性アミノ酸)で置換されていてもよく；または、(CH2Eドメインが重鎖及び軽鎖の一部である場合に)重鎖：重鎖二量体もしくは軽鎖：軽鎖二量体の形成を防止する突然変異がCH2Eの中に導入されていてもよい。

#### 【0063】

特定の実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Mドメインは配列番号2と100%同一である。いくつかの実施形態では、上記のVH1及びVL1構築物において使用されるCH2Mドメインは、配列番号2の断片、例えば、配列番号2のN及び/またはC末端のアミノ酸が欠けたものであり、なおかつそれは配列番号2によってコードされるポリペプチドと安定なジスルフィド結合型二量体を形成することができる。例えば、配列番号2の断片は、配列番号2のN及び/またはC末端において20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個または1個のアミノ酸(複数可)が欠けた

10

20

30

40

50

ものであってもよい。特定の実施形態では、上記のV H 1及びV L 1構築物において使用されるC H 2 Mドメインは、配列番号2のアミノ酸2～112、3～112、4～112、5～112、6～112、7～112、8～112、9～112、10～112、11～112、12～112、13～112、14～112、15～112、16～112、17～112、18～112、19～112、または20～112を含むかまたはそれからなる。他の実施形態では、上記のV H 1及びV L 1構築物において使用されるC H 2 Mドメインは、配列番号2のアミノ酸2～111、3～106、4～111、5～111、6～111、7～111、8～111、9～111、10～111、11～111、12～111、13～111、14～111、15～111、16～111、17～111、18～111、19～111、または20～111を含むかまたはそれからなる。さらに他の実施形態では、上記のV H 1及びV L 1構築物において使用されるC H 2 Mドメインは、配列番号2のアミノ酸2～110、3～110、4～110、5～110、6～110、7～110、8～110、9～110、10～110、11～110、12～110、13～110、14～110、15～110、16～110、17～110、18～110、19～110、または20～110を含むかまたはそれからなる。特定の実施形態では、上記のV H 1及びV L 1構築物において使用されるC H 2 Mドメインは、配列番号1のアミノ酸7～112、7～111、7～110、7～109、7～108、7～107、7～105、7～104、7～103、7～102、7～101、7～100または7～99を含むかまたはそれからなる。これら全ての実施形態では、配列番号2に示すアミノ配列と比べて1～12個（1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個）の置換が、上記のV H 1及びV L 1の構築物において使用される片方または両方のC H 2 Mドメインに存在していてもよい。例えば、N結合型グリコシル化部位が突然変異していてもよく（例えば、N A S部位のアスパラギンがグルタミンで置換されていてもよく、またはN A S部位のセリンがアラニンまたはシステインで置換されていてもよく）；鎖間ジスルフィド結合形成に関与するシステインのうちの片方もしくは両方が別のアミノ酸（例えば、保存性アミノ酸）で置換されていてもよく；または、（C H 2 Mドメインが重鎖及び軽鎖の一部である場合に）重鎖：重鎖二量体もしくは軽鎖：軽鎖二量体の形成を防止する突然変異がC H 2 Mの中に導入されていてもよい。

#### 【0064】

一実施形態において、上記V H 1構築物において使用されるC H 2ドメインは、ヒト免疫グロブリンEのC H 2ドメインであり、そのNグリコシル化部位はグルタミンへと突然変異しており、最初の8つのアミノ酸はヒトIg G 1 C H 1ドメインの最初の5つのアミノ酸で置き換わっている。このC H 2 Eドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化3】

```

1      A S T K G P T V K I   L Q S S C D G G G H   F P P T I Q L L
C L   V S G Y T P G T I Q   I T W L E D G Q V M
5 1    D V D L S T A S T T   Q E G E L A S T Q S   E L T L S Q K H
W L   S D R T Y T C Q V T   Y Q G H T F E D S T
1 0 1   K K C A   (配列番号3)
```

#### 【0065】

一実施形態において、上記V L 1構築物において使用されるC H 2ドメインはヒト免疫グロブリンEのC H 2ドメインであり、この場合、そのNグリコシル化部位がグルタミンへと突然変異しており、最初の8つのアミノ酸がヒトカッパドメインの最初の5つのアミノ酸で置き換わっている。このC H 2 Eドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

10

20

30

40

50

## 【化 4】

1      RTVAAPT VKI    LQSSCDGGGH    FPPTIQLL  
 CL   VSGYTPGTI Q    ITWLEDGQVM  
 51      DVDLSTASTT    QEGELASTQS    ELTLSQKH  
 WL   SDRTYTCQVT    YQGHTFEDST  
 101   KKCA    (配列番号 4)

## 【0066】

別の実施形態では、上記 VH 1 構築物において使用されることになる、上記 VL 1 構築物とのヘテロ二量体を形成すべく操作されたヒト免疫グロブリン E の典型的な CH 2 ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 17 にあるセリンをイソロイシンで置き換えることによって作られる。この CH 2 E ドメインのアミノ酸配列を以下に示す（この配列では N 結合型グリコシル化部位も突然変異しており、配列番号 1 の最初の 8 つのアミノ酸が Ig G 1 CH 1 の最初の 5 つのアミノ酸で置き換わっていることに留意されたい）。

10

## 【化 5】

1      ASTKGPT VKI    LQSICDGGGH    FPPTIQLL  
 CL   VSGYTPGTI Q    ITWLEDGQVM  
 51      DVDLSTASTT    QEGELASTQS    ELTLSQKH  
 WL   SDRTYTCQVT    YQGHTFEDST  
 101   KKCA    (配列番号 5)

20

## 【0067】

上記 VL 1 構築物の VL ドメインに連結されることになる、上記 VH 1 構築物とのヘテロ二量体を形成すべく操作されたヒト免疫グロブリン E の典型的な CH 2 ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 103 にあるスレオニンをグリシンで置き換えることによって作られる。この CH 2 E ドメインのアミノ酸配列を以下に示す（この配列では N 結合型グリコシル化部位も突然変異しており、配列番号 1 の最初の 8 つのアミノ酸がカッパ鎖の最初の 5 つのアミノ酸で置き換わっていることに留意されたい）。

30

## 【化 6】

1      RTVAAPT VKI    LQSSCDGGGH    FPPTIQLL  
 CL   VSGYTPGTI Q    ITWLEDGQVM  
 51      DVDLSTASTT    QEGELASTQS    ELTLSQKH  
 WL   SDRTYTCQVT    YQGHTFEDSG  
 101   KKCA    (配列番号 6)

## 【0068】

特定の実施形態では、上記の VH 1 及び VL 1 構築物において使用される CH 2 E ドメインは、配列番号 5 及び / または 6 の C 末端切断を含む。特定の場合には、配列番号 5 及び / または配列番号 6 の C 末端から 9 つ、8 つ、7 つ、6 つ、5 つ、4 つ、3 つ、2 つまたは 1 つのアミノ酸が欠失している。具体的な実施形態において、上記 VH 1 構築物において使用される CH 2 E ドメインは、配列番号 5 のアミノ酸 1 ~ 103、1 ~ 102、1 ~ 101、1 ~ 100、1 ~ 99、1 ~ 98、1 ~ 97、1 ~ 96、または 1 ~ 95 を含むかまたはそれからなる。別の具体的な実施形態において、上記 VL 1 構築物において使用される CH 2 E ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 103、1 ~ 102、1 ~ 101、1 ~ 100、1 ~ 99、1 ~ 98、1 ~ 97、1 ~ 96、または 1 ~ 95 を含むかまたはそれからなる。さらに他の実施形態では、上記 VH 1 構築物において使用される CH 2 E ドメインは、配列番号 5 のアミノ酸 6 ~ 103、7 ~ 103、8 ~ 103、9 ~ 10

40

50

3、または10～103を含むかまたはそれからなる。さらに他の実施形態では、上記V L 1構築物において使用されるC H 2 Eドメインは、配列番号6のアミノ酸6～103、7～103、8～103、9～103、または10～103を含むかまたはそれからなる。特定の実施形態では、配列番号5及び/もしくは配列番号6またはそれらの上記の断片は、配列番号1に関してさらに5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下または1つの突然変異を追加で含有し得る。

#### 【0069】

特定の実施形態では、上記抗体はさらに、重鎖可変ドメイン「V H 2」及び軽鎖可変ドメイン「V L 2」を含み、V H 2はC H 1ドメインに連結されており、V L 2ドメインはC Lドメインに連結されており、V H 2とV L 2とが対合して第2エピトープに対する第2抗原結合部位を形成している。いくつかの実施形態では、上記抗体はさらに、2つのF cドメインを含む。F cドメインは、抗体のヒンジ領域、C H 2ドメイン及びC H 3ドメインを含む。特定の場合には、ヒンジ、C H 2及びC H 3ドメインはI g G 1に由来するものである。特定の場合には、ヒンジ及びC H 3ドメインはI g G 4に由来するものであり、C H 2ドメインはI g G 1に由来するものである。具体的な実施形態において、ヒンジ領域がI g G 4に由来するものである場合、それはS 2 2 8 P (E U付番)突然変異を含む。抗体の2つのF cドメインのうちの片方は、抗体の2つのF a bのうちの片方の、C H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のうちの片方に直接繋がられていてもよいし、リンカーを介して繋がられていてもよい。F c領域は、V H 1構築物またはV L 1構築物に繋がられ得る。F c領域は、突然変異(複数可)を有さない同じF c領域と比べて二特異性抗体の重鎖同士へのヘテロ二量体化を増すいかなる突然変異(複数可)を含んでいてもよい。例えば、F c領域は、ノブ・イントゥ・ホール型突然変異、電気指向型突然変異、または本願の実施例1の表2に記載されているその他の突然変異を含み得る。具体的な実施形態において、二特異性抗体のF c領域は、本明細書に記載のリジン再配置突然変異を含む。

#### 【0070】

特定の実施形態では、上記抗体はさらに、重鎖可変ドメイン「V H 2」及び軽鎖可変ドメイン「V L 2」を含み、V H 2はC H 1ドメインに連結されており、V L 2ドメインはC Lドメインに連結されており、V H 2とV L 2とが対合して第2エピトープに対する第2抗原結合部位を形成しているが、抗体にはF cドメイン(複数可)が欠けている。上記構築物のV H 1またはV L 1ドメインに繋がられたC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)は、V H 2及びV L 2ドメインを含む抗体に繋がられることができる。例えば、V H 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端が、V H 2に連結されているC H 1ドメインのC末端に繋がられていてもよいし、V H 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端がV H 2ドメインのN末端に繋がられていてもよい。その他の典型的な配置として、V L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端が、V H 2に連結されているC H 1ドメインのC末端に繋がられていてもよいし、V L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端がV H 2ドメインのN末端に繋がられていてもよい。その他の典型的な配置としては、例えば、V L 2に連結されているC LドメインのC末端に繋がられた、V H 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端、または、V L 2ドメインのN末端に繋がられた、V H 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端が挙げられる。さらなる典型的な配置としては、V L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端を、V L 2に連結されているC LドメインのC末端に繋げた配置、または、V L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)のC末端をV L 2ドメインのN末端に繋げた配置がある。ある場合には、V H 1構築物またはV L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)と、第2F a bとの間のリンカーは、ペプチドリinkerである。他の場合には、V H 1構築物またはV L 1構築物のC H 2 Eドメイン(またはC H 2 Mドメイン)と、第2F a bとの間のリンカーは、ヒト血清アルブミン(H S A)である。ある場合には、V H 1構築物またはV L 1構築物のC H 2 Eド

10

20

30

40

50

メイン（またはC H 2 Mドメイン）と、第2 F a bとの間のリンカーは、ポリエチレングリコールである。さらに他の場合には、V H 1構築物またはV L 1構築物のC H 2 Eドメインと、第2 F a bとの間のリンカーは、X T E N分子（例えば、A E - 1 4 4、A E - 2 8 8）である。

#### 【0071】

特定の場合には、V H 1及びV L 1構築物は四価二特異性抗体の一部である。これらの四価抗体は、( i ) 全抗体であって、その可変ドメインが抗原の1つのエピトープに結合する、当該全抗体と、( i i ) 同じ抗原または異なる抗原の別のエピトープに各々結合する2つのF a bとを含む。いくつかの実施形態では、全抗体はI g G 1である。他の実施形態では、全抗体はI g G 4 ( G 1 )、すなわち、I g G 4のヒンジ及びC H 2領域を含む一方でI g G 1のC H 3ドメインを含む抗体である。特定の実施形態では、全抗体はI g G 4 ( G 1 ) P、すなわち、ヒンジ領域にS 2 2 8 P ( E U付番) 突然変異を有することを別とすればI g G 4 ( G 1 ) である、抗体である。2つのF a bは、全抗体のC H 3ドメインのC末端に繋がられている。2つのF a bは、各F a bの2つの可変ドメイン（すなわちV HまたはV L）のうちの1つのN末端を介するかまたは2つのF a bのそれぞれの定常ドメインのうちの1つのC末端を介するかのどちらかで全抗体のC H 3ドメインに繋がられ得る。F a b定常ドメインがC H 2 E（またはC H 2 Mドメイン）で置き換わっていない場合には、C H 1ドメインのC末端またはC LドメインのC末端のどちらかと繋がられ得る。F a b定常ドメインがC H 2 Eドメイン（またはC H 2 Mドメイン）で置き換わっている場合には、C H 2 Eドメイン（またはC H 2 Mドメイン）のC末端と繋がられることができる。四価二特異性抗体は、上に詳述したC H 2 Eドメイン（またはC H 2 Mドメイン）を全抗体の2つのアーム内かまたは2つのF a b内かのどちらかに含むことができる。この場合には、「全抗体」という用語を通常の意味（すなわち、4本の鎖：V L 1 - C L、V H 1 - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3、V L 2 - C L、及びV H 2 - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3を含む抗体）とは違う意味で使用して4本の鎖：V L 1 - C H 2 E（またはC H 2 M）、V H 1 - C H 2 E（またはC H 2 M） - ヒンジ - C H 2 - C H 3、V L 2 - C H 2 E（またはC H 2 M）、及びV H 2 - C H 2 E（またはC H 2 M） - ヒンジ - C H 2 - C H 3を含む抗体も包含していることに留意されたい。

#### 【0072】

上記の構築物において使用することができるリンカーは特に限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーはペプチドリinkerである。1 ~ 2 5 個の残基（例えば、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個のアミノ酸）を含むいかなる任意の一本鎖ペプチドも、リンカーとして使用することができる。特定の場合には、リンカーはグリシン及び/またはセリン残基のみを含有する。そのようなペプチドリinkerの例としては、G l y、S e r；G l y S e r；G l y G l y S e r；S e r G l y G l y；G l y G l y G l y S e r（配列番号10）；S e r G l y G l y G l y（配列番号55）；G l y G l y G l y G l y S e r（配列番号56）；S e r G l y G l y G l y G l y（配列番号57）；G l y G l y G l y G l y G l y S e r（配列番号58）；S e r G l y G l y G l y G l y G l y（配列番号59）；G l y G l y G l y G l y G l y G l y S e r（配列番号60）；S e r G l y G l y G l y G l y G l y G l y（配列番号61）；( G l y G l y G l y G l y S e r ) n（配列番号56）n（ここで、nは1以上の整数である）；及び( S e r G l y G l y G l y G l y ) n（配列番号57）n（ここで、nは1以上の整数である）が挙げられる。他の実施形態では、リンカーペプチドは、( 従来のG l y / S e r リンカーペプチドリinkerの接合部に生じる ) アミノ酸配列G S Gが存在しないように改変される。例えば、ペプチドリinkerは( G G G X X ) n G G G S（配列番号62）及びG G G S ( X G G G S ) n（配列番号63）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、式中、Xは、配列中に挿入されることができる、配列G S Gを含むポリペプチドをもたらさない任意のアミノ酸であり、nは0 ~ 4 である。一実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、リンカーペプチドの配列は  $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$  であり、 $X_1$  は P であり、 $X_2$  は S であり、 $n$  は 0 ~ 4 (配列番号 64) である。別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は  $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$  であり、 $X_1$  は G であり、 $X_2$  は Q であり、 $n$  は 0 ~ 4 (配列番号 65) である。別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は  $(GGGX_1X_2)_nGGGGS$  であり、 $X_1$  は G であり、 $X_2$  は A であり、 $n$  は 0 ~ 4 (配列番号 66) である。さらに別の実施形態では、リンカーペプチドの配列は  $GGGGS(XGGGS)_n$  であり、 $X$  は P であり、 $n$  は 0 ~ 4 である (配列番号 67)。一実施形態において、本発明のリンカーペプチドはアミノ酸配列  $(GGGGA)_2GGGGS$  (配列番号 68) を含むかまたはそれからなる。別の実施形態では、リンカーペプチドはアミノ酸配列  $(GGGQ)_2GGGGS$  (配列番号 69) を含むかまたはそれからなる。さらに別の実施形態では、リンカーペプチドはアミノ酸配列  $(GGGPS)_2GGGGS$  (配列番号 70) を含むかまたはそれからなる。さらなる実施形態では、リンカーペプチドはアミノ酸配列  $GGGGS(PGGGS)_2$  (配列番号 71) を含むかまたはそれからなる。

#### 【0073】

特定の実施形態では、リンカーは合成化合物リンカー (化学的架橋剤) である。市場で入手することができる架橋剤の例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、ビス (スルホスクシンイミジル) スベレート (BS3)、ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) (DSP)、ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (DTSSP)、エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシネート) (EGS)、エチレングリコールビス (スルホスクシンイミジルスクシネート) (スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩 (スルホ-DST)、ビス [2 - (スクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (BSOCEES)、及びビス [2 - (スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (スルホ-BSOCEES) が挙げられる。

#### 【0074】

VH1 構築物のエルボー領域は、例えば、IgG CH1 ドメインの断片 (例えば、IgG CH1 ドメインからの 1 ~ 10 個、1 ~ 9 個、1 ~ 8 個、1 ~ 7 個、1 ~ 6 個、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、または 1 ~ 2 個の連続アミノ酸) であることができる。一実施形態において、エルボードメインは IgG1 に由来するものであり、IgG1 CH1 ドメインの N または C 末端からの 1 ~ 10 個、1 ~ 9 個、1 ~ 8 個、1 ~ 7 個、1 ~ 6 個、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、または 1 ~ 2 個の連続アミノ酸である。IgG1 CH1 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化 7】

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAAALGCLVK D  
YFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GL  
YSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTK  
VDKKV (配列番号 72)

上記 VH1 構築物のエルボー領域の非限定的な例は、ASTKG (配列番号 7) である。一実施形態において、VH1 構築物は以下のアミノ酸配列：

#### 【化 8】

1      ASTKGPTVKI LQSSCDGGGH FPPTIQLL  
CL VSGYTPGTIN ITWLEDGQVM  
51      DVDLSTASTT QEGELASTQS ELTLSQKH  
WL SDRTYTCQVT YQGHTFEDST  
101    KKCA (配列番号 45)

10

20

30

40

50

を含み、この場合、CH<sub>2</sub>E (VCSRDFTP (配列番号 8)) の最初の 8 つのアミノ酸がヒト IgG1 CH<sub>2</sub>ドメインの最初の 5 つのアミノ酸 (エルボー領域 ASTKG (配列番号 7)) で置き換わっている。別の実施形態では、上記 VH1 構築物のエルボー領域は SRDFT (配列番号 77) である。特定の実施形態では、VH1 構築物は、エルボー領域を有さないリンカーを有する。そのような場合、リンカーは例えば配列番号 56 または配列番号 58 であり得る。

#### 【0075】

VL1 構築物のエルボー領域は、例えば、カップまたはラムダ CLドメインの断片 (例えば、カップまたはラムダドメインからの 1 ~ 10 個、1 ~ 9 個、1 ~ 8 個、1 ~ 7 個、1 ~ 6 個、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、または 1 ~ 2 個の連続アミノ酸) であることができる。一実施形態において、エルボードメインはカップドメインに由来するものであり、カップドメインの N または C 末端からの 1 ~ 10 個、1 ~ 9 個、1 ~ 8 個、1 ~ 7 個、1 ~ 6 個、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、または 1 ~ 2 個の連続アミノ酸を含むかまたはそれからなる。ヒトカップ CLドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化 9】

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN N  
FYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SK  
DSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQG  
LSSPVTK SFNRGEC (配列番号 73)

#### 【0076】

ヒトラムダ CLドメインのアミノ酸配列を以下に示す (エルボー領域は、太字 / 下線付きで示されている最初の 6 つのアミノ酸である)。

#### 【化 10】

GQPKAAPSVT LFPPSSSEELQ ANKATLVCLIS  
DFYPGAVTV AWKADSSPVK  
AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK S  
HRSYSCQVT HEGSTVEKTV  
APTECS (配列番号 74)

上記 VL1 構築物のエルボー領域の非限定的な例は RTVAA (配列番号 9) である。一実施形態において、VL1 構築物は以下のアミノ酸配列：

#### 【化 11】

1 RTVAAPT VKI LQSSCDGGGH FPPTIQLL  
CL VSGYTPGTIN ITWLEDGQVM  
51 DVDLSTASTT QEGELASTQS ELTLSQKH  
WL SDRTYTCQVT YQGHTFEDST  
101 KKCA (配列番号 46)

を含み、この場合、CH<sub>2</sub>E (VCSRDFTP (配列番号 8)) の最初の 8 つのアミノ酸がヒトカップドメインの最初の 5 つのアミノ酸 (エルボー領域 RTVAA (配列番号 9)) で置き換わっている。別の実施形態では、上記 VL1 構築物のエルボー領域は GQPKAA (配列番号 78) である。特定の実施形態では、VL1 構築物は、エルボー領域を有さないリンカーを有する。そのような場合、リンカーは例えば配列番号 56 または配列番号 58 であり得る。

#### 【0077】

重鎖誤対合問題に対する解決策

本願はさらに、重鎖ヘテロ二量体化に有効な方策としてリジン再配置を開示する。C H 3 ドメインの構造解析、モデリング、及び潜在的な界面突然変異の解析に基づいてリジン再配置の方策を考案して非対称な相補的C H 3 界面の操作をした(図2を参照のこと)。具体的には、C H 3 単量体AにおけるL y s 4 0 9 ( E U 付番)のS e r による置換及びS e r 3 6 4 ( E U 付番)のL y s による置換は、リジンを ストランドE から隣接する逆平行 ストランドB へと再配置する。反対に、C H 3 単量体BにおけるL y s 3 7 0 ( E U 付番)のS e r による置換及びP h e 4 0 5 ( E U 付番)のL y s による置換は、リジンを ストランドB から ストランドE へと再配置する。他の実施形態では、リジン再配置には表2のM P 4 の突然変異を伴う。再配置されたリジンは、ヘテロ二量体では積み重なるが、ホモ二量体では立体的衝突及び電荷の衝突を引き起こし、それは、ホモ二量体の形成を防止し、それにゆえC H 3 ドメインのヘテロ二量体化をもたらす。このように、抗体のC H 3 ドメイン(例えば、I g G 1 抗体のC H 3 )の中にこれらの変更を組み込むことによって、これらの突然変異を有さない抗体に関して抗体の重鎖のヘテロ二量体化を増すことができる。この方策は、公開されているF c ヘテロ二量体化突然変異よりも勝るかまたはそれと同程度の効率で重鎖ヘテロ二量体化に非常に効果的な方策であるということが判明した。

#### 【0078】

野生型ヒトI g G 1 C H 3 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化12】

```

1      G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V S L T C L
V K   G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N
5 1    Y K T T P P V L D S   D G S F F L Y S K L   T V D K S R W Q
Q G   N V F S C S V M H E   A L H N H Y T Q K S
1 0 1   L S L S P G K      (配列番号11)
```

#### 【0079】

野生型ヒトI g G 4 C H 3 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化13】

```

1      G Q P R E P Q V Y T   L P P S Q E E M T K   N Q V S L T C L
V K   G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N
5 1    Y K T T P P V L D S   D G S F F L Y S R L   T V D K S R W Q
E G   N V F S C S V M H E   A L H N H Y T Q K S
1 0 1   L S L S L G K      (配列番号12)
```

#### 【0080】

一実施形態において、抗体のF c 領域の2つのC H 3 ドメインのうちの片方は、以下に示すアミノ酸配列：

#### 【化14】

```

1      G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V K L T C L V
K     G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P V L D S
6 1    D G S F F L Y S L L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M H
E     A L H N H Y T Q K S   L S L S P G           (配列番号13)
```

を含む。

#### 【0081】

この実施形態では、抗体のF c 領域の2つのC H 3 ドメインのうちのもう片方は、以下に示すアミノ酸配列：

10

20

30

40

50



## 【化 15】

1        G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V S L T C L  
 V S    G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P I L D  
 S  
 6 1     D G S F K L Y S K L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M  
 H E    A L H N H Y T Q K S   L S L S P G    (配列番号 14)

を含む。

## 【0082】

いくつかの実施形態では、上記の2つのCH3ドメインは5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つのアミノ酸置換をCH3ドメインの片方または両方の中に含み得る。例えば、CH3ドメインを突然変異させて抗体の1つ以上のエフェクター機能を変化させることができる。1つ以上のエフェクター機能を変化させるためにCH3ドメインにおいて改変されることができる位置(EU付番による)の非限定的な例としては、位置342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438及び439が挙げられる。米国特許第8,586,713B2号の第10列、第32~64行目に記載されている置換可能部位の例及び突然変異の例も参照されたい。1つ以上のエフェクター機能を変化させるためにCH3ドメインに対して行うことができる置換のその他の非限定的な例(EU付番によって列挙する)としては、E345R、H433A、N434A、H435A、Y436D、Q438D、K439E、S440K及び/またはK439E/S440Kが挙げられる(Diebold et al., Science, 343(6176):1260-1263(2014)を参照のこと)。CH3ドメインに対して行うことができるその他の置換としては、例えば、プロテインAとの結合性に影響を与えるものが挙げられる。そのような置換の非限定的な例としては、H435R、H435R及び/またはY436F(米国特許第8,586,713B2号)(全てEU付番)が挙げられる。人工的なジスルフィド結合を導入する置換を行ってもよい。そのような置換の非限定的な例としては、P445G、G446E及びK447C; P343C及びA431C; ならびにS375C及びP396C(WO2011/003811A1)(全てEU付番)が挙げられる。表面残基が変化するようにCH3ドメインを突然変異させてもよい。これは、例えば、抗体の等電点(pI)を変化させるためのものであり得る。そのような置換の非限定的な例としては、E345K、Q347E/K/R、R355E、R355Q、K392E、K392N、Q419E(US2014/0294835A1)(全てEU付番)が挙げられる。ある場合には、CH3ドメインのC末端は、切断及び/または改変されることができる。例えば、K447(EU付番)を欠失させかつ/またはペプチドDEDEまたはその他のアミノ酸をCH3ドメインのC末端に追加することができる。特定の場合にはCH3ドメインのグリコシル化に影響を与えるように当該ドメインを突然変異させることができる。そのような突然変異の非限定的な例はY407E(EU付番)(Rose et al., Mabs, 5(2):219-28(2013))である。

## 【0083】

上記CH3ドメインはFcドメインの一部であり得る。抗体の重鎖のFcドメインは、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。CH3ドメインは、上に述べたリジン再配置突然変異以外の突然変異も含んでいてよい。

## 【0084】

Fcドメインのヒンジ領域は、いかなる抗体クラスのヒンジ領域であることもできる。IgG1、IgG2及びIgG4抗体のヒンジ領域は、一般に、位置216のアミノ酸から位置230のアミノ酸まで延びている(EU付番による位置付番)。特定の実施形態で

10

20

30

40

50

は、ヒンジ領域はI g G 1抗体由来のヒンジである。その他の実施形態では、ヒンジ領域はI g G 4抗体由来のヒンジである。ヒンジ領域がI g G 4クラスに由来するものである場合、それはS 2 2 8 P ( E U付番 ) 突然変異を含有し得る。以下は、全体または一部のどちらかが採用され得る典型的なヒンジ領域である (例えば、N及び/またはC末端切断があってもよい)。

ヒトI g G 1ヒンジ: E P K S C D K T H T C P P C P (配列番号15)

ヒトI g G 4ヒンジ: E S K Y G P P C P S C P (配列番号16)

突然変異体ヒトI g G 4 ( S 2 2 8 P ) ヒンジ: E S K Y G P P C P P C P (配列番号17)

特定の場合には、上記のヒンジ配列のN及び/またはC末端において1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸を欠失させてもよい。特定の場合には、ヒンジ配列またはそのN及び/もしくはC末端において4つ以下、3つ以下、2つ以下、1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸の置換、欠失及び/または挿入があってもよい。

#### 【0085】

CH2ドメインは、いかなるクラスの抗体に由来するものであってもよい。特定の実施形態では、CH2ドメインはI g G 1抗体に由来するものである。他の実施形態では、CH2ドメインはI g G 4抗体に由来するものである。CH2ドメインは、1つ以上の突然変異を含有していてもよい。例えば、CH2ドメインは、N結合型グリコシル化部位がグリコシル化されないように当該部位の突然変異を有していてもよい。特定の実施形態では、CH2ドメインのN結合型グリコシル化部位のアスパラギンがグルタミンへと突然変異している (例えば、A s n 2 9 7 G l n)。他の実施形態では、CH2ドメインのN結合型グリコシル化部位にあるスレオニンがアラニンまたはシステインへと突然変異している (例えば、T h r 2 9 9 A l aまたはT h r 2 9 9 C y s)。他の例では、エフェクター機能を変化させるべくCH2ドメインを突然変異させてもよい (例えば、L e u 2 3 4 A l a / L e u 2 3 5 A l a、P r o 3 2 9 G l y、及び/またはP r o 3 3 1 S e r)。FcRnに対する結合性を変化させるべくCH2ドメインを突然変異させることもできる。

#### 【0086】

特定の実施形態では、定常ドメインはI g G 4 P / I g G 1ハイブリッドである。特定の場合には、定常ドメインはI g G 4 P / I g G 1 ( a g l y ) ハイブリッドである。これらのハイブリッドは、I g G 4のヒンジ領域及びCH2ドメインならびにI g G 1のCH3ドメインを含む。I g G 4のヒンジ領域はS 2 2 8 P突然変異を有する。a g l y 構築物においてそれはさらに突然変異N 2 9 7 Q、T 2 9 9 AまたはT 2 9 9 Cのうちの1つを含む。

#### 【0087】

一実施形態において、2つのFc領域のうちの片方は、以下に示すアミノ酸配列 (ヒンジ領域をイタリック体で示し; N結合型グリコシル化部位には下線を付け; CH2領域を通常のフォントで示し; CH3ドメインを太字で示す) :

#### 【化16】

```

DKTHTCPCPCP  APELLGGPSV  FLFPKPKD T  L
MISRTPEVT  CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD  GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  R
VVSVLTVLH  QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA  PIEKTI SKAK  GQPREPQVYT  L
PPSRDELTK  NQVKLTCLVK
GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLD S  D
GSFFFLYSLL  TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE  ALHNHYTQKS  LSLSPG      (配列番号
18)

```

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 0 8 8 】

この実施形態では、2つのFc領域のうちのもう片方は、以下に示すアミノ酸配列（ヒンジ領域をイタリック体で示し；N結合型グリコシル化部位には下線を付け；CH2領域を通常のフォントで示し；CH3ドメインを太字で示す）：

【化17】

*DKTHTCPPCP* APELLGGPSV FLFPKPKDT L  
 MISRTPEVT C V V V D V S H E D  
*PEVKFNWYVD* GVEVHNAKTK P R E E Q Y N S T Y R  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K  
 CKVSNKALPA P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L  
 P P S R D E L T K N Q V S L T C L V S  
 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P I L D S D  
 G S F K L Y S K L T V D K S R W Q Q G  
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G （配列番号  
 19）

10

を含む。

【 0 0 8 9 】

別の実施形態では、2つのFc領域のうちのもう片方は、以下に示すアミノ酸配列（ヒンジ領域をイタリック体で示し；突然変異N結合型グリコシル化部位には下線を付け；CH2領域を通常のフォントで示し；CH3ドメインを太字で示す）：

【化18-1】

*DKTHTCPPCP* APELLGGPSV FLFPKPKDT L  
 MISRTPEVT C V V V D V S H E D

【化18-2】

*PEVKFNWYVD* GVEVHNAKTK P R E E Q Y Q S T Y R  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K  
 CKVSNKALPA P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L  
 P P S R D E L T K N Q V K L T C L V K  
 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
 G S F F L Y S L L T V D K S R W Q Q G  
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G （配列番号  
 20）

30

を含む。

【 0 0 9 0 】

この実施形態では、2つのFc領域のうちのもう片方は、以下に示すアミノ酸配列（ヒンジ領域をイタリック体で示し；CH2領域を通常のフォントで示すとともに、CH2ドメインの突然変異N結合型グリコシル化部位には下線を付け；CH3ドメインを太字で示す）：

40

## 【化 19】

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPKPKDT L  
 MISRTPEVT C V V V D V S H E D  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYQSTY R  
 VVS V L T V L H QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT L  
 PPSRDELTK NQVSLTCLVS  
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPPILDS D  
 GSFKLYSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (配列番号  
 21)

10

を含む。

## 【0091】

これらのFc領域は、Fcドメインがヘテロ二量体化できる限り、9つ以下、8つ以下、7つ以下、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つまたは9つのアミノ酸の置換、挿入及び/または欠失を含むことができる。アミノ酸置換は、保存的または非保存的なアミノ酸置換であり得る。

## 【0092】

20

上記のCH3ドメイン及びFcドメインのいずれかは、CH2Eドメイン(またはCH2Mドメイン)で置き換えられたCLドメインを有する上記軽鎖と対合する重鎖の一部であることができる。具体的には、重鎖は、VHドメインに直接繋がられているかまたは間に介在する配列を介して繋がられている第2CH2ドメインを含むことができ、ここで、第2CH2ドメインは、CH2Eドメインまたは、CH2Eドメインと二量体化することができるその断片である。特定の場合には、重鎖は、VHドメインに直接繋がられているかまたは間に介在する配列を介して繋がられている第2CH2ドメインを含むことができ、ここで、第2CH2ドメインは、CH2Mドメインまたは、CH2Mドメインと二量体化することができるその断片である。上記のCH3ドメイン及びFcドメインのいずれかは、CH1及びCLドメインを有する上記軽鎖と対合する重鎖の一部であることもできる。特定の場合には、上記のCH3ドメイン及びFcドメインのいずれかは、CH2Eドメイン(またはCH2Mドメイン)で置き換えられたCLドメインを有する上記軽鎖と対合する第1重鎖の一部であり、上記のCH3ドメイン及びFcドメインのいずれかは、CH1及びCLドメインを有する上記軽鎖と対合する第2重鎖の一部である。

30

## 【0093】

一実施形態において重鎖は以下のアミノ酸配列：

40

50

## 【化 2 0】

A S T K G P T V K I L Q S I C D G G G H F P P T I Q L L C L V  
 S G Y T P G T I Q I T W L E D G Q V M D V D L S T A S T T  
 Q E G E L A S T Q S E L T L S Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y  
 Q G H T F E D S T K K C A S *D K T H T* C P P C P A P E L L  
 G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V  
 S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q  
 Y Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K  
 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R  
 D E L T K N Q V K L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q  
 P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S L L T V D K S  
 R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G  
 (配列番号 2 2)

10

を含む。

## 【0 0 9 4】

一実施形態において、この重鎖は、以下のアミノ酸配列：

## 【化 2 1】

R T V A A P T V K I L Q S S C D G G G H F P P T I Q L L C L V  
 S G Y T P G T I Q I T W L E D G Q V M D V D L S T A S T T  
 Q E G E L A S T Q S E L T L S Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y  
 Q G H T F E D S G K K C A (配列番号 6)

20

を含んでいる軽鎖と二量体化する。

## 【0 0 9 5】

これらの重軽鎖配列は各々、重軽鎖がヘテロ二量体化できる限り、9つ以下、8つ以下、7つ以下、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つまたは9つのアミノ酸の置換、挿入及び/または欠失を含むことができる。アミノ酸置換は、保存的または非保存的なアミノ酸置換であり得る。

30

## 【0 0 9 6】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化する上記の C H 3 ドメイン及び F c ドメインは、一価抗体の一部であることができる。一価抗体は、抗体の2つの F c 領域のうち一方に直接繋がられているかまたは間に介在するリンカー配列を介して繋がられている F a b を含み；他方の F c 領域は、それに取り付けられた F a b 領域を有さない。

## 【0 0 9 7】

他の実施形態では、ヘテロ二量体化する上記の C H 3 ドメイン及び F c ドメインは、一本鎖 F c ( s c F c ) の一部であることができる。特定の場合には、F a b の C H 1 または C L ドメインは第 1 F c 領域に直接繋がられているかまたは間に介在するリンカーを介して繋がられており、当該 F c 領域は第 2 F c 領域に繋がられている（例えば、第 1 F c 領域の C H 3 ドメインの C 末端は、第 2 F c 領域のヒンジ領域の N 末端に繋がられている）。

40

## 【0 0 9 8】

特定の実施形態では、ヘテロ二量体化する上記 F c ドメインは、F a b に直接繋がられているかまたはリンカーを介して繋がられている。つまり、F a b の V H / C H 1 含有部分は、その C 末端を介して第 1 F c のヒンジ領域の N 末端に繋がられており、F a b の V L / C L 含有部分はその C 末端を介して第 2 F c 領域のヒンジ領域の N 末端に繋がられている。

## 【0 0 9 9】

さらに他の実施形態では、ヘテロ二量体化する上記の C H 3 ドメイン及び F c ドメイン

50

は、第1重鎖及び第2重鎖を含む抗体の一部であり、ここで、第1及び第2重鎖は通常の軽鎖と対合している。

#### 【0100】

##### 核酸

本開示は、本明細書に記載のヘテロ二量体型の二特異性抗体及び一価抗体の重軽鎖をコードする核酸も包含する。VH、VL、ヒンジ、CH1、CH2、CH3及びCH4領域を含む免疫グロブリン領域をコードする多くの核酸配列が当該技術分野において既知である。例えば、Kabat et al. in SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Public Health Service N. I. H., Bethesda, Md., 1991を参照されたい。本明細書において提供される指針を用いれば、当業者はそのような核酸配列及び/または当該技術分野において知られているその他の核酸配列を組み合わせることで本明細書に記載のヘテロ二量体型二特異性抗体をコードする核酸配列を作出することができよう。

10

#### 【0101】

さらに、本明細書に記載のヘテロ二量体型二特異性抗体をコードする核酸配列は、本明細書において提供されるアミノ酸配列及び当該技術分野の知識に基づいて当業者によって決定されることができる。特定のアミノ酸配列をコードするクローニングされたDNAセグメントを生じさせる、より慣例的な方法の他、諸会社は現在、任意の所望の配列からなる化学合成された遺伝子サイズのDNAを日々受注生産しており、よってそのようなDNAを生産する工程は効率化されている。

20

#### 【0102】

##### 二特異性抗体を作る方法

本明細書に記載の二特異性抗体及び一価抗体は、当該技術分野においてよく知られている方法を用いて作ることができる。例えば、二特異性抗体の4本のポリペプチド鎖をコードする核酸を様々な既知の方法、例えば、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔法、核酸で被覆された微粒子の撃ち込みなどによって宿主細胞内に導入することができる。ある場合には、二特異性抗体をコードする核酸は、宿主細胞内に導入される前に宿主細胞での発現に適したベクターの中に挿入される。典型的には、そのようなベクターは、挿入された核酸をRNAレベル及びタンパク質レベルで発現するのを可能にする配列エレメントを含有することができる。そのようなベクターは当該技術分野においてよく知られており、多くは市販されている。核酸を含有する宿主細胞は、核酸を細胞が発現することを可能にするような条件下で培養することができる。結果として生じるヘテロ二量体型二特異性抗体は、細胞塊または培地から回収することができる。あるいは、ヘテロ二量体型二特異性抗体を生体内で、例えば、植物の葉（例えば、Scheller et al., Nature Biotechnol., 19:573-577 (2001)）及びその中で引用される参考文献を参照のこと）、鳥の卵（例えば、Zhu et al. (2005), Nature Biotechnol., 23:1159-1169 (2005)）及びその中で引用される参考文献を参照のこと）、または哺乳動物の乳（例えば、Laible et al., Reprod. Fert. Dev. 25(1):315 (2012)）において産生させることができる。単離した抗体は、ヒト対象への投与のために無菌組成物として製剤化することができる。

30

40

#### 【0103】

数多くある中でも例えば、Escherichia coliもしくはBacillus stearothermophilusなどの細菌細胞、Saccharomyces cerevisiaeもしくはPichia pastorisなどの真菌細胞、Spodoptera frugiperda細胞を含めた鱗翅目昆虫細胞などの昆虫細胞または、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ベビーハムスター腎由来（BHK）細胞、サル腎細胞、Hela細胞、ヒト肝癌由来細胞もしくは293細胞を含めた、数種類の宿主細胞を使用することができる。

#### 【0104】

50

以下は本発明の実施例である。それは決して、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきでない。

【実施例】

【0105】

以下の実施例は、特許請求の範囲に記載の本発明をよりよく例示するために提供されており、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。具体的な材料に言及している限りにおいて、それは単に例示を目的としており、本発明を限定することは意図されない。当業者であれば、発明の才を行行使することなく、本発明の範囲から逸脱せずに、等価な手段及び反応物質を開発することができる。

【0106】

実施例1：重鎖ヘテロ二量体化の操作

C H 3 ドメインは、I g G の 2 本の重鎖同士が接触する主要な場所の 1 つである。2 つの C H 3 ドメインは、界面にある接触残基が密にパッキングされた状態で頭 - 尾配向で結合し合う。重鎖ヘテロ二量体化は、2 つの C H 3 ドメイン同士の接触のコアにある疎水性表面を操作すること、または接触面の周辺にある荷電残基を変化させることによって達成することができる。疎水性接触残基の密なパッキングを維持すべく、非対称性の操作をするために C H 3 界面の周辺を選択した。C H 3 ドメインの突然変異のためのさらなる設計基準には、( i ) ヘテロ二量体化の効率的誘因、( i i ) 少ない突然変異、及び ( i i i ) 全体的に電荷中立的な変化が含まれた。C H 3 ドメインの構造解析及び突然変異の設計は、ヒト I g G 1 F c ( P D B コード 3 A V E ) の結晶構造を使用して行った。比較解析により、公開されている多数のヒト F c ドメイン同士で構造の同一性が高いことが示され、構造の選択が C H 3 の操作にとって必須でない可能性があることが示唆された。潜在的な界面突然変異のモデリング及び解析に基づき、リジン再配置の方策を考案して非対称な相補的 C H 3 界面の操作をした ( 図 2 )。単量体 A における L y s 4 0 9 ( E U 付番 ) の S e r による置換及び S e r 3 6 4 ( E U 付番 ) の L y s による置換は、リジンを ストランド E から隣接する逆平行 ストランド B へと再配置する。反対に、単量体 B における L y s 3 7 0 ( E U 付番 ) の S e r による置換及び P h e 4 0 5 ( E U 付番 ) の L y s による置換は、リジンを ストランド B から ストランド E へと再配置する。再配置されたリジンは、ヘテロ二量体では積み重なるが、ホモ二量体では立体的衝突及び電荷の衝突を引き起こし、それは、ホモ二量体の形成を防止すべきものであり、それゆえヘテロ二量体化をもたらすべきものである。

【0107】

リジン再配置によるヘテロ二量体化の有効性を実験的に試験するために、一方が完全なヒト I g G 1 重鎖でありかつ他方が F a b なしの遊離 F c である一価 m A b として試験抗体を構築した。結果として生じるヘテロ二量体は、ホモ二量体とは分子量の顕著な差で簡単に区別することができ、ヘテロ二量体化は S D S - P A G E での分離によって評価することができる。抗 E G F R 抗体 M 6 0 - A 0 2 をこれらの試験構築物において使用した。表 1 に列挙するプライマーを使用して P C R に基づく突然変異誘発によって C H 3 ドメインにおける突然変異を生じさせた。

10

20

30

40

50

## 【表 1 - 1】

表 1. オーバーラップ PCR によってヒト I g G 1 に C H 3 突然変異 S 3 6 4 K / K 4 0 9 S 及び K 3 7 0 S / F 4 0 5 K 生じさせるためのプライマー

P C R	順方向プライマー	逆方向プライマー
S 3 6 4 K 5'	C O 2 T G G G C T G C C T - 9 6 G G T C A A G 6 (配列番号 2 3)	C O 2 g t c a g T T T g a - 9 6 c c t g g t t c t t 8 g (配列番号 2 4)
S 3 6 4 K 3'	C O 2 c a a g a a c c a g - 9 6 g t c A A A c t g a 7 c (配列番号 2 5)	A V 1 G A A T T G G C C G - 1 7 C C C T A G A T G 7 (配列番号 2 6)
K 4 0 9 S	C O 2 T G G G C T G C C T - 9 6 G G T C A A G	C O 2 g g t g a g G C T g - 9 7 c t g t a g a g G A

10

## 【表 1 - 2】

5'	6	(配列番号 2 7)	2	(配列番号 2 8)
K 4 0	C O 2	T C c t c t a c a g	A V 1	G A A T T G G C C G
9	S - 9 7	c A G C c t c a c c	- 1 7	C C C T A G A T G
3'	1	(配列番号 2 9)	7	(配列番号 3 0)
K 3 7	C O 2	G C T C T G G G T T	C O 2	g a t a g a a g c c
0	S - 5 4	C C A G G T T C	- 9 7	G C T g a c c a g g
5'	8	(配列番号 3 1)	0	(配列番号 3 2)
K 3 7	C O 2	c c t g g t c A G C	A V 1	G A A T T G G C C G
0	S - 9 6	g g c t t c t a t c	- 1 7	C C C T A G A T G
3'	9	(配列番号 3 3)	7	(配列番号 3 4)
F 4 0	C O 2	G C T C T G G G T T	C O 2	t g t a g a g T T T
5	K - 5 4	C C A G G T T C	- 9 7	g a a g g a g c c g
5'	8	(配列番号 3 5)	4	t (配列番号 3 6)
F 4 0	C O 2	a c g g c t c c t t	A V 1	G A A T T G G C C G
3	K - 9 7	c A A A c t c t a c	- 1 7	C C C T A G A T G
3'	3	a (配列番号 3 7)	7	(配列番号 3 8)

20

30

40

## 【0108】

増幅は、Q5 Hot Start High-Fidelity DNAポリメラーゼ (NEB #M0493L) を用いて行い、PCR産物をHiFi Gibson assemblyキット (SGI #GA1100-50) と共に使用して構築物を組み立てた。

## 【0109】

再配置されたりジンの個別の効果についての洞察をいくらか得るために、個別の突然変異を有する構築物を同様に組み立てた。これらの不完全設計をそれぞれMP1及びMP2と命名した(表2)。

50



【表 2 - 1】

表 2. F c ヘテロ二量体化を試験するための構築物

タンパク質	単量体 A (抗 E G F R - A 0 2)	M 6 0	単量体 B (ヒト I g G 1 F c)
M P 1	p M P 2 3 3	M 6 0 - A 0 2 m p 1 a	S 3 6 4 K p M 2 P 3 4 F c m p 1 b K 3 7 0 S
M P 2	p M P 2 3 5	M 6 0 - A 0 2 m p 2 a	K 4 0 9 S p M 2 P 3 6 F c m p 2 b F 4 0 5 K
M P 3	p M P 2 3 7	M 6 0 - A 0 2 m p 3 a	S 3 6 4 K / K 4 0 9 S p M 2 P 3 8 F c m p 3 b K 3 7 0 S / F 4 0 5 K
M P 4	p M P 2 5 4	M 6 0 - A 0 2	S 3 6 4 K / p M 2 P 2 F c m p 4 b K 3 7 0 S /

10

【表 2 - 2】

タンパク質	単量体 A (抗 E G F R - A 0 2)	M 6 0	単量体 B (ヒト I g G 1 F c)
		m p 4 a	K 4 0 9 L 5 9 V 3 9 7 I / F 4 0 5 K
Z W 1	p M P 2 0 5	M 6 0 - A 0 2 z w 1 a	T 3 5 0 V / L 3 5 1 Y / F 4 0 5 A / T 4 0 7 V T 3 6 6 T 3 6 6 L / K 3 9 2 L / T 3 9 4 W
ノブ / ホール	p M P 2 0 9	M 6 0 - A 0 2 凹	T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V p M 2 P 1 2 F c 凸 T 3 6 6 W
静電指向型	p M P 2 1 3	M 6 0 - A 0 2 K D	K 4 0 9 D p M 2 P 1 6 F c D D 3 9 9 K
野生型 I g G 1	p M P 2 2 1	M 6 0 - A 0 2 w t I g G 1	なし p M 2 P 2 2 F c w t h u I g G 1 なし

20

30

40

50

完全設計は、再配置されたリジンを両方とも有し（pMP237は突然変異S364K/K409Sを有し、pMp238は突然変異K370S/F405Kを有する）、ヘテロ二量体化を引き起こす上で最も効果的であるはずである。この設計をMP3と命名した。MP3のCH3ドメインのペプチド配列を以下に示す。

MP3単量体AのCH3ドメインのアミノ酸配列（突然変異は下線付きの太字）

【化22】

```

1      G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V K L T C L V
K      G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P V L D S
6 1    D G S F F L Y S S L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M H
E      A L H N H Y T Q K S   L S L S P G           (配列番号39)

```

10

MP3単量体BのCH3ドメインのアミノ酸配列（突然変異は下線付きの太字）

【化23】

```

1      G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V S L T C L V
S      G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P V L D S
6 1    D G S F K L Y S K L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M H
E      A L H N H Y T Q K S   L S L S P G           (配列番号40)

```

20

さらに、比較のために、公開されているいくつかのCH3ヘテロ二量体化突然変異を生じさせた（Atwell et al., J. Mol. Biol., 270:26-35, 1997; Gunasekaran et al., J. Biol. Chem., 285:19637-19646, 2010; Von Kreudenstein et al., mAbs 5:646-654, 2013）。さらに、野生型IgG1対照に相当する構築物pMP221及びpMP222を組み立てた。ヘテロ二量体化のこの最初の試験のために作製した全ての構築物を表2にまとめて示すが、プラスミドは全てDNA配列決定によって確認した。

【0110】

抗体を一過的なトランスフェクションによってCHO細胞で発現させた。全ての抗体は良好に発現し、Fectopro及びDNAを2:1の比で使用して $6 \times 10^6$ 細胞/mlでトランスフェクトされたCHO細胞を使用する9日間の発現及び翌日の28℃への温度遷移の後に100~200mg/Lの力価が得られた。上清をプロテインAカラムで精製し、分量分をSDS-PAGEで分析した（図3A）。全ての試料において、IgG1重鎖と遊離Fcとのヘテロ二量体が主として見つかった。さらに、野生型のIgG1とFcとの共トランスフェクションは、両者のホモ二量体に対応する強いバンドも生じさせた。これらのバンドは、公開されている突然変異体、及び全てのリジン再配置突然変異体では、著しくより弱かった。したがって、リジン再配置突然変異体及び公開されている突然変異体は重鎖ヘテロ二量体の形成を推し進め、ホモ二量体化を減少させる。プロテインA精製された材料を質量分析によってさらに分析し、主成分の相対量を推定した。試料中のヘテロ二量体の量は、35~80%の範囲であり、公開されている設計と比べてリジン再配置突然変異体MP1、MP2及びMP3ではわずかにより高かった（図3B）。但し、個々の鎖の発現レベルを変化させることによってこれらの結果が影響を受けて直接的な比較が難しくなる可能性がある。重要なことには、設計MP2及びMP3ならびにZW1及びノブ・イントゥ・ホール型突然変異体は全て単量体Fcを含有していた。単量体Fcの存在は、Fc二量体が、CH3における突然変異によって不安定化され、したがって形成される可能性がより低い、ということを実証している。総じてこれらの結果は、リジン再配置が、公開されているいくつかの突然変異と同じくらい効率的にホモ二量体化を防止する効率的な重鎖ヘテロ二量体化方策である、ということを示している。

30

40

【0111】

50

この最初の試験の後、界面残基のパッキングを改良することができる突然変異を同定するためにさらなる構造モデリングを行った。そのような突然変異は、潜在的にヘテロ二量体化の効率または二量体の安定性を向上させることができるであろうし、それゆえに有益であろう。元のリジン再配置設計MP3を改良できるであろう2つの変化が同定された。この新しい設計をMP4と命名し、アミノ酸変化を表2に示す。MP4突然変異を有するIgG1/Fcヘテロ二量体を上記のようにCHO細胞で発現させ、上清からプロテインAで精製した。質量分析から、MP4がMP3と同じくらい効率的にIgG1重鎖と遊離Fcとのヘテロ二量体を生じさせたことが実証された(図3B)。

#### 【0112】

全てのヘテロ二量体タンパク質をKappaSelectカラムでさらに精製してFcの二量体及び単量体を除去し、続いてTandem Superdex S200での精製ステップを行った。この3ステップの精製により、融点を決定する示差走査熱量測定(DSC)のために使用される比較的純粋なヘテロ二量体が得られた。野生型IgG1対照は、CH3ドメインの予測Tmである約83を示した(図3C)。ZW1設計は同程度のCH3融点を有する(図3C)、というのも、それは野生型IgG1の熱安定性を再獲得すべく反復的なプロセスにおいて大幅に操作されたものであるからである(Von Kreudenstein et al., mAbs 5:646-654, 2013)。ノブ・イントゥ・ホール型及び静電指向型の比較分子は、DSCプロファイルにおいてたった1本のピークを示し、CH3ドメインのTmが約70に低下したこと及び、当該ドメインがCH2及びFabドメインと共に融解してDSCにおいて単一ピークをもたらしたことを示唆した(図3C)。MP3分子も同様に、DSCプロファイルにおいてたった1本のピークを約70に示し、CH3のTmが同様に低下したことを指し示していた(図3C)。タンパク質MP4及びMP4a3b(MP4の単量体AとMP3の単量体B)は、CH2/Fabピークの右側に肩を現し(図3C)、突然変異K409Lが元の突然変異K409Sよりもわずかに向上した安定性を付与すること、及びさらなる操作によってTmを向上させるのが可能であり得ることを示唆した。それでもなお、設計MP4は野生型IgG1 CH3ドメインと比べてTmがより低い。

MP4のCH3ドメインのペプチド配列を以下に示す。

MP4の単量体AのCH3ドメインの配列(突然変異は下線付きの太字)

#### 【化24】

```

1   G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V K L T C L V
K   G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P V L D S
61  D G S F F L Y S L L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M H
E   A L H N H Y T Q K S   L S L S P G           (配列番号41)

```

MP4の単量体BのCH3ドメインの配列(突然変異は下線付きの太字)

#### 【化25】

```

1   G Q P R E P Q V Y T   L P P S R D E L T K   N Q V S L T C L V
S  G F Y P S D I A V E   W E S N G Q P E N N   Y K T T P P I L D S
61  D G S F K L Y S K L   T V D K S R W Q Q G   N V F S C S V M H
E   A L H N H Y T Q K S   L S L S P G           (配列番号42)

```

#### 【0113】

MP4をコードするプラスミド(pMP254及びpMP259)のDNA分子配列を以下に示す。

MP4A突然変異(S634K、K409L)を有する抗EGFR M60-A02 IgG1重鎖、pMP254のDNA配列:

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 1】

1 a g c t t g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a  
t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t  
c a

## 【化 2 6 - 2】

6 1 t a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c  
a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a  
c c  
1 2 1 g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a c g t c  
a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a  
a t  
1 8 1 a g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t  
g g a g t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a  
g t  
2 4 1 a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c a a g t a c  
g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g  
c c  
3 0 1 c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c  
c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c  
t a  
3 6 1 c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t  
g a t g c g g t t t t g g c a g t a c a t c a a t g g g c g t  
g g  
4 2 1 a t a g c g g t t t g a c t c a c g g g g a t t t t c c  
a a g t c t c c a c c c c a t t g a c g t c a a t g g g a g t  
t t  
4 8 1 g t t t t g g c a c c a a a a t c a a c g g g a c t t  
t c c a a a a t g t c g t a a c a a c t c c g c c c c a t t g  
a c  
5 4 1 g c a a a t g g g c g g t a g g c g t g t a c g g t g  
g g a g g t c t a t a t a a g c a g a g c t c g t t t a g t g  
a a  
6 0 1 c c g t c a g a t c g c c t g g a g a c g c c a t c c  
a c g c t g t t t t g a c c t c c a t a g a a g a c a c c g g  
g a  
6 6 1 c c g a t c c a g c c t c c g c g g c c g g g a a c g  
g t g c a t t g g a a c g c g g a t t c c c c g t g c c a a g  
a g  
7 2 1 t g a c g t a a g t a c c g c c t a t a g a g t c t a  
t a g g c c c a c c c c c t t g g c t t c t t a t g c a t g c  
t a  
7 8 1 t a c t g t t t t t g g c t t g g g g t c t a t a c a  
c c c c c g c t t c c t c a t g t t a t a g g t g a t g g t a  
t a  
8 4 1 g c t t a g c c t a t a g g t g t g g g t t a t t g a  
c c a t t a t t g a c c a c t c c c c t a t t g g t g a c g a  
t a

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 3】

901 c t t t c c a t t a c t a a t c c a t a a c a t g g c  
 t c t t t g c c a c a a c t c t c t t t a t t g g c t a t a t  
 g c  
 961 c a a t a c a c t g t c c t t c a g a g a c t g a c a  
 c g g a c t c t g t a t t t t t a c a g g a t g g g g t c t c  
 a t  
 1021 t t a t t a t t t a c a a a t t c a c a t a t a c a a  
 c a c c a c c g t c c c c a g t g c c c g c a g t t t t t a t  
 t a  
 1081 a a c a t a a c g t g g g a t c t c c a c g c g a a t  
 c t c g g g t a c g t g t t c c g g a a c g g t g g a g g g c  
 a g  
 1141 t g t a g t c t g a g c a g t a c t c g t t g c t g c  
 c g c g c g c g c c a c c a g a c a t a a t a g c t g a c a g  
 a c  
 1201 t a a c a g a c t g t t c c t t t c c a t g g g t c t  
 t t t c t g c a g t c a c c g t c c t t g a c a c g g g a t c  
 c g  
 1261 c g g c c g c c a c c A T G G G T T G G A G C C T C A  
 T C T T G C T C T T C C T T G T C G C T G T T G C T A C G C G  
 T G  
 1321 T C C T G T C C G A G G T G C A G C T G T T G G A G T  
 C T G G G G A G G C T T G G T C C A G C C T G G G G G T C  
 C C  
 1381 T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T  
 T C A C C T T C A G T G A C T A T A T T A T G C A C T G G G T  
 C C  
 1441 G C C A G G C T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T  
 G G G T C T C A G T T A T T A G T A G T T C T G G T G G C G A  
 C A  
 1501 C A T C C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C  
 G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A  
 C A  
 1561 C G C T G T A T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A  
 G A G C C G A G G A C A C G G C C G T G T A T T A C T G T G C  
 G A  
 1621 A A G T C C T C G C G G G T T A C T T C G A C T G G T  
 T A C C C T T T G A C T A C T G G G G C C A G G G A A C C C T  
 G G  
 1681 T C A C C G T C T C G A G C G C C T C C A C C A A G G  
 G C C C A T C G G T C T T C C C C C T G G C A C C C T C C T C  
 C A

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 4】

1 7 4 1   AGAGCACCTC   TGGGGGCGACA   GCGGGCCC  
TGG   GCTGCCTGGT   CAAGGACTAC   TTCCCCGA  
AC  
1 8 0 1   CGGTGACGGT   GTCGTGGAAC   TCAGGCG  
CCC   TGACCAGCGG   CGTGCAACACC   TTCCCCGGC  
TG  
1 8 6 1   TCCTACAGTC   CTCAGGACTC   TACTCCC  
TCA   GCAGCGTGGT   GACCGTGCCC   TCCAGCAG  
CT  
1 9 2 1   TGGGCAACCCA   GACCTACATC   TGCAACG  
TGA   ATCACAAGCC   CAGCAACACC   AAGGTGGA  
CA  
1 9 8 1   AGAAAGTTGA   GCCCAAATCT   TGTGACA  
AGA   CTCACACATG   CCCACCCTGC   CCAGCACCC  
TG  
2 0 4 1   AACTCCTGGG   GGGACCGTCA   GTCTTCC  
TCT   TCCCCCCTAAA   ACCCAAGGAC   ACCCTCAT  
GA  
2 1 0 1   TCTCCCGGAC   CCCTGAGGTC   ACATGCG  
TGG   TGGTGGACGT   GAGCCACGAA   GACCCTGA  
GG  
2 1 6 1   TCAAGTTCAA   CTGGTACGTG   GACGGCG  
TGG   AGGTGCATAA   TGCCAAGACA   AAGCCGCG  
GG  
2 2 2 1   AGGAGCAGTA   CAACAGCACG   TACCGTG  
TGG   TCAGCGTCCT   CACCGTCCTG   CACCAGGA  
CT  
2 2 8 1   GGCTGAATGG   CAAGGAGTAC   AAGTGCA  
AGG   TCTCCAACAA   AGCCCTCCCA   GCCCCCAT  
CG  
2 3 4 1   AGAAAAACCAT   CTCCAAAGCC   AAAGGGC  
AGC   CCCGAGAACCC   ACAGGTGTAC   ACCCTGCC  
CC  
2 4 0 1   CATCCCGGGA   TGAGCTGACC   AAGAACC  
AGG   TCAAACCTGAC   CTGCCTGGTC   AAAGGCTT  
CT  
2 4 6 1   ATCCCAGCGA   CATCGCCGTG   GAGTGGG  
AGA   GCAATGGGCA   GCCGGAGAAC   AACTACAA  
GA  
2 5 2 1   CCACGCCTCC   CGTGTTGGAC   TCCGACG  
GCT   CCTTCTTCCT   CTACAGCCTC   CTCACCGT  
GG

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 5】

2 5 8 1    A C A A G A G C A G    G T G G C A G C A G    G G G A A C G  
T C T    T C T C A T G C T C    C G T G A T G C A T    G A G G C T C T  
G C  
2 6 4 1    A C A A C C A C T A    C A C G C A G A A G    A G C C T C T  
C C C    T G T C T C C G G G    T T A G t a a t t a    a t t a a t g c  
a t  
2 7 0 1    c t a g g g c g g c    c a a t t c c g c c    c c t c t c c  
c t c    c c c c c c c c c t    a a c g t t a c t g    g c c g a a g c  
c g  
2 7 6 1    c t t g g a a t a a    g g c c g g t g t g    c g t t t g t  
c t a    t a t g t g a t t t    t c c a c c a t a t    t g c c g t c t  
t t  
2 8 2 1    t g g c a a t g t g    a g g g c c c g g a    a a c c t g g  
c c c    t g t c t t c t t g    a c g a g c a t t c    c t a g g g g t  
c t  
2 8 8 1    t t c c c c t c t c    g c c a a a g g a a    t g c a a g g  
t c t    g t t g a a t g t c    g t g a a g g a a g    c a g t t c c t  
c t  
2 9 4 1    g g a a g c t t c t    t g a a g a c a a a    c a a c g t c  
t g t    a g c g a c c c t t    t g c a g g c a g c    g g a a c c c c  
c c  
3 0 0 1    a c c t g g c g a c    a g g t g c c t c t    g c g g c c a  
a a a    g c c a c g t g t a    t a a g a t a c a c    c t g c a a a g  
g c  
3 0 6 1    g g c a c a a c c c    c a g t g c c a c g    t t g t g a g  
t t g    g a t a g t t g t g    g a a a g a g t c a    a a t g g c t c  
t c  
3 1 2 1    c t c a a g c g t a    t t c a a c a a g g    g g c t g a a  
g g a    t g c c c a g a a g    g t a c c c c a t t    g t a t g g g a  
t c  
3 1 8 1    t g a t c t g g g g    c c t c g g t g c a    c a t g c t t  
t a c    a t g t g t t t a g    t c g a g g t t a a    a a a a a c g t  
c t  
3 2 4 1    a g g c c c c c c g    a a c c a c g g g g    a c g t g g t  
t t t    c c t t t g a a a a    a c a c g a t g a t    a a g c t t g c  
c a  
3 3 0 1    c a a g c t a g c a    t g g t t c g a c c    a t t g a a c  
t g c    a t c g t c g c c g    t g t c c c a a a a    t a t g g g g a  
t t  
3 3 6 1    g g c a a g a a c g    g a g a c c t a c c    c t g g c c t  
c c g    c t c a g g a a c g    a g t t c a a g t a    c t t c c a a a  
g a

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 6】

3 4 2 1   a t g a c c a c a a   c c t c t t c a g t   g g a a g g t  
 a a a   c a g a a t c t g g   t g a t t a t g g g   t a g g a a a a  
 c c  
 3 4 8 1   t g g t t c t c c a   t t c c t g a g a a   g a a t c g a  
 c c t   t t a a a g g a c a   g a a t t a a t a t   a g t t c t c a  
 g t  
 3 5 4 1   a g a g a a c t c a   a a g a a c c a c c   a c g a g g a  
 g c t   c a t t t t c t t g   c c a a a a g t t t   g g a t g a t g  
 c c  
 3 6 0 1   t t a a g a c t t a   t t g a a c a a c c   g g a a t t g  
 g c a   a g t a a a g t a g   a c a t g g t t t g   g a t a g t c g  
 g a  
 3 6 6 1   g g c a g t t c t g   t t t a c c a g g a   a g c c a t g  
 a a t   c a a c c a g g c c   a c c t c a g a c t   c t t t g t g a  
 c a  
 3 7 2 1   a g g a t c a t g c   a g g a a t t t g a   a a g t g a c  
 a c g   t t t t t c c c a g   a a a t t g a t t t   g g g g a a a t  
 a t  
 3 7 8 1   a a a c t t c t c c   c a g a a t a c c c   a g g c g t c  
 c t c   t c t g a g g t c c   a g g a g g a a a a   a g g c a t c a  
 a g  
 3 8 4 1   t a t a a g t t t g   a a g t c t a c g a   g a a g a a a  
 g a c   t a a t c g a g a a   t t g t c t a g a c   t g c c c g g g  
 t g  
 3 9 0 1   g c a t c c c t g t   g a c c c c t c c c   c a g t g c c  
 t c t   c c t g g t c g t g   g a a g g t g c t a   c t c c a g t g  
 c c  
 3 9 6 1   c a c c a g c c t t   g t c c t a a t a a   a a t t a a g  
 t t g   c a t c a t t t t g   t t t g a c t a g g   t g t c c t t g  
 t a  
 4 0 2 1   t a a t a t t a t g   g g g t g g a g g c   g g g t g g t  
 a t g   g a g c a a g g g g   c a g g t t g g g a   a g a c a a c c  
 t g  
 4 0 8 1   t a g g g c c t t c   a g g g t c t a t t   g g g a a c c  
 a g g   c t g g a g t g c a   g t g g c a c g a t   c t t g g c t c  
 g c  
 4 1 4 1   t g c a a t c t c c   g c c t c c t g g g   t t c a a g c  
 g a t   t c t c c t g c c t   c a g t c t c c c g   a a t a g t t g  
 g g  
 4 2 0 1   a t t c c a g g c a   t g c a c g a c c a   g g c t c a g  
 c t a   a t t t t t g t a t   t t t t g g t a g a   g a c g g g g t  
 t t

10

20

30

40

50



## 【化 2 6 - 7】

4 2 6 1   c a c c a t a t t g   g c c a g t c t g g   t c t c c a t  
 c t c   c t g a c c t c a g   g t a a t c c g c c   c g c c t c g g  
 c c  
 4 3 2 1   t c c c a a a t t g   c t g g g a t t a c   a g g t a t g  
 a g c   c a c t g g g c c c   t t c c c t g t c c   t g t g a t t t  
 t a  
 4 3 8 1   a a a t a a t t a t   a c c a g c a g a a   g g a c g t c  
 c a g   a c a c a g c a t g   g g c t a c c t g g   c c a t g c c c  
 a g  
 4 4 4 1   c c a g t t g g a c   a t t t g a g t t g   t t t g c t t  
 g g c   a c t g t c c t c t   c a t c a a t t c a   c t g g c c g t  
 c g  
 4 5 0 1   t t t t a c a a c g   t c g t g a c t g g   g a a a a c c  
 c t g   g c g t t a c c c a   a c t t a a t c g c   c t t g c a g c  
 a c  
 4 5 6 1   a t c c c c c t t t   c g c c a g c t g g   c g t a a t a  
 g c g   a a g a g g c c c g   c a c c g a t c g c   c c t t c c c a  
 a c  
 4 6 2 1   a g t t g c g c a g   c c t g a a t g g c   g a a t g g c  
 g c c   t g a t g c g g t a   t t t t c t c c t t   a c g c a t c t  
 g t  
 4 6 8 1   g c g g t a t t t c   a c a c c g c a t a   t g g t g c a  
 c t c   t c a g t a c a a t   c t g c t c t g a t   g c c g c a t a  
 g t  
 4 7 4 1   t a a g c c a g c c   c c g a c a c c c g   c c a a c a c  
 c c g   c t g a c g c g c c   c t g a c g g g c t   t g t c t g c t  
 c c  
 4 8 0 1   c g g c a t c c g c   t t a c a g a c a a   g c t g t g a  
 c c g   t c t c c g g g a g   c t g c a t g t g t   c a g a g g t t  
 t t  
 4 8 6 1   c a c c g t c a t c   a c c g a a a c g c   g c g a g a c  
 g a a   a g g g c c t c g t   g a t a c g c c t a   t t t t t a t a  
 g g  
 4 9 2 1   t t a a t g t c a t   g a t a a t a a t g   g t t t c t t  
 a g a   c g t c a g g t g g   c a c t t t t c g g   g g a a a t g t  
 g c  
 4 9 8 1   g c g g a a c c c c   t a t t t g t t t a   t t t t t c t  
 a a a   t a c a t t c a a a   t a t g t a t c c g   c t c a t g a g  
 a c  
 5 0 4 1   a a t a a c c c t g   a t a a a t g c t t   c a a t a a t  
 a t t   g a a a a a g g a a   g a g t a t g a g t   a t t c a a c a  
 t t

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 8】

5 1 0 1 t c c g t g t c g c c c t t a t t c c c t t t t t g  
c g g c a t t t t g c c t t c c t g t t t t t g c t c a c c c  
a g  
5 1 6 1 a a a c g c t g g t g a a a g t a a a a g a t g c t g  
a a g a t c a g t t g g g t g c a c g a g t g g g t t a c a t  
c g  
5 2 2 1 a a c t g g a t c t c a a c a g c g g t a a g a t c c  
t t g a g a g t t t t c g c c c c g a a g a a c g t t t t c c  
a a  
5 2 8 1 t g a t g a g c a c t t t t a a a g t t c t g c t a t  
g t g g c g c g g t a t t a t c c c g t a t t g a c g c c g g  
g c  
5 3 4 1 a a g a g c a a c t c g g t c g c c g c a t a c a c t  
a t t c t c a g a a t g a c t t g g t t g a g t a c t c a c c  
a g  
5 4 0 1 t c a c a g a a a a g c a t c t t a c g g a t g g c a  
t g a c a g t a a g a g a a t t a t g c a g t g c t g c c a t  
a a  
5 4 6 1 c c a t g a g t g a t a a c a c t g c g g c c a a c t  
t a c t t c t g a c a a c g a t c g g a g g a c c g a a g g a  
g c  
5 5 2 1 t a a c c g c t t t t t t g c a c a a c a t g g g g g  
a t c a t g t a a c t c g c c t t g a t c g t t g g g a a c c  
g g  
5 5 8 1 a g c t g a a t g a a g c c a t a c c a a a c g a c g  
a g c g t g a c a c c a c g a t g c c t g t a g c a a t g g c  
a a  
5 6 4 1 c a a c g t t g c g c a a a c t a t t a a c t g g c g  
a a c t a c t t a c t c t a g c t t c c c g g c a a c a a t t  
a a  
5 7 0 1 t a g a c t g g a t g g a g g c g g a t a a a g t t g  
c a g g a c c a c t t c t g c g c t c g g c c c t t c c g g c  
t g  
5 7 6 1 g c t g g t t t a t t g c t g a t a a a t c t g g a g  
c c g g t g a g c g t g g g t c t c g c g g t a t c a t t g c  
a g  
5 8 2 1 c a c t g g g g c c a g a t g g t a a g c c c t c c c  
g t a t c g t a g t t a t c t a c a c g a c g g g g a g t c a  
g g  
5 8 8 1 c a a c t a t g g a t g a a c g a a a t a g a c a g a  
t c g c t g a g a t a g g t g c c t c a c t g a t t a a g c a  
t t

10

20

30

40

50

## 【化 2 6 - 9】

5 9 4 1 g g t a a c t g t c a g a c c a a g t t t a c t c a t  
a t a t a c t t t a g a t t g a t t t a a a a c t t c a t t t  
t t  
6 0 0 1 a a t t t a a a a g g a t c t a g g t g a a g a t c c  
t t t t t g a t a a t c t c a t g a c c a a a a t c c c t t a  
a c  
6 0 6 1 g t g a g t t t t c g t t c c a c t g a g c g t c a g  
a c c c c g t a g a a a a g a t c a a a g g a t c t t c t t g  
a g  
6 1 2 1 a t c c t t t t t t t c t g c g c g t a a t c t g c t  
g c t t g c a a a c a a a a a a a c c a c c g c t a c c a g c  
g g  
6 1 8 1 t g g t t t g t t t g c c g g a t c a a g a g c t a c  
c a a c t c t t t t t c c g a a g g t a a c t g g c t t c a g  
c a  
6 2 4 1 g a g c g c a g a t a c c a a a t a c t g t t c t t c  
t a g t g t a g c c g t a g t t a g g c c a c c a c t t c a a  
g a  
6 3 0 1 a c t c t g t a g c a c c g c c t a c a t a c c t c g  
c t c t g c t a a t c c t g t t a c c a g t g g c t g c t g c  
c a  
6 3 6 1 g t g g c g a t a a g t c g t g t c t t a c c g g g t  
t g g a c t c a a g a c g a t a g t t a c c g g a t a a g g c  
g c  
6 4 2 1 a g c g g t c g g g c t g a a c g g g g g g t t c g t  
g c a c a c a g c c c a g c t t g g a g c g a a c g a c c t a  
c a  
6 4 8 1 c c g a a c t g a g a t a c c t a c a g c g t g a g c  
t a t g a g a a a g c g c c a c g c t t c c c g a a g g g a g  
a a  
6 5 4 1 a g g c g g a c a g g t a t c c g g t a a g c g g c a  
g g g t c g g a a c a g g a g a g c g c a c g a g g g a g c t  
t c  
6 6 0 1 c a g g g g g a a a c g c c t g g t a t c t t t a t a  
g t c c t g t c g g g t t t c g c c a c c t c t g a c t t g a  
g c  
6 6 6 1 g t c g a t t t t t g t g a t g c t c g t c a g g g g  
g g c g g a g c c t a t g g a a a a a c g c c a g c a a c g c  
g g  
6 7 2 1 c c t t t t t a c g g t t c c t g g c c t t t t g c t  
g g c c t t t t g c t c a c a t g t t c t t t c c t g c g t t  
a t

10

20

30

40

50

## 【化26-10】

6781 c c c c t g a t t c t g t g g a t a a c c g t a t t a  
 c c g c c t t t g a g t g a g c t g a t a c c g c t c g c c g  
 c a  
 6841 g c c g a a c g a c c g a g c g c a g c g a g t c a g  
 t g a g c g a g g a a g c g g a a g a g c g c c c a a t a c g  
 c a  
 6901 a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g a  
 t t c a t t a a t g c a g c t g g c a c g a c a g g t t t c c  
 c g  
 6961 a c t g g a a a g c g g g c a g t g a g c g c a a c g  
 c a a t t a a t g t g a g t t a g c t c a c t c a t t a g g c  
 a c  
 7021 c c c a g g c t t t a c a c t t t a t g c t t c c g g  
 c t c g t a t g t t g t g t g g a a t t g t g a g c g g a t a  
 a c  
 7081 a a t t t c a c a c a g g a a a c a g c t a t g a c c  
 a t g a t t a c g c c a (配列番号43)

10

20

MP4B突然変異(K370S、V397I、F405K)を有するIgG1Fc、pMP259のDNA配列:

## 【化27-1】

1 a g c t t g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a  
 t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t  
 c a  
 61 t a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c  
 a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a  
 c c  
 121 g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a c g t c  
 a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a  
 a t  
 181 a g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t  
 g g a g t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a  
 g t  
 241 a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c a a g t a c  
 g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g  
 c c  
 301 c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c  
 c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c  
 t a  
 361 c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t  
 g a t g c g g t t t t g g c a g t a c a t c a a t g g g c g t  
 g g  
 421 a t a g c g g t t t g a c t c a c g g g g a t t t c c

30

40

50

## 【化 27 - 2】

```

a a g   t c t c c a c c c c   a t t g a c g t c a   a t g g g a g t
t t
  481   g t t t t g g c a c   c a a a a t c a a c   g g g a c t t
t c c   a a a a t g t c g t   a a c a a c t c c g   c c c c a t t g
a c
  541   g c a a a t g g g c   g g t a g g c g t g   t a c g g t g
g g a   g g t c t a t a t a   a g c a g a g c t c   g t t t a g t g
a a
  601   c c g t c a g a t c   g c c t g g a g a c   g c c a t c c
a c g   c t g t t t t g a c   c t c c a t a g a a   g a c a c c g g
g a
  661   c c g a t c c a g c   c t c c g c g g c c   g g g a a c g
g t g   c a t t g g a a c g   c g g a t t c c c c   g t g c c a a g
a g
  721   t g a c g t a a g t   a c c g c c t a t a   g a g t c t a
t a g   g c c c a c c c c c   t t g g c t t c t t   a t g c a t g c
t a
  781   t a c t g t t t t t   g g c t t g g g g t   c t a t a c a
c c c   c c g c t t c c t c   a t g t t a t a g g   t g a t g g t a
t a
  841   g c t t a g c c t a   t a g g t g t g g g   t t a t t g a
c c a   t t a t t g a c c a   c t c c c c t a t t   g g t g a c g a
t a
  901   c t t t c c a t t a   c t a a t c c a t a   a c a t g g c
t c t   t t g c c a c a a c   t c t c t t t a t t   g g c t a t a t
g c
  961   c a a t a c a c t g   t c c t t c a g a g   a c t g a c a
c g g   a c t c t g t a t t   t t t a c a g g a t   g g g g t c t c
a t
1021   t t a t t a t t t a   c a a a t t c a c a   t a t a c a a
c a c   c a c c g t c c c c   a g t g c c c g c a   g t t t t t a t
t a
1081   a a c a t a a c g t   g g g a t c t c c a   c g c g a a t
c t c   g g g t a c g t g t   t c c g g a a c g g   t g g a g g g c
a g
1141   t g t a g t c t g a   g c a g t a c t c g   t t g c t g c
c g c   g c g c g c c a c c   a g a c a t a a t a   g c t g a c a g
a c
1201   t a a c a g a c t g   t t c c t t t c c a   t g g g t c t
t t t   c t g c a g t c a c   c g t c c t t g a c   a c g g g a t c
c g
1261   c g g c c g c c A T   G G A G A C A G A C   A C A C T C C

```

10

20

30

40

50

## 【化 27 - 3】

TGC TATGGGTACT GCTGCTCTGG GTTCCAGG  
 TT  
 1321 CCAccggTGA CAAGACTCAC ACATGCC  
 CAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGG  
 AC  
 1381 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAAC  
 CCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCC  
 TG  
 1441 AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGA  
 GCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTG  
 GT  
 1501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATG  
 CCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAA  
 CA  
 1561 GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCA  
 CCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAA  
 GG  
 1621 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAG  
 CCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTC  
 CA  
 1681 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCAC  
 AGG TGTACACCCT GCCCCCATCC CGGGATGA  
 GC  
 1741 TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCT  
 GCC TGGTCAGCGG CTTCTATCCC AGCGACAT  
 CG  
 1801 CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGC  
 CGG AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCAT  
 CT  
 1861 TGGACTCCGA CGGCTCCTTC AAACCTCT  
 ACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTG  
 GC  
 1921 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCG  
 TGA TGCATGAGGC TCTGCACAAAC CACTACAC  
 GC  
 1981 AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTT  
 AGt aat taattaa tgc atctagg gcggccaa  
 tt  
 2041 ccgccccctct ccc tcccccc cccctaa  
 cgt tactggccga agccgccttggaataaggcc  
 cg  
 2101 gtgtgcgttt gtctatatgt tat ttttc

10

20

30

40

50

## 【化 2 7 - 4】

c a c c a t a t t g c c g t c t t t t g g c a a t g t g a g g  
 g c  
 2 1 6 1 c c g g a a a c c t g g c c c t g t c t t c t t g a c  
 g a g c a t t c c t a g g g g t c t t t c c c c t c t c g c c  
 a a  
 2 2 2 1 a g g a a t g c a a g g t c t g t t g a a t g t c g t  
 g a a g g a a g c a g t t c c t c t g g a a g c t t c t t g a  
 a g  
 2 2 8 1 a c a a a c a a c g t c t g t a g c g a c c c t t t g  
 c a g g c a g c g g a a c c c c c c a c c t g g c g a c a g g  
 t g  
 2 3 4 1 c c t c t g c g g c c a a a a g c c a c g t g t a t a  
 a g a t a c a c c t g c a a a g g c g g c a c a a c c c c a g  
 t g  
 2 4 0 1 c c a c g t t g t g a g t t g g a t a g t t g t g g a  
 a a g a g t c a a a t g g c t c t c c t c a a g c g t a t t c  
 a a  
 2 4 6 1 c a a g g g g c t g a a g g a t g c c c a g a a g g t  
 a c c c c a t t g t a t g g g a t c t g a t c t g g g g c c t  
 c g  
 2 5 2 1 g t g c a c a t g c t t t a c a t g t g t t t a g t c  
 g a g g t t a a a a a a c g t c t a g g c c c c c g a a c  
 c a  
 2 5 8 1 c g g g g a c g t g g t t t t c c t t t g a a a a a c  
 a c g a t g a t a a t a t g g c c a c a a c c a t g g t t a c  
 c g  
 2 6 4 1 a g t a c a a g c c c a c g g t g c g c c t c g c c a  
 c c c g c g a c g a c g t c c c c a g g g c c g t a c g c a c  
 c c  
 2 7 0 1 t c g c c g c c g c g t t c g c c g a c t a c c c c g  
 c c a c g c g c c a c a c c g t c g a t c c g g a c c g c c a  
 c a  
 2 7 6 1 t c g a g c g g g t c a c c g a g c t g c a a g a a c  
 t c t t c c t c a c g c g c g t c g g g c t c g a c a t c g g  
 c a  
 2 8 2 1 a g g t g t g g g t c g c g g a c g a c g g c g c c g  
 c g g t g g c g g t c t g g a c c a c g c c g g a g a g c g t  
 c g  
 2 8 8 1 a a g c g g g g g c g g t g t t c g c c g a g a t c g  
 g c c c g c g c a t g g c c g a g t t g a g c g g t t c c c g  
 g c  
 2 9 4 1 t g g c c g c g c a g c a a c a g a t g g a a g g c c

10

20

30

40

50

## 【化 27 - 5】

t c c t g g c g c c g c a c c g g c c c a a g g a g c c c g c  
 g t  
 3 0 0 1 g g t t c c t g g c c a c c g t c g g c g t c t c g c  
 c c g a c c a c c a g g g c a a g g g t c t g g g c a g c g c  
 c g  
 3 0 6 1 t c g t g c t c c c c g g a g t g g a g g c g g c c g  
 a g c g c g c c g g g g t g c c c g c c t t c c t g g a g a c  
 c t  
 3 1 2 1 c c g c g c c c c g c a a c c t c c c c t t c t a c g  
 a g c g g c t c g g c t t c a c c g t c a c c g c c g a c g t  
 c g  
 3 1 8 1 a g g t g c c c g a a g g a c c g c g c a c c t g g t  
 g c a t g a c c c g c a a g c c c g g t g c c t g a g t c g a  
 t g  
 3 2 4 1 a t a a t c g a t t a g a c t g c c c g g g t g g c a  
 t c c c t g t g a c c c c t c c c c a g t g c c t c t c c t g  
 g t  
 3 3 0 1 c g t g g a a g g t g c t a c t c c a g t g c c c a c  
 c a g c c t t g t c c t a a t a a a a t t a a g t t g c a t c  
 a t  
 3 3 6 1 t t t g t t t g a c t a g g t g t c c t t g t a t a a  
 t a t t a t g g g g t g g a g g c g g g t g g t a t g g a g c  
 a a  
 3 4 2 1 g g g g c a g g t t g g g a a g a c a a c c t g t a g  
 g g c c t t c a g g g t c t a t t g g g a a c c a g g c t g g  
 a g  
 3 4 8 1 t g c a g t g g c a c g a t c t t g g c t c g c t g c  
 a a t c t c c g c c t c c t g g g t t c a a g c g a t t c t c  
 c t  
 3 5 4 1 g c c t c a g t c t c c c g a a t a g t t g g g a t t  
 c c a g g c a t g c a c g a c c a g g c t c a g c t a a t t t  
 t t  
 3 6 0 1 g t a t t t t t g g t a g a g a c g g g g t t t c a c  
 c a t a t t g g c c a g t c t g g t a t c c a t c t c c t g a  
 c c  
 3 6 6 1 t c a g g t a a t c c g c c c g c c t c g g c c t c c  
 c a a a t t g c t g g g a t t a c a g g t a t g a g c c a c t  
 g g  
 3 7 2 1 g c c c t t c c c t g t c c t g t g a t t t t a a a a  
 t a a t t a t a c c a g c a g a a g g a c g t c c a g a c a c  
 a g  
 3 7 8 1 c a t g g g c t a c c t g g c c a t g c c c a g c c a

10

20

30

40

50



## 【化 2 7 - 6】

g t t g g a c a t t t g a g t t g t t t g c t t g g c a c t g  
t c  
3 8 4 1 c t c t c a t c a a t t c g a g c t c a c t g g c c g  
t c g t t t t a c a a c g t c g t g a c t g g g a a a a c c c  
t g  
3 9 0 1 g c g t t a c c c a a c t t a a t c g c c t t g c a g  
c a c a t c c c c c t t t c g c c a g c t g g c g t a a t a g  
c g  
3 9 6 1 a a g a g g c c c g c a c c g a t c g c c c t t c c c  
a a c a g t t g c g c a g c c t g a a t g g c g a a t g g c g  
c c  
4 0 2 1 t g a t g c g g t a t t t t c t c c t t a c g c a t c  
t g t g c g g t a t t t c a c a c c g c a t a t g g t g c a c  
t c  
4 0 8 1 t c a g t a c a a t c t g c t c t g a t g c c g c a t  
a g t t a a g c c a g c c c c g a c a c c c g c c a a c a c c  
c g  
4 1 4 1 c t g a c g c g c c c t g a c g g g c t t g t c t g c  
t c c c g g c a t c c g c t t a c a g a c a a g c t g t g a c  
c g  
4 2 0 1 t c t c c g g g a g c t g c a t g t g t c a g a g g t  
t t t c a c c g t c a t c a c c g a a a c g c g c g a g a c g  
a a  
4 2 6 1 a g g g c c t c g t g a t a c g c c t a t t t t t a t  
a g g t t a a t g t c a t g a t a a t a a t g g t t t c t t a  
g a  
4 3 2 1 c g t c a g g t g g c a c t t t t c g g g g a a a t g  
t g c g c g g a a c c c c t a t t t g t t t a t t t t t c t a  
a a  
4 3 8 1 t a c a t t c a a a t a t g t a t c c g c t c a t g a  
g a c a a t a a c c c t g a t a a a t g c t t c a a t a a t a  
t t  
4 4 4 1 g a a a a a g g a a g a g t a t g a g t a t t c a a c  
a t t t c c g t g t c g c c c t t a t t c c c t t t t t t g c  
g g  
4 5 0 1 c a t t t t t g c c t t c c t g t t t t t g c t c a c c  
c a g a a a c g c t g g t g a a a g t a a a a g a t g c t g a  
a g  
4 5 6 1 a t c a g t t g g g t g c a c g a g t g g g t t a c a  
t c g a a c t g g a t c t c a a c a g c g g t a a g a t c c t  
t g  
4 6 2 1 a g a g t t t t c g c c c c g a a g a a c g t t t t c

10

20

30

40

50

## 【化 27 - 7】

c a a t g a t g a g c a c t t t t a a a g t t c t g c t a t g  
t g  
4 6 8 1 g c g c g g t a t t a t c c c g t a t t g a c g c c g  
g g c a a g a g c a a c t c g g t c g c c g c a t a c a c t a  
t t  
4 7 4 1 c t c a g a a t g a c t t g g t t g a g t a c t c a c  
c a g t c a c a g a a a a g c a t c t t a c g g a t g g c a t  
g a  
4 8 0 1 c a g t a a g a g a a t t a t g c a g t g c t g c c a  
t a a c c a t g a g t g a t a a c a c t g c g g c c a a c t t  
a c  
4 8 6 1 t t c t g a c a a c g a t c g g a g g a c c g a a g g  
a g c t a a c c g c t t t t t t g c a c a a c a t g g g g g a  
t c  
4 9 2 1 a t g t a a c t c g c c t t g a t c g t t g g g a a c  
c g g a g c t g a a t g a a g c c a t a c c a a a c g a c g a  
g c  
4 9 8 1 g t g a c a c c a c g a t g c c t g t a g c a a t g g  
c a a c a a c g t t g c g c a a a c t a t t a a c t g g c g a  
a c  
5 0 4 1 t a c t t a c t c t a g c t t c c c g g c a a c a a t  
t a a t a g a c t g g a t g g a g g c g g a t a a a g t t g c  
a g  
5 1 0 1 g a c c a c t t c t g c g c t c g g c c c t t c c g g  
c t g g c t g g t t t a t t g c t g a t a a a t c t g g a g c  
c g  
5 1 6 1 g t g a g c g t g g t t c c c g c g g t a t c a t t g  
c a g c a c t g g g g c c a g a t g g t a a g c c c t c c c g  
t a  
5 2 2 1 t c g t a g t t a t c t a c a c g a c g g g g a g t c  
a g g c a a c t a t g g a t g a a c g a a a t a g a c a g a t  
c g  
5 2 8 1 c t g a g a t a g g t g c c t c a c t g a t t a a g c  
a t t g g t a a c t g t c a g a c c a a g t t t a c t c a t a  
t a  
5 3 4 1 t a c t t t a g a t t g a t t t a a a a c t t c a t t  
t t t a a t t t a a a a g g a t c t a g g t g a a g a t c c t  
t t  
5 4 0 1 t t g a t a a t c t c a t g a c c a a a a t c c c t t  
a a c g t g a g t t t t c g t t c c a c t g a g c g t c a g a  
c c  
5 4 6 1 c c g t a g a a a a g a t c a a a g g a t c t t c t t

10

20

30

40

50

## 【化 2 7 - 8】

g a g a t c c t t t t t t t c t g c g c g t a a t c t g c t g  
 c t  
 5 5 2 1 t g c a a a c a a a a a a a c c a c c g c t a c c a g  
 c g g t g g t t t g t t t g c c g g a t c a a g a g c t a c c  
 a a  
 5 5 8 1 c t c t t t t t t c c g a a g g t a a c t g g c t t c a  
 g c a g a g c g c a g a t a c c a a a t a c t g t t c t t c t  
 a g  
 5 6 4 1 t g t a g c c g t a g t t a g g c c a c c a c t t c a  
 a g a a c t c t g t a g c a c c g c c t a c a t a c c t c g c  
 t c  
 5 7 0 1 t g c t a a t c c t g t t a c c a g t g g c t g c t g  
 c c a g t g g c g a t a a g t c g t g t c t t a c c g g g t t  
 g g  
 5 7 6 1 a c t c a a g a c g a t a g t t a c c g g a t a a g g  
 c g c a g c g g t c g g g c t g a a c g g g g g g t t c g t g  
 c a  
 5 8 2 1 c a c a g c c c a g c t t g g a g c g a a c g a c c t  
 a c a c c g a a c t g a g a t a c c t a c a g c g t g a g c t  
 a t  
 5 8 8 1 g a g a a a g c g c c a c g c t t c c c g a a g g g a  
 g a a a g g c g g a c a g g t a t c c g g t a a g c g g c a g  
 g g  
 5 9 4 1 t c g g a a c a g g a g a g c g c a c g a g g g a g c  
 t t c c a g g g g g a a a c g c c t g g t a t c t t t a t a g  
 t c  
 6 0 0 1 c t g t c g g g t t t c g c c a c c t c t g a c t t g  
 a g c g t c g a t t t t t g t g a t g c t c g t c a g g g g g  
 g c  
 6 0 6 1 g g a g c c t a t g g a a a a c g c c a g c a a c g  
 c g g c c t t t t t a c g g t t c c t g g c c t t t t g c t g  
 g c  
 6 1 2 1 c t t t t g c t c a c a t g t t c t t t c c t g c g t  
 t a t c c c c t g a t t c t g t g g a t a a c c g t a t t a c  
 c g  
 6 1 8 1 c c t t t g a g t g a g c t g a t a c c g c t c g c c  
 g c a g c c g a a c g a c c g a g c g c a g c g a g t c a g t  
 g a  
 6 2 4 1 g c g a g g a a g c g g a a g g g c g c c c a a t a c  
 g c a a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g a t  
 t c  
 6 3 0 1 a t t a a t g c a g c t g g c a c g a c a g g t t t c

10

20

30

40

50

## 【化 27 - 9】

```

c c g   a c t g g a a a g c   g g g c a g t g a g   c g c a a c g c
a a
6 3 6 1   t t a a t g t g a g   t t a g c t c a c t   c a t t a g g
c a c   c c c a g g c t t t   a c a c t t t a t g   c t t c c g g c
t c
6 4 2 1   g t a t g t t g t g   t g g a a t t g t g   a g c g g a t
a a c   a a t t t c a c a c   a g g a a a c a g c   t a t g a c c a
t g
6 4 8 1   a t t a c g c c a           (配列番号 44)

```

10

## 【0114】

## 実施例 2：重鎖ヘテロ二量体化突然変異の試験

リジン再配置設計のさらなる特性評価を行うために、突然変異を完全な I g G 1 重鎖の中に組み込んだ。これらの構築物は、潜在的影響を制限しかつ軽鎖対合問題を回避するために両方の重鎖上に同じ F a b (抗 E G F R M 6 0 - A 0 2) を含有していた。等量の 2 つの重鎖、及び M 6 0 - A 0 2 の軽鎖を C H O - 過性発現体において発現させ、上清を S D S - P A G E で分析した。どの上清も、1 本の重鎖と 1 本の軽鎖とからなる半抗体をかなりの量で含有していたが、L C - M C ピーク (データ示さず) の定量によって示されるとおり設計 M P 4 は M P 3 と比べてより少ない量の半抗体を生成した。さらに、質量分析からは、これらの試料において半抗体が重鎖 B によってのみ形成されていることが明らかになった (データ示さず)。これは、半抗体形成が重鎖 B の過剰発現の結果であり得ることを示唆しており、それは、2 つの重鎖同士の比を最適化することによって半抗体のレベルを低減する可能性を切り開くものである。それゆえ、同一の F a b を有する設計 M P 4 の重鎖 (プラスミド p M P 2 5 4 及び p M P 3 9 9) を 1 : 5 ~ 5 : 1 の様々な比で C H O - S 細胞内にトランスフェクトした。重鎖の総量 (14 µg) 及び軽鎖の量は、これらのトランスフェクションにおいて一定に保った。鎖 A の過剰発現は、半抗体の形成を減少させて上清中の完全 I g G の量を増加させ、半抗体形成が鎖同士の示差的発現によって影響を受けることを裏付けた (図 4 A)。これらの実験ではどちらの重鎖も同じ F a b (抗 E G F R M 6 0) を含有していたことから、2 つの重鎖の示差的発現は C H 3 突然変異に起因している可能性がある。しかしながら、質量分析は、どちらの鎖の過剰発現もそれぞれのホモ二量体の形成の増加を招くということも実証した (図 4 B)。したがって、2 本の重鎖間で等しい比率は、望ましくない副生成物を最小限にする好適な妥協点である。

20

30

## 【0115】

## 実施例 3：軽鎖対合問題に対する解決策の開発

図 1 に示されているような二特異性抗体における軽鎖：重鎖 (L C : H C) 対の正しい会合を引き起こすためには、誤った会合が立体的衝突または電荷の反発によって防止されるように鎖間の界面が操作され得る。抗体の軽鎖は可変ドメイン及び定常ドメインにおいて重鎖と接触し、どちらの接触 (V L : V H 及び C L : C H 1) も認識及び係合に寄与する。それゆえ、定常ドメインにおける点突然変異は、各軽鎖を正しい対合へと導くのに十分でない可能性があり、可変ドメインの操作が必要となる可能性がある。したがって、軽鎖対合を解決するための代替方策を探究した。

40

## 【0116】

抗体の可変ドメインは、定常領域の不在下で、または異種タンパク質と融合している場合に、それらの結合性を維持することができる。本発明者らは、軽鎖の誤対合を防止する方策として C H 1 / C L の代わりに I g フォールドドメインが使用され得るという仮説を立て、C H 1 : C L ドメインを置き換える候補 I g フォールドドメインとして I g E (C 2) の C H 2 ドメインを選択した (図 5 A)。I g E (C 2) の C H 2 ドメインは、2 つの鎖間ジスルフィドによって繋がられたホモ二量体を形成する。このドメインは、(

50

I g E には存在していない) ヒンジ領域の代わりとして、I g E 重鎖間の二量体化界面の役割を果たす。さらに、I g G の C H 2 ドメインとは違い、C 2 ドメインはエフェクター機能に参与せず、F c R I と接触しない (H o l d o m e t a l . , N a t u r e S t r u c t . & M o l . B i o l . , 1 8 : 5 7 1 - 5 7 6 , 2 0 1 1 ) 。

#### 【 0 1 1 7 】

C 2 ドメインの構造は他の I g フォールドドメイン、例えば C L 及び C H 1 ドメインと類似しているが、二量体のユニット間の界面及び角度は異なっている (図 5 B ) 。二量体の 2 つの C 2 ドメインは他の I g フォールドドメインと比べて広範囲の相互作用がより少なく、相互作用には通常の無極性残基ではなく極性残基が優勢である。このように、C 2 と C H 1 : C L とは全体的に非常に異なっているため、I g フォールドドメインの交差対合の可能性は低い。しかしながら、I g フォールドの第 1 ストランドの始まりを示す 2 つのプロリン (図 5 C 中で下線付きの太字で強調されている) は、C 2 定常ドメイン及び C H 1 / カッパ定常ドメインの構造において類似した位置にある。したがって、抗体の可変ドメインを C 2 ドメインと融合させること及び、V H : V L 対の形状、したがってその結合性を維持することは、可能であると見受けられる。C 2 ドメインと融合した抗体の可変ドメインからなるこのハイブリッド F a b 構築物を「E - F a b」と命名した (図 5 C ) 。ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す ( N 結合型グリコシル化部位に下線を引いてある ) 。

#### 【 化 2 8 】

```

1      V C S R D F T P P T   V K I L Q S S C D G   G G H F P P T I
Q L   L C L V S G Y T P G   T I N I T W L E D G
5 1    Q V M D V D L S T A   S T T Q E G E L A S   T Q S E L T L S
Q K   H W L S D R T Y T C   Q V T Y Q G H T F E
1 0 1   D S T K K C A      (配列番号 1)
```

#### 【 0 1 1 8 】

V H ドメインを C 2 ドメインと融合させるために、I g G 1 C H 1 定常領域のコネクタ配列 ( A S T K G (配列番号 7) ) と、P r o 2 ( C ドメインの I M G T 特有の付番、図 5 C ) から始まる C 2 ドメインの第 1 ストランドとを結び合わせた。最初の 8 つのアミノ酸 ( V C S R D F T P (配列番号 8) ) がヒト I g G 1 C H 1 ドメインの最初の 5 つのアミノ酸 (エルボー領域 A S T K G (配列番号 7) に下線を引いてある) で置き換わったヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【 化 2 9 】

```

1      A S T K G P T V K I   L Q S S C D G G G H   F P P T I Q L L
C L   V S G Y T P G T I N   I T W L E D G Q V M
5 1    D V D L S T A S T T   Q E G E L A S T Q S   E L T L S Q K H
W L   S D R T Y T C Q V T   Y Q G H T F E D S T
1 0 1   K K C A      (配列番号 4 5)
```

#### 【 0 1 1 9 】

カッパ定常領域由来のコネクタ ( R T V A A (配列番号 9) ) を使用して、同じ方策を用いて V L を C 2 ドメインと融合させた。最初の 8 つのアミノ酸 ( V C S R D F T P (配列番号 8) ) がヒトカッパドメインの最初の 5 つのアミノ酸 (エルボー領域 R T V A A (配列番号 9) に下線を引いてある) で置き換わったヒト免疫グロブリン E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

10

20

30

40

50

## 【化30】

```

1      RTVAAPTVKI  LQSSCDGGGH  FPPTIQLL
CL  VSGYTPGTIN  ITWLEDGQVM
51    DVDLSTASTT  QEGELASTQS  ELTLSQKH
WL   SDRTYTCQVT  YQGHTFEDST
101   KKCA      (配列番号46)

```

## 【0120】

ヒトC<sub>2</sub>ドメインは1つのN結合型グリコシル化部位をAsn38(IMG T付番)に有し、E-FabではそれをGlnに突然変異させてこの部位のグリコシル化を防止した。この最初の設計では、可変ドメインがC<sub>2</sub>ドメインと結び付けられており、当該C<sub>2</sub>ドメインは、agly突然変異以外には変更されておらず、重鎖鎖間で同一である。この最初の設計をE-Fab E0と命名した。E-Fabの重鎖のE0設計のアミノ酸配列を以下に示す(Nグリコシル化部位がグルタミンへと突然変異している)。

10

## 【化31】

```

1      ASTKGPTVKI  LQSSCDGGGH  FPPTIQLL
CL  VSGYTPGTIQ  ITWLEDGQVM
51    DVDLSTASTT  QEGELASTQS  ELTLSQKH
WL   SDRTYTCQVT  YQGHTFEDST
101   KKCA      (配列番号3)

```

20

E-Fabの軽鎖のE0設計のアミノ酸配列を以下に示す(Nグリコシル化部位がグルタミンへと突然変異している)。

## 【化32】

```

1      RTVAAPTVKI  LQSSCDGGGH  FPPTIQLL
CL  VSGYTPGTIQ  ITWLEDGQVM
51    DVDLSTASTT  QEGELASTQS  ELTLSQKH
WL   SDRTYTCQVT  YQGHTFEDST
101   KKCA      (配列番号4)

```

30

## 【0121】

しかしながら、C<sub>2</sub>ドメインは通常はホモ二量体化するため、HC:HCまたはLC:LC二量体の形成を防止すべく追加の突然変異を当該ドメインに導入し、これらの設計をE-Fab E1~E3と命名した(表3;位置はIMG T付番方式による)。

40

50

## 【表 3】

表 3. E - F a b 試験のための構築物

F a b A (抗 E G F R M 6 0 - A 0 2)	軽鎖構築物	重鎖構築物 (H S A 融合)
野生型 I g G 1	p X W U 1 7 4	p M P 3 6 3
E - F a b E 0	p M P 3 8 6 (N 3 8 Q)	p M P 3 9 0 (N 3 8 Q)
E - F a b E 1	p M P 3 8 7 (N 3 8 Q、L 2 2 G)	p M P 3 9 1 (N 3 8 Q、L 7 W)
E - F a b E 2	p M P 4 6 3 (N 3 8 Q、T 1 2 1 G)	p M P 3 9 2 (N 3 8 Q、S 1 0 I)
E - F a b E 3	p M P 4 6 4 (N 3 8 Q、T 1 2 1 S)	p M P 4 6 5 (N 3 8 Q、S 1 0 T)
F a b B (抗 I G F - 1 R C 0 6)	軽鎖 (G F P 融合)	重鎖
野生型 I g G 1 (突然 変異なし)	p M P 3 4 0	p M P 3 4 1

10

20

## 【0 1 2 2】

E - F a b の重鎖の E 1 設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化 3 3】

```

1      A S T K G P T V K I   W Q S S C D G G G H   F P P T I Q L L
C L   V S G Y T P G T I Q   I T W L E D G Q V M
5 1    D V D L S T A S T T   Q E G E L A S T Q S   E L T L S Q K H
W L    S D R T Y T C Q V T   Y Q G H T F E D S T
1 0 1   K K C A   (配列番号 4 7)
```

30

## 【0 1 2 3】

E - F a b の軽鎖の E 1 設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化 3 4】

```

1      R T V A A P T V K I   L Q S S C D G G G H   F P P T I Q L G
C L   V S G Y T P G T I Q   I T W L E D G Q V M
5 1    D V D L S T A S T T   Q E G E L A S T Q S   E L T L S Q K H
W L    S D R T Y T C Q V T   Y Q G H T F E D S T
1 0 1   K K C A   (配列番号 4 8)
```

40

## 【0 1 2 4】

E - F a b の重軽鎖の E 2 設計のアミノ酸配列はこの実施例の最後に示されている。

## 【0 1 2 5】

E - F a b の重鎖の E 3 設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化 3 5 - 1】

```

1      A S T K G P T V K I   L Q S T C D G G G H   F P P T I Q L L
C L   V S G Y T P G T I Q   I T W L E D G Q V M
5 1    D V D L S T A S T T   Q E G E L A S T Q S   E L T L S Q K H
```

50

## 【化 3 5 - 2】

W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H T F E D S T  
1 0 1 K K C A (配列番号 4 9)

E - F a b の軽鎖の E 3 設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化 3 6】

1 R T V A A P T V K I L Q S S C D G G G H F P P T I Q L L  
C L V S G Y T P G T I Q I T W L E D G Q V M  
5 1 D V D L S T A S T T Q E G E L A S T Q S E L T L S Q K H  
W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H T F E D S S  
1 0 1 K K C A (配列番号 5 0)

10

## 【0 1 2 6】

軽鎖対合の制御において E - F a b を評価するために、M 6 0 - A 0 2 抗 E G F R と M 1 3 - C 0 6 抗 I G F 1 R との 2 つの F a b を使用して試験構築物を組み立てた。どちらの重鎖もサブグループ H V 3 に属し、それゆえプロテイン A を使用して精製することができる。正しい対合と誤った対合とを S D S p a g e での移動によって簡単に区別するのを可能にするために、試験分子を G F P ( 3 0 k D a 、 F a b B 抗 I G F - 1 R の L C ) または H S A ( 6 6 k D a 、 F a b A または E - F a b の H C 、抗 E G F R ) でタグ付けした ( 図 6 A ) 。 E - F a b 構築物を g B l o c k によって組み立てた。P C R に基づく突然変異によって C 2 ドメインに追加の突然変異を導入し、生成物を制限酵素に基づく方法によって p V 9 0 / p V 1 0 0 に由来する C H O 発現ベクターにクローニングした ( 表 3 ) 。 4 0 m l 規模の C H O - S での一過的なトランスフェクションによって F a b を共発現させた。トランスフェクションから 2 4 時間後に発現のために細胞を 2 8 に遷移させ、8 日後に上清を採取し、遠心分離及び濾過 ( 0 . 2 2 μ m ) によって浄化した。

20

## 【0 1 2 7】

発現したタンパク質の S D S - P A G E による分析は、C 2 ドメインと融合した通常の抗体の可変ドメインからなる E - F a b が軽鎖対合の制御において非常に効率的であったことを示した。M 6 0 - A 0 2 と M 1 3 - C 0 3 6 との 2 つの F a b を野生型 I g G 1 / カッパ F a b として共発現させた場合には、M 6 0 - A 0 2 軽鎖と M 1 3 - C 0 6 重鎖との誤対合が容易に検出された ( 図 6 B ) 。しかしながら、M 6 0 - A 0 2 を E - F a b として作った場合には誤対合はみられなかった。対照的に、C H 1 / C L ドメインでの点突然変異は、この実験において軽鎖誤対合をなくすることができなかった ( データ示さず ) 。同様に、抗 I G F - 1 R M 1 3 - C 0 6 を E - F a b として構築すると、それを別の F a b ( 抗 I G F - 1 R G 1 1 ) と共発現させた場合に誤対合は検出されなかった ( 図 6 C ) 。重要なことに、F a b を個別に発現させて抗原との結合性を O c t e t によって試験した場合、E - f a b 及び野生型 F a b は、抗 H i s チップ上に装填された H i s タグ付 I G F - 1 R に対して同程度に結合した ( 図 6 D ) 。

30

40

## 【0 1 2 8】

したがって、上記データに基づくと、E - F a b は、二特異性抗体の軽鎖対合問題を解決する優れた方策である、というのも、それが厳密に正しい鎖対合を強化し、F a b の結合性が維持されるからである。興味深いことに、C 2 ドメインは E - F a b の鎖同士のホモ二量体の形成を強く誘導しなかった。それにもかかわらず、重軽鎖間でヘテロ二量体を形成するように操作されている設計 E 2 及び E 3 を先に進めて完全二特異体との関連において試験した。重鎖同士の二量体化をいくらか誘導すると見受けられた設計 E 1 ( 図 6 B ) のみ、さらなる試験を行わなかった。E - F a b 設計 E 2 の定常ドメインのペプチド配列を以下に示す。

E - F a b 軽鎖定常領域 a g l y N 3 8 Q ( 設計 E 2 、 T 1 2 1 G 、 p M P 4 6 3 ) の

50



## アミノ酸配列

## 【化37】

1        R T V A A P T V K I    L Q S S C D G G G H    F P P T I Q L L  
 C L    V S G Y T P G T I Q    I T W L E D G Q V M    D V D L S T A S T  
 T  
 6 1        Q E G E L A S T Q S    E L T L S Q K H W L    S D R T Y T C Q  
 V T    Y Q G H T F E D S G    K K C A        (配列番号6)

E - F a b 重鎖定常領域 a g l y    N 3 8 Q (設計 E 2、S 1 0 1、p M P 3 9 2) のア  
 ミノ酸配列

10

## 【化38】

1        A S T K G P T V K I    L Q S I C D G G G H    F P P T I Q L L  
 C L    V S G Y T P G T I Q    I T W L E D G Q V M    D V D L S T A S T  
 T  
 6 1        Q E G E L A S T Q S    E L T L S Q K H W L    S D R T Y T C Q  
 V T    Y Q G H T F E D S T    K K C A        (配列番号5)

## 【0129】

20

実施例4：二特異性非対称 I g G の組立て及び試験

E - F a b とリジン再配置構築物とを組み合わせると完全 I g G 様二特異性抗体を作製した。そのような二特異性抗体は4本の異なる鎖からなり、軽鎖対合解決策と重鎖ヘテロ二量体化解決策とを両方含有している(図7)。抗 E G F R 抗体 M 6 0 - A 0 2 と抗 I G F 1 R    M 1 3 . C 0 6 または G 1 1 とを再び使用して、ヘテロ二量体化突然変異 M P 3 を有する2本の異なる I g G 1 重鎖を組み立てた。

成熟 M 6 0 - A 0 2    E 体    重鎖 (E F a b    E 2、m p 3 a ヘテロ二量体化、p M P 4 0 1) のアミノ酸配列 (C H 2 ドメインに下線を引き、C H 3 ドメインを太字で示している)

## 【化39-1】

E V Q L L E S G G G    L V Q P G G S L R L    S C A A S G F T F S    D  
 Y I M H W V R Q A    P G K G L E W V S V    I S S S G G D T S Y    A D  
 S V K G R F T I    S R D N S K N T L Y    L Q M N S L R A E D    T A V  
 Y Y C A K V L    A G Y F D W L P F D    Y W G Q G T L V T V    S S A S  
T K G P T V    K I L Q S I C D G G    G H F P P T I Q L L    C L V S G  
Y T P G T    I Q I T W L E D G Q    V M D V D L S T A S    T T Q E G E  
L A S T    Q S E L T L S Q K H    W L S D R T Y T C Q    V T Y Q G H T  
F E D    S T K K C A S D K T    H T C P P C P A P E    L L G G P S V F  
 L F    P P K P K D T L M I    S R T P E V T C V V    V D V S H E D P E

30

40

## 【化39-2】

V    K F N W Y V D G V E    V H N A K T K P R E    E Q Y N S T Y R V V  
 S V L T V L H Q D W    L N G K E Y K C K V    S N K A L P A P I E    K  
 T I S K A K G Q P    R E P Q V Y T L P P    S R D E L T K N Q V    K L  
 T C L V K G F Y    P S D I A V E W E S    N G Q P E N N Y K T    T P P  
 V L D S D G S    F F L Y S S L T V D    K S R W Q Q G N V F    S C S V  
 M H E A L H    N H Y T Q K S L S L    S P G        (配列番号51)

50

成熟M60-A02 E体 軽鎖(EFab E2、pMP463)のアミノ酸配列(CH2ドメインに下線を引いている)

【化40】

DIQMTQSPAT LSLSPGETAT LSCRASQSVS Y  
YLA WYQQKP GQAPRLLIYD TFNRATGIPA RF  
SGSGSGTD FTLTISRLEP EDFAVYYCQQ YGS  
SPPWLTF GGGTKVEIKR TVAAPTTVKIL QSSC  
DGGGHF PPTIQLLCLV SGYTPGTIQI TWLED  
GQVMD VDLSTASTTQ EGELASTQSE LTLSQK  
HWLS DRTYTCQVTY QGHTFEDSGK KCA (配列  
番号52)

10

成熟M13.C06 IgG1重鎖(mp3bヘテロ二量体化、pMP404)のアミノ酸配列(CH3ドメインを太字で示している)

【化41】

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS I  
YRMQWVRQA PGKGLEWVSG ISPSGGTTWY AD  
SVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAV  
YYCARWS GGS GYA FDIW GQGTMVTVSS ASTK  
GPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPE  
PVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLS  
SVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKK  
VEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPP  
KP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFN  
W YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT  
VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS K  
AKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LV  
SGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDS  
DGSFKLY SKLTVDKSRW **QQGNVFSCSV** MHEA  
LHNHYT **QKSLSLS**PG (配列番号53)

20

30

成熟M13.C06 カッパ軽鎖(pMP407)のアミノ酸配列

【化42-1】

DIQMTQSPLS LSASVGDRTV ITCQASRDIR N  
YLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLQTGVPS RF  
GGSGSGTD FSFTIGSLQP EDEATYYCQQ FDS  
LPHTFGQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQ  
LKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQ

40

【化42-2】

SGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADY  
EKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC  
(配列番号54)

【0130】

異なる軽鎖の対合を制御するために、抗EGFR FabをEfabとして構築した(図7)。リジン再配置突然変異を有する対照抗体を組み立てて、軽鎖対合解決策を欠くI

50

g G 1 重鎖ヘテロ二量体を作製した。

【 0 1 3 1 】

抗体を再び C H O - S 細胞で一過的なトランスフェクションによって発現させ、上清を採取し、8日間培養した後に浄化した。S D S - P A G E による分離は、完全な I g G の大きさで移動するバンドと、半抗体に対応するさらなるバンドを示した (図 8 A )。質量分析は、これらの実験において重鎖 B による半抗体が再び形成されたことを実証した。重要なことに、E - F a b では軽鎖誤対合は L C - M S によって検出されなかった。I g G 1 ヘテロ二量体は、重鎖とそれらの軽鎖との正しい対合をいくらか示したが、2本の抗 E G F R 軽鎖を有する重鎖ヘテロ二量体の強いピークも検出できた (図 8 B )。これらの結果は、E - F a b が軽鎖対合問題を解決するというのを再び裏付けている。

10

【 0 1 3 2 】

重要なことに、質量分析プロファイルにおいて重鎖同士のコモ二量体は検出できず、リジン再配置による重鎖ヘテロ二量体化は E - F a b と組み合わせられた場合に非常に効率的であることが実証された (図 8 B )。但し、質量分析からは、I g G 1 対照には存在しないが E f a b 二特異体には存在している低レベルの O - グリカンも明らかになった。

【 0 1 3 3 】

次に、可溶性 H i s タグ付 E G F R (図 8 C ) 及び I G F - 1 R (図 8 D ) による O c t e t 結合性実験において粗上清を使用した。二特異性 E 体及び I g G 1 対照は、E G F R と I G F - 1 R と結合したが、結合性は E 体と対照とでいくぶん異なっているようであった。但し、これらの結果の解釈は、これらの粗試料において異なっている発現、半抗体の量及び軽鎖誤対合ゆえに、複雑である。

20

【 0 1 3 4 】

総じて、結合性データと合わせて質量分析による分析は、E 体が非対称 I g G へと正しく会合したことを実証している。これは、C H O 細胞における4つの異なる鎖 (2つの H C 及び2つの L C ) の発現によって単純に成し遂げられる。E - F a b は軽鎖対合を完全に解決し、リジン再配置はこれらの実験において重鎖ヘテロ二量体化を厳密に強化した。

【 0 1 3 5 】

実施例 5 : 二特異性基幹のさらなる試験

E f a b 及び F c ヘテロ二量体化を用いて二特異性基をさらに試験するために、別の I g G 様二特異性抗体を、種々のがんの治療のために認可されているトラスツズマブとセツキシマブとの2つの治療抗体から作製した。二特異体を作製するために、軽鎖対合解決策 E f a b を用いて抗 H E R 抗体であるトラスツズマブをクローニングし、次に m p 4 重鎖ヘテロ二量体化突然変異 ( S 3 6 4 K / K 4 0 9 S 及び K 3 7 0 S / V 3 9 7 I / F 4 0 5 K ) を用いて抗 E G F R 抗体であるセツキシマブと組み合わせた。その後、抗体の2本の重鎖及び2本の軽鎖をコードする4つのプラスミド ( p M P 5 2 1、p M P 5 2 6、p M P 5 2 8 及び p M P 5 3 0 ) を C H O - S 細胞において一過的なトランスフェクションによって共発現させ、結果として生じた二特異性抗体をプロテイン A で精製した。この抗体は次に、可溶タイプの H E R 2 と E G F R との2つの抗原を使用する O c t e t 結合性試験において使用した (図 9 A 及び図 9 B を参照されたい)。図 9 A 及び図 9 B に示されているように、二特異性抗体はその両方の抗原に同時に結合することができる。

30

40

p M P 5 3 0 トラスツズマブ E f a b I g G 1 m p 4 a

## 【化 4 3】

```

1      EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFN
IK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
51     IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNT
AY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG
101    GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS ASTKGPTV
KI LQSI CDGGGH FPPTIQLLCL
151    VSGYTPGTIQ ITWLEDGQVM DVDLSTAS
TT QEGELASTQS ELTLSQKHWL
201    SDRTYTCQVT YQGHTFEDST KKCASDKT
HT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251    KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEV
KF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301    YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKV
SN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
351    PQVYTLPPSR DELTKNQVKL TCLVKGFY
PS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
401    PVLDS DGSFF LYSLLTVDKS RWQQGNVF
SC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
451    G (配列番号 79)

```

10

20

pMP528 トラスツズマブ Efab 軽鎖

## 【化 4 4】

```

1      DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQD
VN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
51     ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSL
QP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ
101    GTKVEIKRTV AAPT VKILQS SCDGGGGHF
PP TIQLLCLVSG YTPGTIQITW
151    LEDGQVMDVD LSTASTTQEG ELASTQSE
LT LSQKHWLSDR TYTCQVTYQG
201    HTFEDSGKKC A (配列番号 80)

```

30

pMP521 セツキシマブ IgG1 mp4b

## 【化 4 5】

```

1      DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQS
IG TNIHWYQQRT NGSPRLLIKY
51     ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSV
ES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA
101    GTKLELKRIV AAPSVFIFPP SDEQLKSG
TA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
151    DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSST
LT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201    LSSPVTKSFN RGEC (配列番号 81)

```

40

pMP526 セツキシマブ カッパ

50

## 【化 4 6】

```

1      QVQLKQSGPG  LVQPSQSLSI  TCTVSGFSS
LT  NYGVHWVRQS  PGKGLEWLGV
51     IWSGGNTDYN  TPFTSRLSIN  KDNSKSKQV
FF  KMNSLQSDNT  AIYYCARALT
101    YYDYEFAFWG  QGTLVTVSAA  STKGPSVF
PL  APSSKSTSGG  TAALGCLVKD
151    YFPEPVTVSW  NSGALTSGVH  TFP AVLQS
SG  LYSLS SVVTV  PSSSLGTQTY
201    ICNVNHKPSN  TKVDKKVEPK  SCDKTHTC
PP  CPAPELLGGP  SVFLFPKPK
251    DTLMISRTP  E  VTCVVVDVSH  EDPEVKFN
WY  VDGVEVHNAK  TKPREEQYNS
301    TYRVVSVLTV  LHQDWLNGKE  YKCKVSNK
AL  PAPIEKTISK  AKGQPREPQV
351    YTLPPSRDEL  TKNQVSLTCL  VSGFYPSD
IA  VEWESNGQPE  NNYKTTPPIL
401    DSDGSFKLYS  KLTVDKSRWQ  QGNVFSCS
VM  HEALHNHYTQ  KSLSLSPG  (配列番号82)

```

10

20

## 【0136】

## 実施例6：軽鎖対合解決策のさらなる試験

E f a bの構築をさらに最適化するために、I g Eの可変ドメインとC H 2ドメインとの間のリンカーをさらに調査した。先の実施例ではヒトカッパ及びC H 1ドメインに由来するエルボー領域を可変ドメインとI g E C H 2との間のリンカーとして使用した。しかしながら、その他のリンカー配列は潜在的に形状を変化させるかまたは異なる度合いの柔軟性を提供する可能性があり、よって鎖の正しい会合またはE f a bと抗原との結合性に影響を与える可能性がある。これを試験するために、抗H E R 2抗体であるトラスツズマブをE f a bとして操作し、軽鎖内に様々なエルボー配列を含めた。使用したリンカーは、ラムダ軽鎖もしくはヒトI g E C H 2ドメインに由来するもの、または様々な長さのG l y - S e rリンカーであった(図10)。E f a bはC H O細胞において一過的なトランスフェクションにより(図9に示すように)セツキシマブとの非対称I g Gとして発現した。興味深いことに、様々なエルボーリンカー配列は、トラスツズマブがH E R 2と結合する能力にほとんど影響を与えず、どの構築物も野生型トラスツズマブF a bと比べて同程度の結合性を示した。

30

## 【0137】

I g Mクラスの抗体はI g Eと類似したC H 2ドメインを有し、それはヒンジ領域の代わりにジスルフィド架橋によって2本の重鎖を対合させる役割を果たす。それゆえ、I g M C H 2ドメインを使用することでI g E C H 2ドメインと同じく良好に軽鎖対合が解決されるか否かを試験した。これを試験するために、片方のF a bをH S Aと融合させかつもう片方のF a bをG F Pと融合させた状態で2つのF a b(M 6 0及びC 0 6)を図6 Aに示されているように再び共発現させた。但し、この場合は、片方のF a bのカッパ及びC H 1定常ドメインをI g M C H 2ドメインで置き換え、結果として生じる分子をM - F a bと命名した(図10 C)。S D S - P A G Eによる鎖対合の分析は、対照において顕著に認められたM 6 0とC 0 6との間での軽鎖誤対合をM - F a bが解決したことを示した(図10 C)。このように、M - F a bは、軽鎖対合問題を解決する上でE f a bと同様に効率的に機能すると見受けられた。

40

## 【0138】

50

次に、M - F a b が抗原と結合する能力を、様々なエルボー領域を軽鎖に有している E f a b と比較した。これらの E f a b 及び M - F a b は、抗 H E R 2 抗体トラスツズマブの可変ドメインを使用して再び構築した。M - F a b 構築物の重軽鎖の成熟ペプチド配列を以下に示す。

6 x H i s タグを有するトラスツズマブ M - f a b 重鎖 ( p M P 6 2 3 ) のアミノ酸配列 (エルボー領域を太字で示し、I g M C H 2 ドメインには下線を引き、6 x H i s をイタリック体で示す)

【化 4 7】

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D  
T Y I H W V R Q A P G K G L E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D  
S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V  
Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K  
G P K V S V F V P P R D G F F G N P R K S K L I C Q A T G F S  
P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S G V T T D Q V Q A E A K E S  
G P T T Y K V T S T L T I K E S D W L G Q S M F T C R V D H R  
G L T F Q Q Q A S S M C *H H H H H* (配列番号 7 5)

10

トラスツズマブ M - f a b 軽鎖 ( p M P 5 9 6 ) のアミノ酸配列 (エルボー領域を太字で示し、I g M C H 2 ドメインには下線を引いてある)

20

【化 4 8 - 1】

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T  
A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F  
S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T  
T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P K V S V F V P P R D G

【化 4 8 - 2】

F F G N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K  
Q V G S G V T T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I  
K E S D W L G Q S M F T C R V D H R G L T F Q Q Q A S S M C  
(配列番号 7 6)

30

【0 1 3 9】

E f a b 及び M - F a b を C H O - S において ( F c のない ) F a b として発現させ、上清を O c t e t による H E R 2 との結合性の試験に使用した。この結合アッセイにおいて M f a b 及び様々な E f a b 構築物は非常に似通った結合性を示した (図 1 0 D)。

【0 1 4 0】

総じてこれらの結果は、I g M C H 2 ドメインを F a b ( M - f a b ) の定常ドメインとして使用することによって軽鎖対合問題が解決されかつ F a b の結合特性が維持されることを示している。したがって、M - F a b はもう 1 つの有用な軽鎖対合解決策である。

40

【0 1 4 1】

実施例 7：重軽鎖対合技術のさらなる用途

次に、重軽鎖対合解決策を、他の様々な二特異性構成及び一価特異性構成との関連においてさらに試験して、これらの技術がどのくらい多目的かつ機能的であるかを探究した。

【0 1 4 2】

第 1 に、F c ヘテロ二量体化突然変異を他の F c 領域の C H 3 ドメインに導入し、結合性試験においてそのような二特異性抗体の機能性を試験した。この目的のために、A s n

50

297においてN結合型グリコシル化を欠いておりそのためにエフェクター機能がグリコシル化IgG1と比べて低下しているIgG1 agly T299A足場の中に、mp3ヘテロ二量体突然変異(S364K/K409S及びK370S/F405K)をクローニングした。抗EGFR抗体M60-A02のFabと、抗IGF-1R抗体M13.C06の通常のFabとを有する非対称IgGの形態でこのFc領域を有する二特異性抗体を、CHO細胞における一過的なトランスフェクションによって作った(図11A)。結果として生じた二特異性抗体は、サンドイッチ構成型Octet結合性アッセイにおいて両リガンドに対する堅牢な同時結合性を示し(図11B)、共発現させた4本の鎖(プラスミドpMP463、pMP402、pMP405、pMP407)から二特異性抗体が効率的に形成されたことを実証した。したがって、リジン再配置によるFcヘテロ二量体化方策はFcグリコシル化とは無関係に機能すると見受けられる。

10

pMP402 M60 Fab IgG1 agly T299A mp3a S364K/K409S

【化49-1】

```

1      EVQLLES GGG LVQP GGS LRL SCAAS GFT
FS    DYIMHWVRQA PGK GLEWVSV
51     ISSSGGDTSY ADS VKGRFTI SRD NSKNT
LY    LQMNS LRAED TAVYYCAKVL
101    AGYFDWLPFD YWGQG GTLVTV SSASTKGP

```

20

【化49-2】

```

TV    KILQSI CDGG GHFPPTIQLL
151   CLVSGYTPGT IQITWLEDGQ VMDVDLST
AS    TTQEGELAST QSELTLSQKH
201   WLSDR TYTCQ VTYQGHTFED STKKCASD
KT    H TCPPCPAPE LLGGPSVFLF
251   PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDP
EV    KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
301   EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKC
KV    SNKALPAPIE KTISKAKGQP
351   REPQVYTLPP SRDELTKNQV KLTCLVKG
FY    PSDIAVEWES NGQPENNYKT
401   TPPVLDS DGS FFLYSSLTVD KSRWQQGN
VF    SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
451   SPG          (配列番号83)

```

30

pMP405 C06 IgG1 agly T299A mp3b K370S/F405K

40

## 【化 5 0】

```

1      EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT
FS    IYRMQWVRQA PGKGLEWVSG
51    ISPSGGTTWY ADSVKGRFTI SRDNSKNT
LY    LQMNSLRAED TAVYYCARWS
101   GGSGYAFDIW GQGTMVTVSS ASTKGPSV
FP    LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
151   DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQ
SS    GLYSLSVVVT VPSSSLGTQT
201   YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHT
CP    PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
251   KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKF
NW    YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
301   SAYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSN
KA    LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
351   VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVSGFYPS
DI    AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
401   LDSDGSFKLY SKLTVDKSRW QQGNVFSC
SV    MHEALHNHYT QKSLSLSPG
(配列番号 84)

```

10

20

## 【0143】

第2に、別のFc構成における重鎖ヘテロ二量体化を試験するために、非グリコシル化IgG4 CH2ドメインの最小のエフェクター機能とIgG1 CH3ドメインの安定性とを組み合わせたものであるIgG4P/IgG1 agly(N297Q)ハイブリッド定常ドメインの中に、mp4ヘテロ二量体突然変異(S364K/K409L及びK370S/V397I/F405K)をクローニングした(図12)。このFcもヒンジ安定化突然変異S228Pを含有する。こうして、このハイブリッドIgG4P/IgG1定常ドメインと、抗HER2抗体ペルツズマブの可変ドメインと、抗IGF-1R抗体C06とを有する二特異性抗体が作製された。可変ドメインは両方の配向で、それぞれEfabとしての鎖A上または通常のFabとしての鎖B上で使用した。抗体をCHO細胞において再び生成し、プロテインA精製材料をOctet結合性試験において使用した(図12)。興味深いことに、精製された二特異性抗体は、IGF1Rを最初に装填してその後抗体及びHER2を装填した場合にのみ両抗原との同時結合性を示したが(図12C)、逆の順序で試験した場合にはそれが示されず、それは可溶性抗原上のタグの位置が異なることに起因している可能性がある。

30

## 【0144】

第3に、二特異性技術をMab-Fabとの関連において検討した。二特異性抗体を構築する別の方法がMab-Fabであり、それは、重鎖のC末端に融合したFabを有しているIgGを含有する(図13A)。この構成は、2本の同一の重鎖を有する対象分子と類似しており、Fcヘテロ二量体技術を不要にする。しかしながら、各々特有の軽鎖を含有している2つの異なるFabには軽鎖対合解決策が必要である。これとの関連においてEfabが正しい軽鎖会合を促進するように機能するか否かを試験するために、C末端に融合した抗IGF-1R抗体C06のEfabを有している、IgG1としてのトラストズマブを使用して、Mab-Fabを構築した(図13)。さらに、C末端に融合したトラストズマブのEfabを有している、IgG1としてのC06の逆構築物も作製した。どちらの場合においても、単一のG4S(配列番号56)リンカーを使用してEfabの重鎖のN末端においてEfabをIgG重鎖のC末端に繋げた。Mab-Fabを、ま

40

50



たしてもCHOー過性発現体において3つのプラスミド(1本の重鎖と2本の軽鎖、pMP759/pMP519/pMP511またはpMP760/pMP528/pMP407)の共発現によって生じさせ、プロテインAで精製した。精製した材料のSDS-PAGEによる分析は、Mab-Fabの3本の鎖が250kDaのタンパク質へと正しく会合したことを示した(図13B)。二特異性抗体はさらに、サンドイッチOctet結合性アッセイにおいてある程度の同時結合性を示した(図13C)。しかしながら、この同時結合性は、EfabがC06であるかトラスツズマブであるかにかかわらず、Efabを最初に結合させた場合にのみ認められ、この構成において何らかの形態の立体障害が両抗原との同時結合性に影響を与えている可能性があることを示唆していた。

pMP759 トラスツズマブ IgG1-C06 EFab

10

【化51-1】

```

1      EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFN
IK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
51     IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNT
AY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG
101    GDGFYAMDYW GQGTLLVTVSS ASTKGPSV
FP LAPSSKSTSG GTAAALGCLVK

```

【化51-2】

20

```

151    DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQ
SS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
201    YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHT
CP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
251    KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKF
NW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
301    STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSN
KA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
351    VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPS
DI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV
401    LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSC
SV MHEALHNHYT QKSLSLSPGS
451    GGGGSEVQLL ESGGGLVQPG GSLRLSCA
AS GFTFSIYRMQ WVRQAPGKGL
501    EWVSGISPSG GTTWYADSVK GRFTISRDN
NS KNTLYLQMNS LRAEDTAVYY
551    CARWSGGSGY AFDIWGQGTMT VTVSSAST
KG PTVKILQSIC DGGGHFPPTI
601    QLLCLVSGYT PGTIQITWLE DGQVMDVD
LS TASTTQEGEL ASTQSELTLS
651    QKHWLSDRTY TCQVTYQGHT FEDSTKKC
A (配列番号85)

```

30

40

pMP511 C06 Efab 軽鎖

## 【化52】

1        D I Q M T Q S P L S    L S A S V G D R V T    I T C Q A S R D  
 I R    N Y L N W Y Q Q K P    G K A P K L L I Y D  
 5 1     A S S L Q T G V P S    R F G G S G S G T D    F S F T I G S L  
 Q P    E D E A T Y Y C Q Q    F D S L P H T F G Q  
 1 0 1   G T K L E I K R T V    A A P T V K I L Q S    S C D G G G H F  
 P P    T I Q L L C L V S G    Y T P G T I Q I T W  
 1 5 1   L E D G Q V M D V D    L S T A S T T Q E G    E L A S T Q S E  
 L T    L S Q K H W L S D R    T Y T C Q V T Y Q G  
 2 0 1   H T F E D S G K K C    A    (配列番号86)

10

p M P 5 1 9    トラスツズマブ    カッパ軽鎖

## 【化53-1】

1        D I Q M T Q S P S S    L S A S V G D R V T    I T C R A S Q D  
 V N    T A V A W Y Q Q K P    G K A P K L L I Y S  
 5 1     A S F L Y S G V P S    R F S G S R S G T D    F T L T I S S L  
 Q P    E D F A T Y Y C Q Q    H Y T T P P T F G Q  
 1 0 1   G T K V E I K R T V    A A P S V F I F P P    S D E Q L K S G  
 T A    S V V C L L N N F Y    P R E A K V Q W K V  
 1 5 1   D N A L Q S G N S Q    E S V T E Q D S K D    S T Y S L S S T

20

## 【化53-2】

L T    L S K A D Y E K H K    V Y A C E V T H Q G  
 2 0 1   L S S P V T K S F N    R G E C    (配列番号87)

p M P 7 6 0    C 0 6 - I g G 1 - トラスツズマブ    E f a b

30

40

50

## 【化 5 4】

```

1      EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFT
FS    IYRMQWVRQA PGKGLEWVSG
51     ISPSGGTTWY ADSVKGRFTI SRDNSKNT
LY    LQMNSLRAED TAVYYCARWS
101    GGS GYAFDIW GQGTMVTVSS ASTKGPSV
FP    LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
151    DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQ
SS    GLYSLSLVVT VPSSSLGTQT
201    YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHT
CP    PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
251    KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKF
NW    YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
301    STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSN
KA    LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
351    VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPS
DI    AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
401    LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSC
SV    MHEALHNHYT QKSLSLSPGS
451    GGGGSEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCA
AS    GFNIKDTYIH WVRQAPGKGL
501    EWVARIYPTN GYTRYADSVK GRFTISAD
TS    KNTAYLQMNS LRAEDTAVYY
551    CSRWGGDGFY AMDYWGGGTL VTVSSAST
KG    PTVKILQSIC DGGGHFPPTI
601    QLLCLVSGYT PGTIQITWLE DGQVMDVD
LS    TASTTQEGEL ASTQSELTLS
651    QKHWLSDRTY TCQVTYQGHT FEDSTKKC
A      (配列番号88)

```

10

20

30

## 【0145】

第4に、Fcヘテロ二量体化技術は、二特異体の作製における様々な用途に加えて、単一特異性一価抗体を作製するために利用することもできる。図3に示すような半抗体と遊離Fcとのヘテロ二量体はそのような単一特異性一価抗体の一例である。別の例は、FcにLCを直接融合して後にそれを適合する重鎖と共発現させるものである(図14A)。この構成では軽鎖または重鎖のホモ二量体の形成を防止するためにFcヘテロ二量体化方策が必要とされる。mp4 Fcヘテロ二量体がこの種の一価単一特異性抗体の構築にも適しているか否かを試験するために、抗EGFR抗体M60-A02の可変ドメインを使用してLC-Fc融合構築物を作製した。このプラスミド(pMP533)を、対応するFcヘテロ二量体突然変異を含有するM60-A02の重鎖(プラスミドpMP254)と共にCHO細胞において発現させることによって、単一のタンパク質種が生成した(図14B)。このタンパク質をOctet結合性試験において分析したところ、一価結合性の特徴が示された。(図14C)。全体として、このデータは、リジン再配置によるFcヘテロ二量体化が、一価単一特異性抗体を作製する多目的かつ有効な方法であるらしいということを示している。

40

## 【0146】

最後に、IgGのFc部分を欠く二特異性抗体におけるEfa b軽鎖対合解決策の使用

50

についても試験した。そのような二特異体は例えば、2つのF a bとペプチドリンカーとの直接的融合によって作製することができる(図15A、右図)。あるいは、2つのF a bを繋げるペプチドは異種タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(H S A)であってもよい(図15A、左図)。どちらの場合であっても、二特異体が機能するには2つのF a bの重鎖鎖の対合が正しいことが必要である。それゆえ、E f a b軽鎖対合解決策は、二特異性分子への2つのF a bのそのような融合を可能にし得る。これを試験するために、M 6 0 - A 0 2抗体及びM 1 3 . C 0 6抗体を再び使用し、2つのF a bを両方の配向で使用して二特異体を作製した。これらの二特異体をC H O細胞において発現させた場合、それは単一のタンパク質を生成し、抗体鎖が正しく会合したことを再び示唆した(図15B)。O c t e t結合性試験において抗体を試験した場合、同時結合性がまたしても1つの特定の配向でのみ認められた(図15C)。それでもなお、本データは、通常のI g GのF cを欠く様々な構成で2つのF a bから二特異体を効率的に作製するためにE f a b軽鎖対合解決策を採用できることを示している。

10

#### 【0147】

##### 他の実施形態

本発明をその詳細な説明と併せて記載してきたが、上記記載は例示を意図するものであり、添付の特許請求の範囲によって定義付けられる本発明の範囲の限定を意図するものではない。他の態様、利点及び改変は、別記の請求項の範囲内である。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

##### (項目1)

20

第1重鎖可変ドメイン(第1V H)と第1軽鎖可変ドメイン(第1V L)とを含んでいる、抗体またはその抗原結合性断片であって、前記第1V Hと前記第1V Lとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成しており、前記第1V Hが、ヒト免疫グロブリンE(I g E)のC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第1V Lが、ヒトI g EのC H 2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(i i)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第1ポリペプチドと前記第2ポリペプチドとが対合して二量体を形成している、前記抗体またはその抗原結合性断片。

30

##### (項目2)

前記第1ポリペプチドがF cドメインに直接繋がられている、項目1に記載の抗体。

##### (項目3)

前記第2ポリペプチドがF cドメインに直接繋がられている、項目1に記載の抗体。

##### (項目4)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む、項目1~3のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

##### (項目5)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目1~3のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

##### (項目6)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107を含む、項目1~3のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

##### (項目7)

前記第1ポリペプチドが、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目1~6のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

50

( 項目 8 )

前記第 1 ポリペプチドが、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む、項目 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

( 項目 9 )

前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

( 項目 10 )

前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む、項目 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

( 項目 11 )

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 9 ～ 107 に示すアミノ酸配列とは 12 個以下のアミノ酸残基が異なっている、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

( 項目 12 )

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号 1 の 2 つのシステイン残基のうちの少なくとも 1 つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

( 項目 13 )

20

( i ) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか；または

( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 1 ～ 3、項目 5、項目 11 または項目 12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

( 項目 14 )

前記抗体またはその抗原結合性断片が、第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) と第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2 V L ) とを含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、項目 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

( 項目 15 )

前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、項目 14 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

( 項目 16 )

第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) と第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) とを含んでいて、抗体またはその抗原結合性断片であって、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 112 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 112 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋

50

げられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成している、前記抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 17)

前記第 1 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋がられている、項目 16 に記載の抗体。

(項目 18)

前記第 2 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋がられている、項目 16 に記載の抗体。

(項目 19)

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、項目 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 20)

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 21)

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 112 を含む、項目 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 22)

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 112 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 12 個のアミノ酸残基が異なっている、項目 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 23)

(i) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか; または

(ii) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 16 ~ 18、項目 20 または項目 22 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 24)

前記抗体またはその抗原結合性断片が、第 2 重鎖可変ドメイン (第 2 V H) と第 2 軽鎖可変ドメイン (第 2 V L) とを含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、項目 16 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 25)

前記第 2 V H が C H 1 ドメインに (i) 直接繋がられているかまたは (ii) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに (i) 直接繋がられているかまたは (ii) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合性断片

(項目 26)

二特異性抗体であって、

(i) 第 1 重鎖可変ドメイン (第 1 V H) と第 1 軽鎖可変ドメイン (第 1 V L) とを含んでいる第 1 抗原結合性断片 (第 1 F a b) を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E (I g E) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸 9 ~ 107 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに (i) 直接繋がられているかまたは (ii) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、

10

20

30

40

50

ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 1）のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり；さらに、（ i i ）第 2 V H と第 2 V L とを含んでいる第 2 F a b を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに（ i ）直接繋がられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、

前記第 1 F a b 及び前記第 2 F a b が、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合するものであり、

10

前記第 1 F a b が前記第 2 F a b に連結されている、前記二特異性抗体。

（項目 2 7）

前記第 1 F a b がリンカーによって前記第 2 F a b に連結されている、項目 2 6 に記載の二特異性抗体。

（項目 2 8）

前記第 1 F a b が異種ポリペプチドによって前記第 2 F a b に連結されている、項目 2 6 に記載の二特異性抗体。

（項目 2 9）

前記異種ポリペプチドがヒト血清アルブミンである、項目 2 8 に記載の二特異性抗体。

（項目 3 0）

20

前記異種ポリペプチドが X T E N である、項目 2 8 に記載の二特異性抗体。

（項目 3 1）

前記第 1 F a b がポリエチレングリコール（ P E G ）によって前記第 2 F a b に連結されている、項目 2 6 に記載の二特異性抗体。

（項目 3 2）

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが各々、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

（項目 3 3）

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

30

（項目 3 4）

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 を含む、項目 2 6 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

（項目 3 5）

前記第 1 ポリペプチドが、配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

（項目 3 6）

前記第 1 ポリペプチドが、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

40

（項目 3 7）

前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 6 に示すアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

（項目 3 8）

前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含む、項目 2 6 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

（項目 3 9）

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 に示すアミノ酸配列とは 1 2 個以下のアミノ酸残基が異なっている、項目 2 6 ～

50

3 1 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 0 )

前記第 1 ポリペプチド及び/または前記第 2 ポリペプチドが、鎖間ジスルフィド結合を形成することができる配列番号 1 の 2 つのシステイン残基のうちの少なくとも 1 つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している、項目 2 6 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 1 )

( i ) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか；または

( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び/もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 2 6 ~ 3 1、項目 3 3、項目 3 9 または項目 4 0 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 2 )

二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) と第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) とを含んでいる第 1 抗原結合性断片 ( 第 1 F a b ) を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり；さらに、

( i i ) 第 2 V H と第 2 V L とを含んでいる第 2 F a b を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、

前記第 1 F a b 及び前記第 2 F a b が、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエпитープに特異的に結合するものであり、

前記第 1 F a b が前記第 2 F a b に連結されている、前記二特異性抗体。

( 項目 4 3 )

前記第 1 F a b がリンカーによって前記第 2 F a b に連結されている、項目 4 2 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 4 )

前記リンカーがペプチドリinkerである、項目 4 3 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 5 )

前記第 1 F a b が異種ポリペプチドによって前記第 2 F a b に連結されている、項目 4 2 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 6 )

前記異種ポリペプチドがヒト血清アルブミンである、項目 4 5 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 7 )

前記異種ポリペプチドが X T E N である、項目 4 5 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 8 )

前記第 1 F a b がポリエチレングリコール ( P E G ) によって前記第 2 F a b に連結さ

10

20

30

40

50



れている、項目 4 2 に記載の二特異性抗体。

( 項目 4 9 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが各々、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、項目 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 5 0 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 5 1 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 を含む、項目 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

10

( 項目 5 2 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている、項目 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 5 3 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、鎖間ジスルフィド結合を形成することができる配列番号 2 のシステイン残基においてシステイン以外のアミノ酸を含有している、項目 4 2 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

20

( 項目 5 4 )

( i ) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び／もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか；または

( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び／もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 4 2 ～ 4 8、項目 5 0、項目 5 2 または項目 5 3 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

30

( 項目 5 5 )

四価二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する全 I g G 抗体を含み、前記全 I g G 抗体が第 1 C H 3 ドメイン及び第 2 C H 3 ドメインを含むものであり；さらに、

( i i ) 第 1 F a b 及び第 2 F a b を含み、

前記第 1 F a b が第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) 及び第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) を含むものであり、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、

前記第 2 F a b が第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) 及び第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2 V L ) を含むものであり、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 F a b と同じエピトープに特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており；

40

前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V H が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ～ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一である

50

アミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第2V<sub>L</sub>が、ヒトIgEのC<sub>H</sub>2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9~107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり；

前記第1F<sub>a</sub>bが前記全IgG抗体の前記第1C<sub>H</sub>3ドメインのC末端に連結されており、前記第2F<sub>a</sub>bが前記全IgG抗体の前記第2C<sub>H</sub>3ドメインのC末端に連結されている、前記四価二特異性抗体。

(項目56)

前記第1F<sub>a</sub>bが第1リンカーによって前記全抗体の前記第1C<sub>H</sub>3ドメインのC末端に連結されており、前記第2F<sub>a</sub>bが第2リンカーによって前記全抗体の前記第2C<sub>H</sub>3ドメインのC末端に連結されている、項目55に記載の四価抗体。

10

(項目57)

前記第1及び第2リンカーがペプチドリinkerである、項目56に記載の四価抗体。

(項目58)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む、項目55~57のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目59)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目55~57のいずれか1項に記載の四価抗体。

20

(項目60)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9~107を含む、項目55~57のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目61)

前記第1ポリペプチド及び前記第3ポリペプチドが各々、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目55~60のいずれか1項に記載の四価抗体。

30

(項目62)

前記第1ポリペプチド及び前記第3ポリペプチドが各々、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む、項目55~60のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目63)

前記第2ポリペプチド及び前記第4ポリペプチドが各々、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目55~62のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目64)

前記第2ポリペプチド及び前記第4ポリペプチドが各々、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む、項目55~62のいずれか1項に記載の四価抗体。

40

(項目65)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸9~107に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている、項目55~57のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目66)

四価二特異性抗体であって、

(i)第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する全IgG抗体を含み、前記全IgG抗体が第1C<sub>H</sub>3ドメイン及び第2C<sub>H</sub>3ドメインを含むものであり；さらに、

50

( i i ) 第 1 F a b 及び第 2 F a b を含み、

前記第 1 F a b が第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) 及び第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) を含むものであり、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、

前記第 2 F a b が第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) 及び第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2 V L ) を含むものであり、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 F a b と同じエピトープに特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており；

前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V H が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 3 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 4 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり；

前記第 1 F a b が前記全 I g G 抗体の前記第 1 C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、前記第 2 F a b が前記全 I g G 抗体の前記第 2 C H 3 ドメインの C 末端に連結されている、前記四価二特異性抗体。

( 項目 6 7 )

前記第 1 F a b が第 1 リンカーによって前記全抗体の前記第 1 C H 3 ドメインの C 末端に連結されており、前記第 2 F a b が第 2 リンカーによって前記全抗体の前記第 2 C H 3 ドメインの C 末端に連結されている、項目 6 6 に記載の四価抗体。

( 項目 6 8 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが各々、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、項目 6 5 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 6 9 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 6 6 または項目 6 7 に記載の四価抗体。

( 項目 7 0 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 を含む、項目 6 6 または項目 6 7 に記載の四価抗体。

( 項目 7 1 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている、項目 6 6 または項目 6 7 に記載の四価抗体。

( 項目 7 2 )

四価二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 F a b 及び第 2 F a b を含み、

前記第 1 F a b が第 1 重鎖可変ドメイン ( 第 1 V H ) 及び第 1 軽鎖可変ドメイン ( 第 1 V L ) を含むものであり、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、

前記第 2 F a b が第 2 重鎖可変ドメイン ( 第 2 V H ) 及び第 2 軽鎖可変ドメイン ( 第 2

10

20

30

40

50

VL)を含むものであり、前記第2 VHと前記第2 VLとが対合して、前記第1抗原の前記第1エピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成しており；さらに、

(ii) 第1 IgG CH2ドメイン及び第1 IgG CH3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2 IgG CH2ドメイン及び第2 IgG CH3ドメインを含んでいる第2重鎖と、第1軽鎖と、第2軽鎖とを含む、全抗体を含み、前記抗体が第3 VH及び第3 VLならびに第4 VH及び第4 VLを含むものであり、前記第3 VHと前記第3 VLとが対合して、第2抗原のエピトープに特異的に結合する第3可変領域を形成しており、前記第4 VHと前記第4 VLとが対合して、前記第2抗原の同じエピトープに特異的に結合する第4可変領域を形成しており、

前記第3 VHが、ヒト免疫グロブリンE (IgE) のCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第3 VLが、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第4 VHが、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第4 VLが、ヒトIgEのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸9～107と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第1ポリペプチドが前記第1 IgG CH2ドメインのN末端に連結されており、前記第3ポリペプチドが前記第2 IgG CH2ドメインのN末端に連結されており；

前記第1 Fabが前記第1 IgG CH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2 Fabが前記第2 IgG CH3ドメインのC末端に連結されている、前記四価二特異性抗体。

(項目73)

前記第1 Fabが第1リンカーによって前記第1 IgG CH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2 Fabが第2リンカーによって前記第2 IgG CH3ドメインのC末端に連結されている、項目72に記載の四価抗体。

(項目74)

前記第1及び第2リンカーがペプチドリinkerである、項目73に記載の四価抗体。

(項目75)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む、項目72～74のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目76)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9～107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目72～74のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目77)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9～107を含む、項目72～74のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目78)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第3ポリペプチドが、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目72～77のいずれか1項に記載の四価抗体。

10

20

30

40

50

(項目 79)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第3ポリペプチドが、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む、項目72～77のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目 80)

前記第2ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目72～79のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目 81)

前記第2ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む、項目72～79のいずれか1項に記載の四価抗体。

10

(項目 82)

前記第1ポリペプチド、前記第2ポリペプチド、前記第3ポリペプチド及び/または前記第4ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている、項目72～74のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目 83)

四価二特異性抗体であって、

(i) 第1Fab及び第2Fabを含み、

前記第1Fabが第1重鎖可変ドメイン(第1VH)及び第1軽鎖可変ドメイン(第1VL)を含むものであり、前記第1VHと前記第1VLとが対合して、第1抗原の第1エピトープに特異的に結合する第1可変領域を形成しており、

20

前記第2Fabが第2重鎖可変ドメイン(第2VH)及び第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)を含むものであり、前記第2VHと前記第2VLとが対合して、前記第1抗原の前記第1エピトープに特異的に結合する第2可変領域を形成しており；さらに、

(ii) 第1IgGCH2ドメイン及び第1IgGCH3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2IgGCH2ドメイン及び第2IgGCH3ドメインを含んでいる第2重鎖と、第1軽鎖と、第2軽鎖とを含む、全抗体を含み、前記抗体が第3VH及び第3VLならびに第4VH及び第4VLを含むものであり、前記第3VHと前記第3VLとが対合して、第2抗原のエピトープに特異的に結合する第3可変領域を形成しており、前記第4VHと前記第4VLとが対合して、前記第2抗原の同じエピトープに特異的に結合する第4可変領域を形成しており、

30

前記第3VHが、ヒト免疫グロブリンM(IgM)のCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第1ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第3VLが、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第2ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第4VHが、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第3ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第4VLが、ヒトIgMのCH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸7～112と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含んでいる第4ポリペプチドに(i)直接繋がられているかまたは(ii)リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第1ポリペプチドが前記第1IgGCH2ドメインのN末端に連結されており、前記第3ポリペプチドが前記第2IgGCH2ドメインのN末端に連結されており；

40

前記第1Fabが前記第1IgGCH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2Fabが前記第2IgGCH3ドメインのC末端に連結されている、前記四価二特異性抗体。

(項目 84)

前記第1Fabが第1リンカーによって前記第1IgGCH3ドメインのC末端に連結

50

されており、前記第 2 F a b が第 2 リンカーによって前記第 2 I g G C H 3 ドメインの C 末端に連結されている、項目 8 3 に記載の四価抗体。

( 項目 8 5 )

前記第 1 及び第 2 リンカーがペプチドリンカーである、項目 8 4 に記載の四価抗体。

( 項目 8 6 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、項目 8 3 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 8 7 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 8 3 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

10

( 項目 8 8 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 を含む、項目 8 3 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 8 9 )

前記第 1 ポリペプチド、前記第 2 ポリペプチド、前記第 3 ポリペプチド及び / または前記第 4 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている、項目 8 3 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

20

( 項目 9 0 )

ヘテロ二量体化モジュールであって、

( i ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がセリンであり ; さらに、

( i i ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンであり、

( i ) 及び ( i i ) においてアミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものであり、

30

前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインと前記第 2 I g G 1 C H 3 とが対合してヘテロ二量体を形成している、前記ヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 1 )

第 1 I g G 1 C H 2 ドメイン及び第 2 I g G 1 C H 2 ドメインをさらに含み、前記第 1 I g G 1 C H 2 ドメインが前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインが前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかである、項目 9 0 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 2 )

40

2 本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a b をさらに含み、前記 F a b の前記 2 本のポリペプチド鎖のうちの 1 本の C 末端が、第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋がられており、前記第 1 ヒンジ領域が前記第 1 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられている、項目 9 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 3 )

前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの C 末端と、前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 ヒンジ領域の N 末端とを繋げるリンカーをさらに含む、項目 9 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 4 )

第 2 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 F

50

a bをさらに含む、項目 9 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 5 )

V Hドメイン、C H 1ドメイン、V Lドメイン及びC Lドメインをさらに含み、( i ) 前記V HドメインのC末端がC H 1ドメインのN末端に繋がれており、前記C H 1ドメインのC末端が第 1 ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第 1 ヒンジ領域のC末端が、前記第 1 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がれた前記第 1 I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋がれており、( i i ) 前記V LドメインのC末端が前記C LドメインのN末端に繋がれており、前記C LドメインのC末端が第 2 ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第 2 ヒンジ領域のC末端が、前記第 2 I g G 1 C H 3ドメインに直接繋がれた前記第 2 I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋がれており、( i i i ) 前記V Hドメインと前記V Lドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している、項目 9 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

( 項目 9 6 )

第 1 V H及び第 1 V Lならびに第 2 V H及び第 2 V Lをさらに含み、前記第 1 V Hと前記第 1 V Lとが対合して、第 1 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 2 V Hと前記第 2 V Lとが対合して、前記第 1 抗原の別のエピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、項目 9 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 7 )

前記第 1 V Lのアミノ酸配列が前記第 2 V Lのアミノ酸配列と同一である、項目 9 6 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

20

( 項目 9 8 )

第 1 I g G 4 C H 2ドメイン及び第 2 I g G 4 C H 2ドメインをさらに含み、前記第 1 I g G 4 C H 2ドメインが前記第 1 I g G 1 C H 3ドメインのN末端に( i ) 直接繋がれているかまたは( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかであり、前記第 2 I g G 4 C H 2ドメインが、前記第 2 I g G 1 C H 3ドメインのN末端に( i ) 直接繋がれているかまたは( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかである、項目 9 0 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 9 9 )

2 本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a bをさらに含み、前記F a bの前記 2 本のポリペプチド鎖のうちの 1 本のC末端が、第 1 I g G 4 ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域が第 1 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がれている、項目 9 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

30

( 項目 1 0 0 )

前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域がS 2 2 8 P突然変異( E U付番 )を含む、項目 9 9 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 0 1 )

前記第 1 I g G 1 C H 3ドメインのC末端と、前記第 2 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がれた第 2 I g G 4 ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンカーをさらに含む、項目 9 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

40

( 項目 1 0 2 )

前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域がS 2 2 8 P突然変異( E U付番 )を含む、項目 1 0 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 0 3 )

第 2 I g G 4 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 4 C H 2ドメインのN末端に繋がれた第 2 F a bをさらに含む、項目 9 9 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 0 4 )

前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域がS 2 2 8 P突然変異( E U付番 )を含む、項目 1 0 3 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 0 5 )

50

V Hドメイン、C H 1ドメイン、V Lドメイン及びC Lドメインをさらに含み、( i ) 前記V HドメインのC末端が前記C H 1ドメインのN末端に繋がれており、前記C H 1ドメインのC末端が第1 I g G 4ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第1 I g G 4ヒンジ領域のC末端が、前記第1 I g G 1　C H 3ドメインに直接繋がられた前記第1 I g G 4　C H 2ドメインのN末端に繋がれており、( i i ) 前記V LドメインのC末端がC LドメインのN末端に繋がれており、前記C LドメインのC末端が第2 I g G 4ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第2 I g G 4ヒンジ領域のC末端が、前記第2 I g G 1　C H 3ドメインに直接繋がられた前記第2 I g G 4　C H 2ドメインのN末端に繋がれており、( i i i ) 前記V Hドメインと前記V Lドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している、項目98に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

( 項目106 )

　前記第1 I g G 4ヒンジ領域及び前記第2 I g G 4ヒンジ領域が各々、S 2 2 8 P突然変異( E U付番 )を含む、項目105に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目107 )

　第1 V H及び第1 V Lならびに第2 V H及び第2 V Lをさらに含み、前記第1 V Hと前記第1 V Lとが対合して、第1抗原に特異的に結合する第1可変領域を形成しており、前記第2 V Hと前記第2 V Lとが対合して、前記第1抗原の別のエピトープまたは第2抗原に特異的に結合する第2可変領域を形成している、項目98に記載のヘテロ二量体化モジュール。

20

( 項目108 )

　前記第1 V Lのアミノ酸配列が前記第2 V Lのアミノ酸配列と同一である、項目107に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目109 )

　ヘテロ二量体化モジュールであって、

　( i ) 配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第1 I g G 1　C H 3ドメインを含み、位置364及び370のアミノ酸がリジンであり、位置409のアミノ酸がロイシンであり；さらに、

　( i i ) 配列番号11に示す配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する第2 I g G 1　C H 3ドメインを含み、位置370のアミノ酸がセリンであり、位置397のアミノ酸がイソロイシンであり、位置405及び409のアミノ酸がリジンであり、

30

　( i ) 及び( i i ) においてアミノ酸位置がE U付番方式に基づくものであり、

　前記第1 I g G 1　C H 3ドメインと前記第2 I g G 1　C H 3とが対合してヘテロ二量体を形成している、前記ヘテロ二量体化モジュール。

( 項目110 )

　第1 I g G 1　C H 2ドメイン及び第2 I g G 1　C H 2ドメインをさらに含み、前記第1 I g G 1　C H 2ドメインが前記第1 I g G 1　C H 3ドメインのN末端に( i ) 直接繋がれているかまたは( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかであり、前記第2 I g G 1　C H 2ドメインが前記第2 I g G 1　C H 3ドメインのN末端に( i ) 直接繋がれているかまたは( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかである、項目109に記載のヘテロ二量体化モジュール。

40

( 項目111 )

　第1 I g G 1　C H 2ドメイン及び第2 I g G 1　C H 2ドメインをさらに含み、前記第1 I g G 1　C H 2ドメインが前記第1 I g G 1　C H 3ドメインのN末端に直接繋がれており、前記第2 I g G 1　C H 2ドメインが前記第2 I g G 1　C H 3ドメインのN末端に直接繋がれている、項目110に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目112 )

　2本のポリペプチド鎖を含んでいる第1 F a bをさらに含み、前記F a bの前記2本のポリペプチド鎖のうちの1本のC末端が、第1ヒンジ領域のN末端に繋がれており、前記第1ヒンジ領域が前記第1 I g G 1　C H 2ドメインのN末端に繋がれている、項目

50



1 1 0 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 3 )

前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの C 末端と、第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれた第 2 ヒンジ領域の N 末端とを繋げるリンカーをさらに含む、項目 1 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 4 )

第 2 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれた第 2 F a b をさらに含む、項目 1 1 2 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 5 )

V H ドメイン、C H 1 ドメイン、V L ドメイン及び C L ドメインをさらに含み、( i ) 前記 V H ドメインの C 末端が C H 1 ドメインの N 末端に繋がれており、前記 C H 1 ドメインの C 末端が第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋がれており、前記第 1 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がれた前記第 1 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれており、( i i ) 前記 V L ドメインの C 末端が前記 C L ドメインの N 末端に繋がれており、前記 C L ドメインの C 末端が前記第 2 ヒンジ領域の N 末端に繋がれており、前記第 2 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がれた前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれており、( i i i ) 前記 V H ドメインと前記 V L ドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している、項目 1 1 0 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 6 )

第 1 V H 及び第 1 V L ならびに第 2 V H 及び第 2 V L をさらに含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の別のエピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、項目 1 1 0 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 7 )

前記第 1 V L のアミノ酸配列が前記第 2 V L のアミノ酸配列と同一である、項目 1 1 6 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 8 )

第 1 I g G 4 C H 2 ドメイン及び第 2 I g G 4 C H 2 ドメインをさらに含み、前記第 1 I g G 4 C H 2 ドメインが前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がれているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかであり、前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインが前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインの N 末端に ( i ) 直接繋がれているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がれているかのどちらかである、項目 1 0 9 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 1 9 )

2 本のポリペプチド鎖を含んでいる第 1 F a b をさらに含み、前記 F a b の前記 2 本のポリペプチド鎖のうちの 1 本の C 末端が、第 1 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がれており、前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域が前記第 1 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられている、項目 1 1 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 0 )

前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域が S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む、項目 1 1 9 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 1 )

前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインの C 末端と、前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれた第 2 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端とを繋げるリンカーをさらに含む、項目 1 1 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 2 )

前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域が S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む、項目 1 2 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

20

30

40

50

( 項目 1 2 3 )

第 2 I g G 4 ヒンジ領域を介して前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がられた第 2 F a b をさらに含む、項目 1 1 9 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 4 )

前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域が S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む、項目 1 2 3 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 5 )

V H ドメイン、C H 1 ドメイン、V L ドメイン及び C L ドメインをさらに含み、( i ) 前記 V H ドメインの C 末端が前記 C H 1 ドメインの N 末端に繋がれており、前記 C H 1 ドメインの C 末端が第 1 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がれており、前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた前記第 1 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれており、( i i ) 前記 V L ドメインの C 末端が前記 C L ドメインの N 末端に繋がれており、前記 C L ドメインの C 末端が第 2 I g G 4 ヒンジ領域の N 末端に繋がれており、前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域の C 末端が、前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインに直接繋がられた前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋がれており、( i i i ) 前記 V H ドメインと前記 V L ドメインとが対合して、抗原に特異的に結合する可変領域を形成している、項目 1 1 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

( 項目 1 2 6 )

前記第 1 I g G 4 ヒンジ領域及び前記第 2 I g G 4 ヒンジ領域が各々、S 2 2 8 P 突然変異 ( E U 付番 ) を含む、項目 1 2 5 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

20

( 項目 1 2 7 )

第 1 V H 及び第 1 V L ならびに第 2 V H 及び第 2 V L をさらに含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原に特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の別のエピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成している、項目 1 1 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

( 項目 1 2 8 )

前記第 1 V L のアミノ酸配列が前記第 2 V L のアミノ酸配列と同一である、項目 1 2 7 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

30

( 項目 1 2 9 )

二特異性抗体であって、( i ) 第 1 V H 及び第 1 V L を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成しており；

40

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第

50

1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がロイシンであり；さらに

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンであり、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、前記ヘテロ二量体化モジュールを含む、前記二特異性抗体。

( 項目 1 3 0 )

二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 V H 及び第 1 V L を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン E ( I g E ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g E の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成しており；そして、

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、  
( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がロイシンであり；さらに

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 3 9 7 のアミノ酸がイソロイシンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンであり、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、前記ヘテロ二量体化モジュールを含む、前記二特異性抗体。

( 項目 1 3 1 )

2 つの I g G 1 C H 2 ドメインをさらに含む、項目 1 2 9 または項目 1 3 0 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 3 2 )

2 つの I g G 4 C H 2 ドメインをさらに含む、項目 1 2 9 または項目 1 3 0 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 3 3 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 2 9 ~ 1 3 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 3 4 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 2 9 ~ 1 3 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 3 5 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V L と前記第 2 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H

10

20

30

40

50

3ドメインとを含む、項目129～132のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目136)

単一のポリペプチド鎖が前記第1VLと前記第2ポリペプチドと前記第2IgG1CH3ドメインとを含む、項目129～132のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目137)

別の単一のポリペプチド鎖が前記第2VHと前記CH1ドメインと前記第2IgG1CH3ドメインとを含む、項目133に記載の二特異性抗体。

(項目138)

別の単一のポリペプチド鎖が前記第2VHと前記CH1ドメインと前記第1IgG1CH3ドメインとを含む、項目134に記載の二特異性抗体。

(項目139)

別の単一のポリペプチド鎖が前記第2VLと前記CLドメインと前記第2IgG1CH3ドメインとを含む、項目135に記載の二特異性抗体。

(項目140)

別の単一のポリペプチド鎖が前記第2VLと前記CLドメインと前記第1IgG1CH3ドメインとを含む、項目136に記載の二特異性抗体。

(項目141)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目142)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9～107と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目143)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸9～107を含む、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目144)

前記第1ポリペプチドが、配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目145)

前記第1ポリペプチドが、配列番号5に示すアミノ酸配列を含む、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目146)

前記第2ポリペプチドが、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目129～145のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目147)

前記第2ポリペプチドが、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む、項目129～145のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目148)

前記第1ポリペプチド及び/または前記第2ポリペプチドが、配列番号1に示すアミノ酸配列とは少なくとも12個のアミノ酸残基が異なっている、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目149)

前記第1ポリペプチド及び前記第2ポリペプチドが各々、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号1の2つのシステイン残基のうちの少なくとも1つにおいてシステイン以外のアミノ酸を含有している、項目129～140のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目150)

(i) 前記第1ポリペプチド及び前記第2ポリペプチドがNグリコシル化されないように、前記第1ポリペプチド及び前記第2ポリペプチドが各々、アスパラギン及び/もしくは

10

20

30

40

50

はスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか；または、

( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び／もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 1 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 1 2 9 ～ 1 4 0 または項目 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 1 )

二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 V H 及び第 1 V L を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成しており；そして、

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がセリンであり；さらに

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンであり、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、前記ヘテロ二量体化モジュールを含む、前記二特異性抗体。

( 項目 1 5 2 )

二特異性抗体であって、

( i ) 第 1 V H 及び第 1 V L を含み、前記第 1 V H と前記第 1 V L とが対合して、第 1 抗原の第 1 エピトープに特異的に結合する第 1 可変領域を形成しており、前記第 1 V H が、ヒト免疫グロブリン M ( I g M ) の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 1 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 V L が、ヒト I g M の C H 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる第 2 ポリペプチドに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 ポリペプチドとが対合して二量体を形成しており；

( i i ) 第 2 V H 及び第 2 V L を含み、前記第 2 V H と前記第 2 V L とが対合して、前記第 1 抗原の第 2 エピトープまたは第 2 抗原に特異的に結合する第 2 可変領域を形成しており、前記第 2 V H が C H 1 ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リン

10

20

30

40

50

カーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記第 2 V L が C L ドメインに ( i ) 直接繋がられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋がられているかのどちらかであり、前記 C H 1 ドメインと前記 C L ドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、 ( i i i ) ヘテロ二量体化モジュールであって、

( a ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 1 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 6 4 及び 3 7 0 のアミノ酸がリジンであり、位置 4 0 9 のアミノ酸がロイシンであり；さらに

( b ) 配列番号 1 1 に示す配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する第 2 I g G 1 C H 3 ドメインを含み、位置 3 7 0 のアミノ酸がセリンであり、位置 3 9 7 のアミノ酸がイソロイシンであり、位置 4 0 5 及び 4 0 9 のアミノ酸がリジンであり、

( a ) 及び ( b ) において前記アミノ酸位置が E U 付番方式に基づくものである、前記ヘテロ二量体化モジュールを含む、前記二特異性抗体。

( 項目 1 5 3 )

2 つの I g G 1 C H 2 ドメインをさらに含む、項目 1 5 1 または項目 1 5 2 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 4 )

2 つの I g G 4 C H 2 ドメインをさらに含む、項目 1 5 1 または項目 1 5 2 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 5 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 1 ~ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 6 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V H と前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 1 ~ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 7 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V L と前記第 2 ポリペプチドと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 1 ~ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 8 )

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 V L と前記第 2 ポリペプチドと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 1 ~ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 5 9 )

別の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V H と前記 C H 1 ドメインと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 5 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 0 )

別の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V H と前記 C H 1 ドメインと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 6 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 1 )

別の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V L と前記 C L ドメインと前記第 2 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 7 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 2 )

別の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 V L と前記 C L ドメインと前記第 1 I g G 1 C H 3 ドメインとを含む、項目 1 5 8 に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 3 )

前記第 1 ポリペプチド及び / または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、項目 1 5 1 ~ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 4 )

前記第 1 ポリペプチド及び / または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ~ 1 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 5 1 ~ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

10

20

30

40

50

( 項目 1 6 5 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 7 ～ 1 1 2 を含む、項目 1 5 1 ～ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 6 )

前記第 1 ポリペプチド及び／または前記第 2 ポリペプチドが、配列番号 2 に示すアミノ酸配列とは少なくとも 1 2 個のアミノ酸残基が異なっている、項目 1 5 1 ～ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 7 )

前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、鎖内ジスルフィド結合を形成しない配列番号 2 のシステイン残基においてシステイン以外のアミノ酸を含有している、項目 1 5 1 ～ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

( 項目 1 6 8 )

( i ) 前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチド及び前記第 2 ポリペプチドが各々、アスパラギン及び／もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有するか；または、

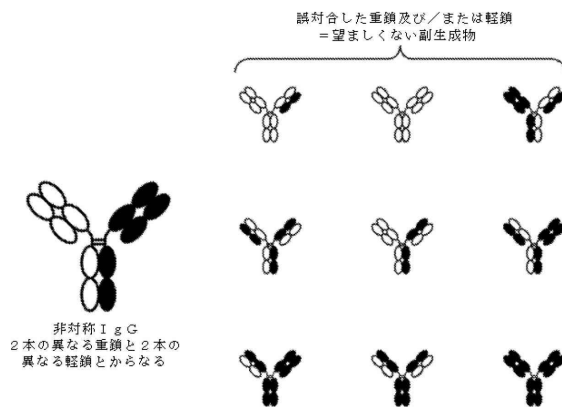
( i i ) 前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが N グリコシル化されないように、前記第 1 ポリペプチドもしくは前記第 2 ポリペプチドが、アスパラギン及び／もしくはスレオニンもしくはセリンを除く他のアミノ酸を配列番号 2 の N グリコシル化モチーフ内に含有する、

項目 1 5 1 ～ 1 6 2 または項目 1 6 6 のいずれか 1 項に記載の二特異性抗体。

【 図面 】

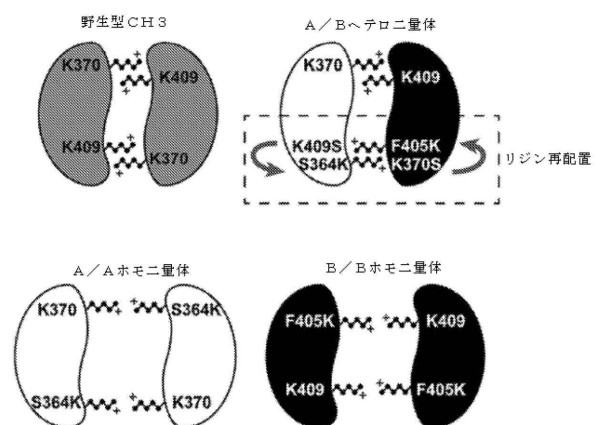
【 図 1 】

【 図 1 】



【 図 2 】

【 図 2 】



10

20

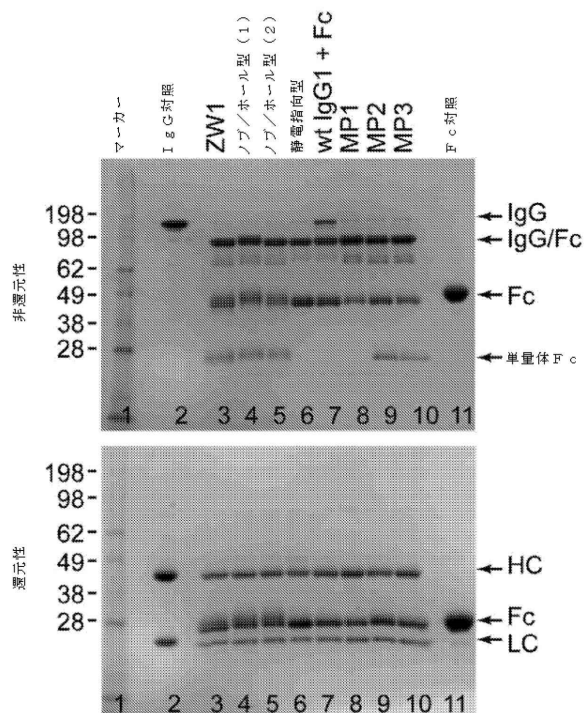
30

40

50

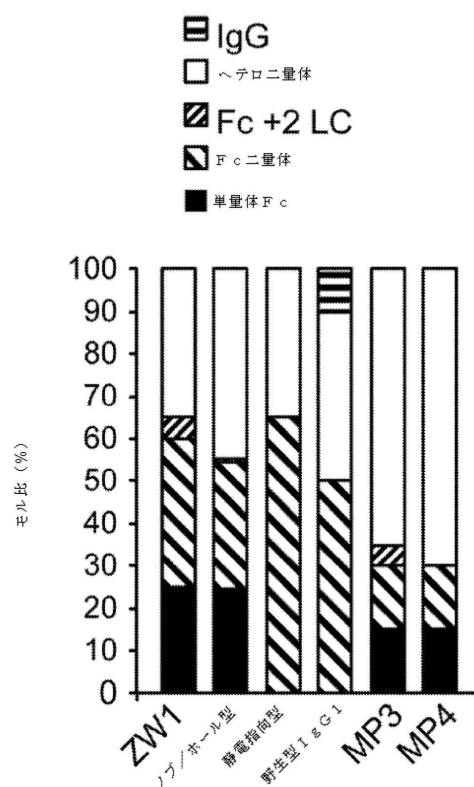
【 図 3 A 】

【図 3 A】



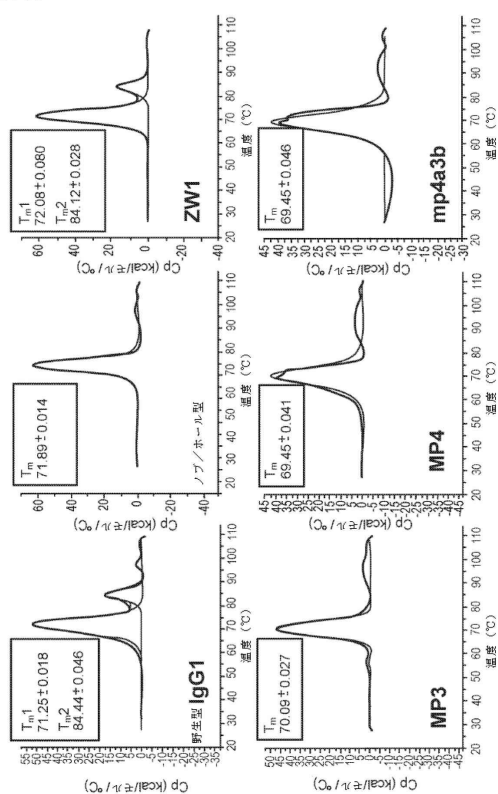
【 図 3 B 】

【図 3 B】



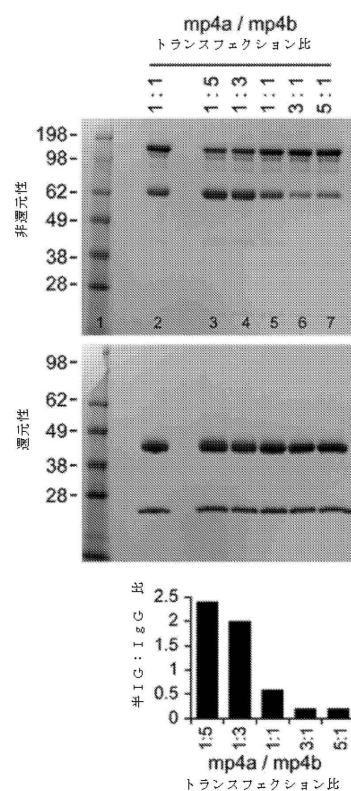
【 図 3 C 】

【図 3 C】



【圖 4 A】

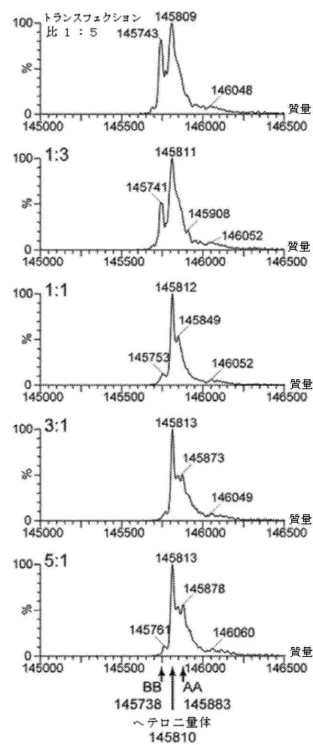
【図 4 A】





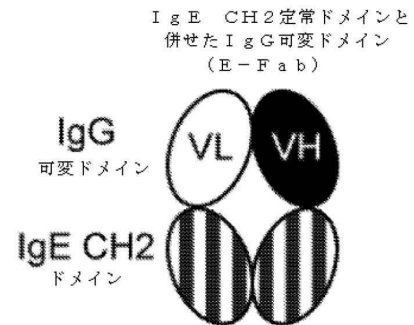
## 【図 4 B】

【図 4 B】



## 【図 5 A】

【図 5 A】

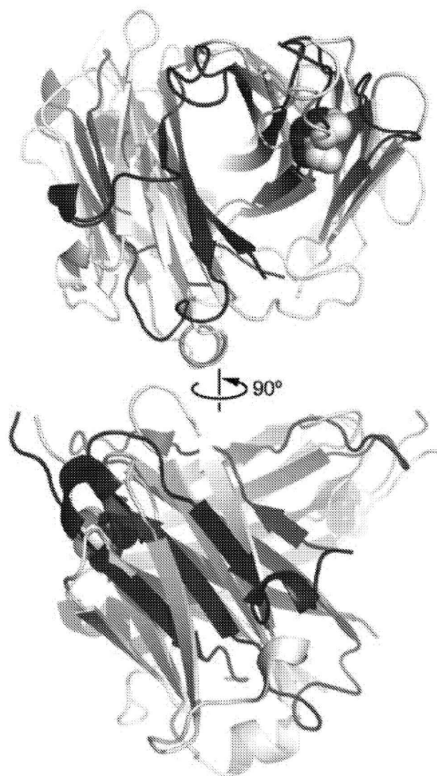


10

20

## 【図 5 B】

【図 5 B】



## 【図 5 C】

【図 5 C】

	A					B				
	1	10	15	16	23	26	27	38		
CH1 / ヒンジ	7654321	.....	123	.....	..	.....	..	.....		
Cカッパ	...ASTKG	PSVFPLAPSSKSTS	...	GGTAALGCLVK	DYFP	..EPVT				
IgE CH2	...RTVAA	PSVFIFPPSDEQLK	...	SGTASVVCLLN	NFYP	..REAK				
EFab HC	...ASTKG	PTVKILQSSCDGGGHF	...	PPTIQLLCLVS	GYTP	..GTIN				
EFab LC	...RTVAA	PTVKILQSSCDGGGHF	...	PPTIQLLCLVS	GYTP	..GTIQ				

	C					D					E				
	39	45		77	84		85	89	96						
CH1 / ヒンジ	.....	1234567	.....	123454321	.....	12									
Cカッパ	VSWNSGALTS	...	GVHTFP	AVLQSS	GLYLS	SSVTV	VPSSSL	..							
IgE CH2	VQWKVDNALQSG	...	NSQESV	TEQDSK	STYLS	STLTLS	SKADY	..							
EFab HC	ITWLEDGQVMD	...	VDLST	ASTTQEG	ELASTQ	SELTLS	SQKHW	..							
EFab LC	ITWLEDGQVMD	...	VDLST	ASTTQEG	ELASTQ	SELTLS	SQKHW	..							

	F					G				
	97	104	105		117	118				
CH1 / ヒンジ	.....	.....	.....	.....	.....	.....				
Cカッパ	.GTQTYIC	NVNHP	..SNTKV	DKKVEPR	CDKTH	TCPPCP				
IgE CH2	EKKVYAC	EVTHQ	..LSSPV	TKSFNR	GE					
EFab HC	LSDRTYTC	QVTYQ	....GHTF	EDSTKK	CA					
EFab LC	LSDRTYTC	QVTYQ	....GHTF	EDSTKK	CA					

30

40

50

## 【図 5 D】

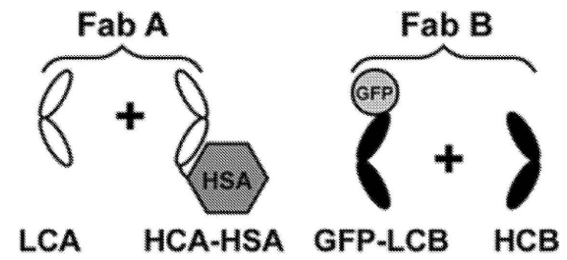
【図 5 D】

ヒト VCSRDFTPTVKILQSSCDGGHFPPTIQLCLVSGYTPGTINITWL-EDGQVMDVLS-  
 チンパンジー .....V.....  
 マウス NI.E..DEL.H...PNA-.HS...Y.FIY.HILNDVSVS..MD.REIT.TLAQ-  
 ラット NI.K...DL.H...PNA-.HS...Y.F.Y.HIQMDVS.H..MD.RKIYETHAQ-  
 ウサギ A..VS...A.RLPH...PRENDTY.V.....I.....D.EV...-V...KDPNMF.I

ヒト FASTTQEGELASTQSELTLSQKHMLSDRTYTCQVTYQGHTEFEDSTKKCA  
 チンパンジー .....R.....G.....  
 マウス .VLIKE..K...C.K.NITEQQ.M.ES.F..K..S..VDYLAH.RR.  
 ラット NVLIKE..K...Y.R.NIT.QQ.M.ES.F..K..S..ENYWAH.RR.S  
 ウサギ ..QPR...K...H...NIT.GE.A.K.....R.A...EL..AHARE.

## 【図 6 A】

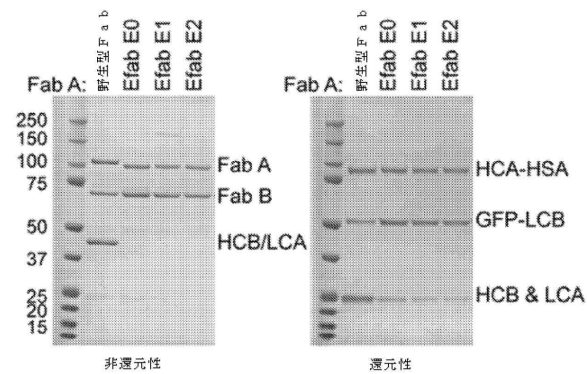
【図 6 A】



含有し 正しい	 114 kDa	 74 kDa
含有され ない	 47 kDa	 141 kDa

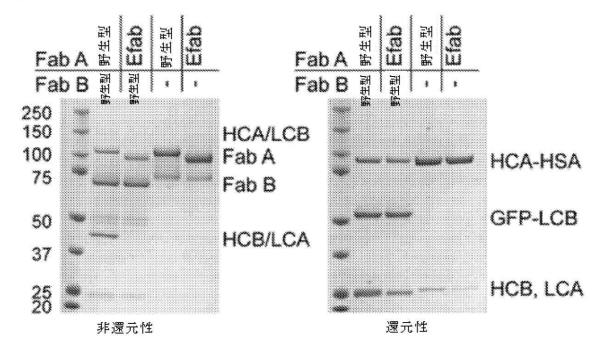
## 【図 6 B】

【図 6 B】



## 【図 6 C】

【図 6 C】



10

20

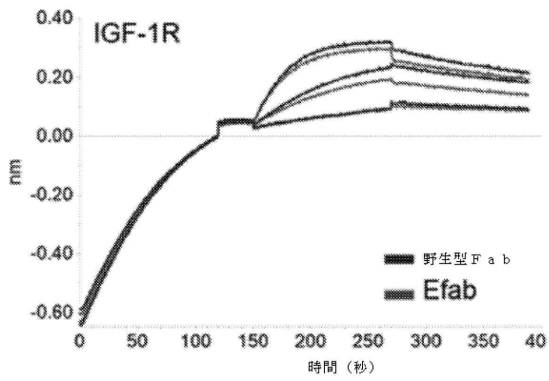
30

40

50

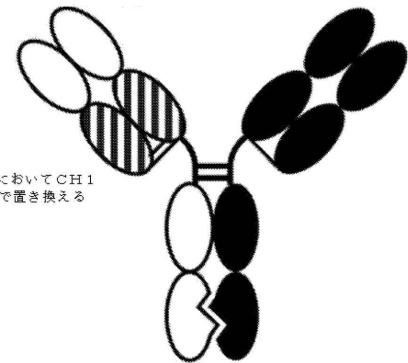
## 【図 6 D】

【図 6 D】



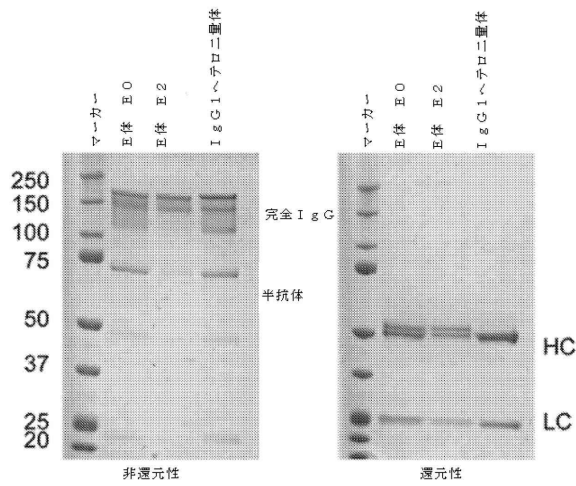
## 【図 7】

【図 7】



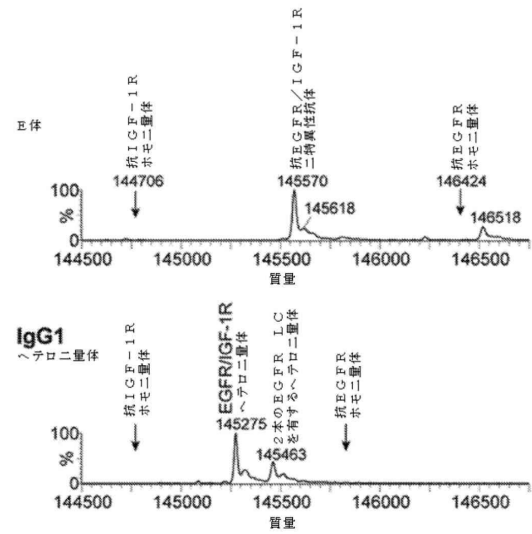
## 【図 8 A】

【図 8 A】



## 【図 8 B】

【図 8 B】



10

20

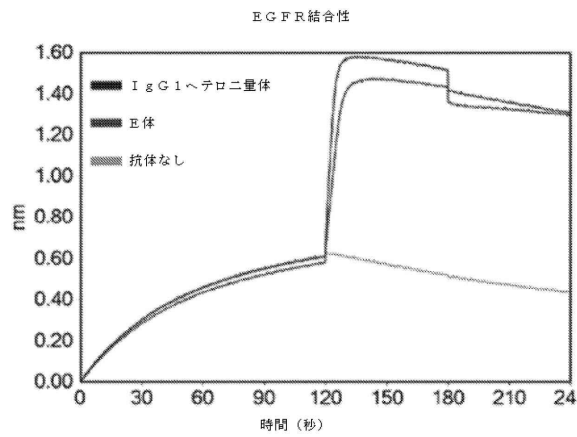
30

40

50

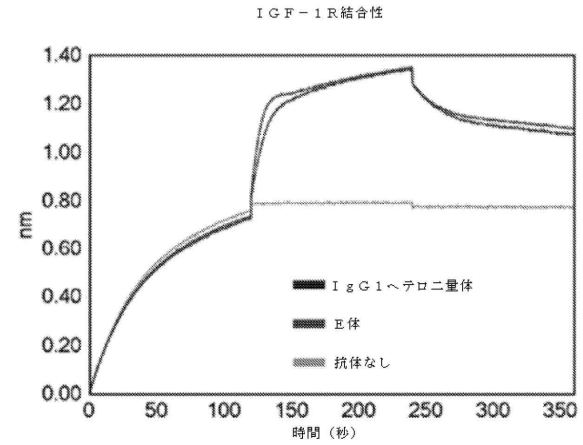
【図 8 C】

【図 8 C】



【図 8 D】

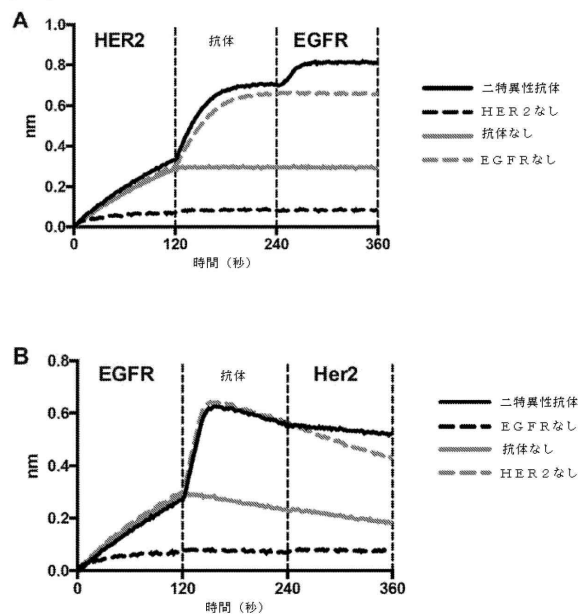
【図 8 D】



10

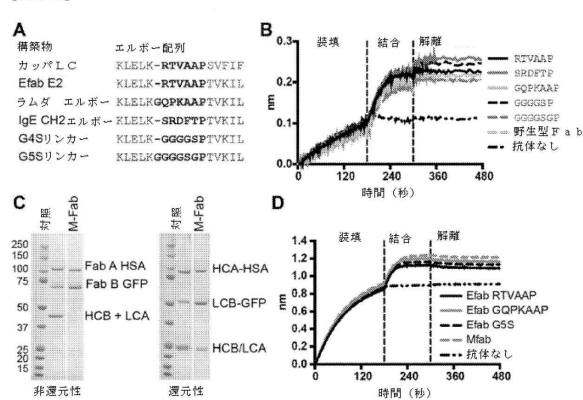
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】



20

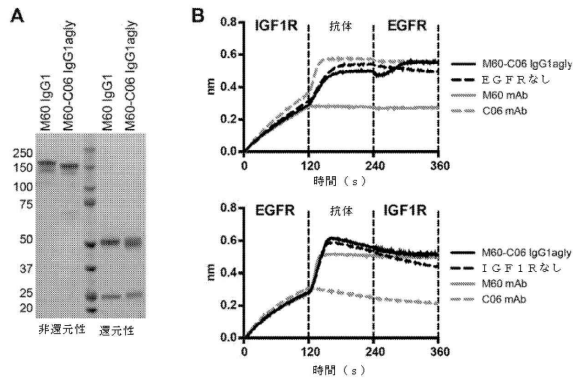
30

40

50

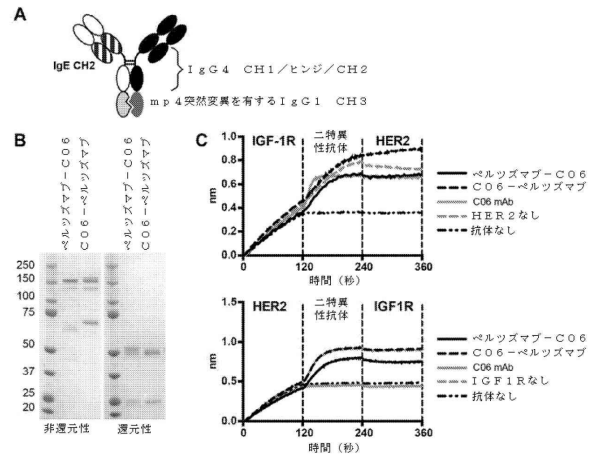
【図 1 1】

【図 1 1】



【図 1 2】

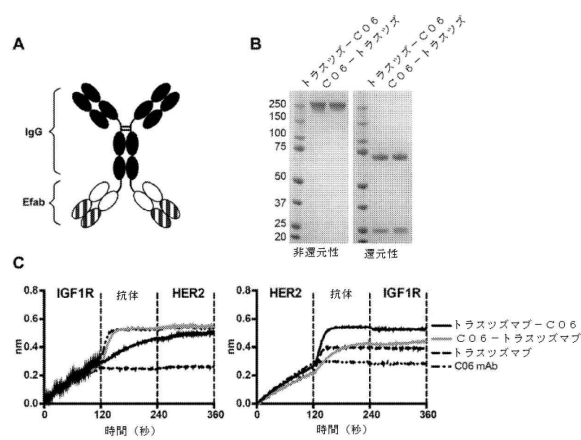
【図 1 2】



10

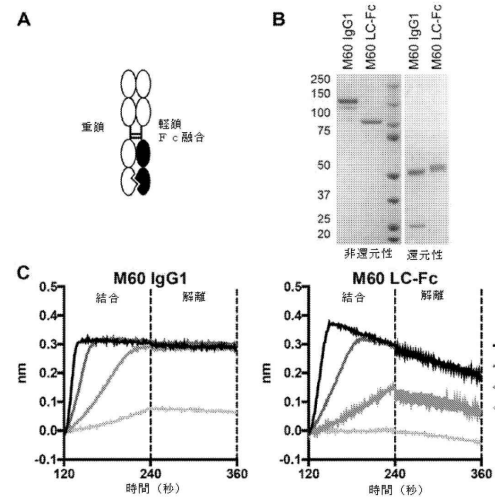
【図 1 3】

【図 1 3】



【図 1 4】

【図 1 4】



20

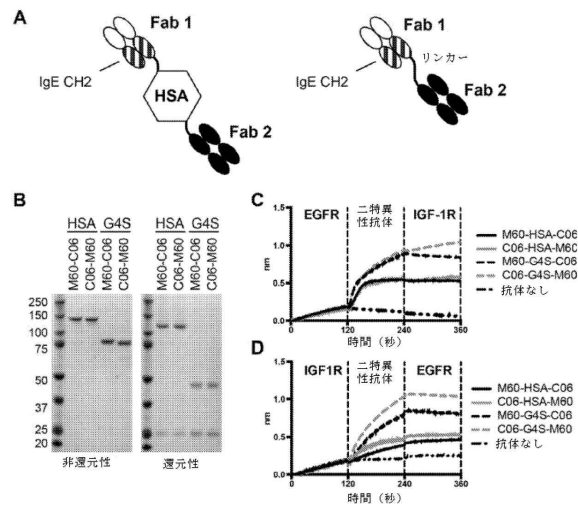
30

40

50

## 【 図 1 5 】

【 図 1 5 】



## 【 配列表 】

[0007138046000001.app](#)

---

フロントページの続き

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 1 4 4 0 5 ( J P , A )

Molecular Cancer Therapeutics, 2014, Vol.13, No.1, p.101-111

Protein Engineering, Design &amp; Selection, 2012, Vol.25, No.10, p.603-612

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 1

C 1 2 N 1 5 / 1 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )