

(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

C 0 7 K	16/00 (2006.01)	F I	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)	(73)特許権者	398050098 バイオジエン・エムエイ・インコーポレ イテッド Biogen MA Inc. アメリカ合衆国 02142マサチューセ ツツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリー ト225番
(86)(22)出願日	平成28年12月15日(2016.12.15)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65)公表番号	特表2019-502694(P2019-502694 A)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43)公表日	平成31年1月31日(2019.1.31)	(72)発明者	ブレイア , マーティン アメリカ合衆国 マサチューセツ 02 144 , サマービル , ウエストン ア ベニュー 43 , ナンバービー 最終頁に続く
(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)		

(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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介  
して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リ  
ンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介  
して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リ  
ンカーを介して繋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、

- ( I ) 前記第 1 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋げられている；または  
 ( I I ) 前記第 2 ポリペプチドが F c ドメインに直接繋げられている；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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 がポリエチレンギリコール ( 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】

10

20

30

40

50

前記リンカーがペプチドリンカーである、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 Ig G 抗体であって、前記全 Ig G 抗体が第 1 CH 3 ドメイン及び第 2 CH 3 ドメインを含むものである、全 Ig 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 VH）及び第 1 軽鎖可変ドメイン（第 1 VL）を含むものであり、前記第 1 VH と前記第 1 VL 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 VH）及び第 2 軽鎖可変ドメイン（第 2 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 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 VH が、ヒト免疫グロブリン E ( Ig E ) の CH 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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 1 VL が、ヒト Ig E の CH 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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VH が、ヒト Ig E の CH 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 90 % 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VL が、ヒト Ig E の CH 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 90 % 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであるか；あるいは

( b ) 前記第 1 VH が、ヒト免疫グロブリン M ( Ig M ) の CH 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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 1 VL が、ヒト Ig M の CH 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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VH が、ヒト Ig M の CH 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 90 % 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VL が、ヒト Ig M の CH 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 90 % 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 Ig G 抗体の前記第 1 CH 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 Ig G 抗体の前記第 2 CH 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 VH）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 及び第 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋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ンカーである、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1IgG1 CH3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1IgG1 CH3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2IgG1 CH3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2IgG1 CH3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1IgG1 CH3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1IgG1 CH3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2IgG1 CH3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2IgG1 CH3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1IgG1 CH3ドメインと前記第2IgG1 CH3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1IgG1 CH2ドメイン及び第2IgG1 CH2ドメインをさらに含み、前記第1IgG1 CH2ドメインが前記第1IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2IgG1 CH2ドメインが前記第2IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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末端に繋げられており、前記第1ヒンジ領域が前記第1IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられているか；

(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末端に繋げられており、前記CH1ドメインのC末端が第1ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第1ヒンジ領域のC末端が、前記第1IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた前記第1IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられており、

(ii) 前記VLドメインのC末端が前記CLドメインのN末端に繋げられており、前記CLドメインのC末端が第2ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第2ヒンジ領域のC末端が、前記第2IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた前記第2IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられており、

(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か；あるいは

(II) 第1IgG4 CH2ドメイン及び第2IgG4 CH2ドメインをさらに含み、前記第1IgG4 CH2ドメインが前記第1IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)

10

20

30

40

50

) 直接繋げられているかまたは( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは( i i ) リンカーを介して繋げ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 末端に繋げられており、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 末端に繋げられているか；

( 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 末端に繋げられており、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 末端に繋げられており、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 ドメインに直接繋げられた前記第 1 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋げられており、

( i i ) 前記 V L ドメインの C 末端が C L ドメインの N 末端に繋げられており、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 末端に繋げられており、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 ドメインに直接繋げられた前記第 2 I g G 4 C H 2 ドメインの N 末端に繋げられており、

( 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。

#### 【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 末端に繋げられた第 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。

#### 【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 末端に繋げられた第 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。

#### 【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 ) 直接繋げられているかまたは( i i ) リンカーを介して繋げ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

10

20

30

40

50

第2ポリペプチドに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋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、第1VH及び第1VLと；

(ii)第2VH及び第2VLであって、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記CH1ドメインと前記CLドメインとが対合して二量体を形成している、第2VH及び第2VLと；

(iii)ヘテロ二量体化モジュールであって、

(A)(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1IgG1 CH3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1IgG1 CH3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2IgG1 CH3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2IgG1 CH3ドメインとを含むか；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1IgG1 CH3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1IgG1 CH3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2IgG1 CH3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2IgG1 CH3とを含み、

(a)及び(b)において前記アミノ酸位置がEU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19】

二特異性抗体であって、

(i)第1VH及び第1VL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、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋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、第1VH及び第1VLと；

(ii)第2VH及び第2VLであって、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記CH1ドメインと前記CLドメインとが対合して二量体を形成している、第2VH及び第2VLと；

(iii)ヘテロ二量体化モジュールであって、

(A)(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1IgG1 CH3ドメインであって、位置364及び370のアミノ酸がリジ

10

20

30

40

50

ンであり、位置 409 のアミノ酸がセリンである、第 1 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 EU 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 IgG1 CH2 ドメイン；または

(II) 2 つの IgG4 CH2 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 VH と前記第 1 ポリペプチドと前記第 1 IgG1 CH3 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 VH と前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 IgG1 CH3 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 VL と前記第 2 ポリペプチドと前記第 1 IgG1 CH3 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 VL と前記第 2 ポリペプチドと前記第 2 IgG1 CH3 ドメインとを含む、

二特異性抗体。

#### 【請求項 21】

要素 (II) (a) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 VH と前記 CH1 ドメインと前記第 2 IgG1 CH3 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 (II) (b) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 VH と前記 CH1 ドメインと前記第 1 IgG1 CH3 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 (II) (c) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 VL と前記 CL ドメインと前記第 2 IgG1 CH3 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 (II) (d) において、第 2 の単一のポリペプチド鎖が前記第 2 VL と前記 CL ドメインと前記第 1 IgG1 CH3 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) 鎮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) 鎮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。

【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。

【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。

【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。

【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】

10

20

30

40

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、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、

(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NIT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NAS配列である、

請求項1～4、18～24または25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】

【0001】

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62/269,664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】

【0002】

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mAb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】

【0003】

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、Fc領域をそのCH3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Fabアームのうちの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FabアームのCH1ドメイン及びCLドメインをIgECH2ドメインまたはIgMCCH2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FabアームのCH1ドメイン及びCLドメインがIgECCH2ドメイン(またはIgMCCH2ドメイン)の断片で置き換わっており、当該断片は、なおもIgECCH2ドメイン(またはIgMCCH2ドメイン)と二量体化することができるものである。

【0004】

一態様において、本開示は、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、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いる、当該抗体またはその抗原結合性断片を提供する。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

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げられているかまたはリンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 1 VL は、ヒト Ig E 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げられているかまたはリンカーを介して繋げ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 ドメインに直接繋げられている。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 IgG4 P - 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 2 VH）と第 2 軽鎖可変ドメイン（第 2 VL）とを含み、第 2 VH と第 2 VL 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 VH は CH1 ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第 2 VL は CL ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げ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1VHと第1VL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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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Fcドメインに直接繋げられている。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。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のアミノ酸7~112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、IgM 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、IgM 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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第2VLはCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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

## 【 0 0 0 8 】

30

40

50

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1VHと第1VLとを含んでいる第1抗原結合性断片（第1Fab）を含み、第1VHと第1VL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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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2VHと第2VLとを含んでいる第2Fabを含み、第2VHと第2VLとが対合して第2可変領域を形成しており、第2VHはCH1ドメインに（i）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第2VLはCLドメインに（i）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第1Fab及び第2Fab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1Fabは第2Fabに連結されている。

#### 【0009】

この態様のいくつかの実施形態では、第1Fabはリンカーによって第2Fabに連結される。特定の実施形態では、第1Fabは異種ポリペプチドによって第2Fab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XEN（例えば、AE144、AE288）である。いくつかの実施形態では、第1Fabはポリエチレンギリコール（PEG）によって第2Fab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、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、IgE 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。

#### 【0010】

10

20

30

40

50

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1VHと第1VLとを含んでいる第1抗原結合性断片（第1Fab）を含み、第1VHと第1VL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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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2VHと第2VLとを含んでいる第2Fabを含む。第2VHと第2VLとが対合して第2可変領域を形成しており、第2VHはCH1ドメインに（i）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第2VLはCLドメインに（i）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第1Fab及び第2Fab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1Fabは第2Fab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1Fabはリンカーによって第2Fabに連結される。特定の実施形態では、第1Fabは異種ポリペプチドによって第2Fab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XEN（例えば、AE144、AE288）である。いくつかの実施形態では、第1Fabはポリエチレンギリコール（PEG）によって第2Fab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、配列番号2のアミノ酸7～112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、IgM 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、IgM 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工

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2F<sub>a</sub>b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1F<sub>a</sub>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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第1F<sub>a</sub>b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2F<sub>a</sub>b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1F<sub>a</sub>b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2F<sub>a</sub>b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つて、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。

【0014】

別の態様において、本開示は、四価二特異性抗体であつて、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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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。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。

#### 【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1F a b及び第2F a bを含み、第1F a bが第1重鎖可変ドメイン（第1V H）及び第1軽鎖可変ドメイン（第1V L）を含むものであり、第1V Hと第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、第2F a bが第2重鎖可変ドメイン（第2V H）及び第2軽鎖可変ドメイン（第2V L）を含むものであり、第2V Hと第2V 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1I g G C H 2ドメイン及び第1I g G C H 3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2I g G C H 2ドメイン及び第2I 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、全抗体を含み、当該抗体が、第3V H及び第3V Lならびに第4V H及び第4V Lを含むものであり、第3V Hと第3V 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、第4V Hと第4V L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3V 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）直接繋げられているかまたは（i i）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第3V 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）直接繋げられているかまたは（i i）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第4V H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3ポリペプチドに（i）直接繋げられているかまたは（i i）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第4V 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4ポリペプチドに（i）直接繋げられているかまたは（i i）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第1ポリペプチドは第1I g G C H 2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2I g G C H 2ドメインのN末端に連結されている。第1F a bは第1I g G C H 3ドメインのC末端に連結されており、第2F a bは第2I g G C H 3ドメインのC末端に連結されている。

#### 【0017】

この態様のいくつかの実施形態では、第1F a bは第1リンカーによって全抗体の第1C H 3ドメインのC末端に連結されており、第2F a bは第2リンカーによって全抗体の第2C 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～

10

20

30

40

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1F<sub>a</sub>b及び第2F<sub>a</sub>bを含み、第1F<sub>a</sub>bが第1重鎖可変ドメイン（第1V<sub>H</sub>）及び第1軽鎖可変ドメイン（第1V<sub>L</sub>）を含むものであり、第1V<sub>H</sub>と第1V<sub>L</sub>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2F<sub>a</sub>bが第2重鎖可変ドメイン（第2V<sub>H</sub>）及び第2軽鎖可変ドメイン（第2V<sub>L</sub>）を含むものであり、第2V<sub>H</sub>と第2V<sub>L</sub>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1IgG<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>ドメイン及び第1IgG<sub>1</sub>CH<sub>3</sub>ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2IgG<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>ドメイン及び第2IgG<sub>1</sub>CH<sub>3</sub>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3V<sub>H</sub>及び第3V<sub>L</sub>ならびに第4V<sub>H</sub>及び第4V<sub>L</sub>を含むものであり、第3V<sub>H</sub>と第3V<sub>L</sub>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4V<sub>H</sub>と第4V<sub>L</sub>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3V<sub>H</sub>は、ヒト免疫グロブリンM（IgM）のCH<sub>2</sub>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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第3V<sub>L</sub>は、ヒトIgMのCH<sub>2</sub>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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第4V<sub>H</sub>は、ヒトIgMのCH<sub>2</sub>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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第4V<sub>L</sub>は、ヒトIgMのCH<sub>2</sub>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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第1ポリペプチドは第1IgG<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>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2IgG<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>ドメインのN末端に連結されている。第1F<sub>a</sub>bは第1IgG<sub>1</sub>CH<sub>3</sub>ドメインのC末端に連結されており、第2F<sub>a</sub>bは第2IgG<sub>1</sub>CH<sub>3</sub>ドメインのC末端に連結されている。

## 【0019】

10

20

30

40

50

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。

10

20

#### 【 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。

30

#### 【 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。

40

#### 【 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 末端に繋げられており、第 1 ヒンジ領域が第 1 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋げられている。

#### 【 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 末端に繋げられた第 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 末端に繋げられた第 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 末端に繋げられており、C H 1 ドメインの C 末端は第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋げられており

50

、第1ヒンジ領域のC末端は、第1IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた第1IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられている。VLドメインのC末端はCLドメインのN末端に繋げられており、CLドメインのC末端は第2ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第2ヒンジ領域のC末端は、第2IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた第2IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられている。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。

#### 【0025】

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。いくつかの実施形態では、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。

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1IgG4 CH2ドメイン及び第2IgG4 CH2ドメインを含み、第1IgG4 CH2ドメインは第1IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第2IgG4 CH2ドメインは第2IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第1IgG4ヒンジ領域が第1IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。ある場合には、第1IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU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1IgG1 CH3ドメインのC末端と、第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2IgG4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2IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU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2IgG4ヒンジ領域を介して第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2Fabを含む。特定の場合には、第2IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU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、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末端に繋げられており、CH1ドメインのC末端は第1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第1IgG4ヒンジ領域のC末端は、第1IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた第1IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。VLドメインのC末端はCLドメインのN末端に繋げられており、CLドメインのC末端は第2IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。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。ある場合には、第1IgG4ヒンジ領域及び第2IgG4ヒンジ領域は各自、S228P突然変異(EU付番)を含む。

30

#### 【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。

40

#### 【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含まれる。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1 Ig G1 CH3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 Ig G1 CH3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1 Ig G1 CH3ドメインと第2 Ig G1 CH3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1 Ig G1 CH2ドメイン及び第2 Ig G1 CH2ドメインを含み、第1 Ig G1 CH2ドメインは第1 Ig G1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第2 Ig G1 CH2ドメインは第2 Ig G1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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1 Fab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末端に繋げられており、第1ヒンジ領域が第1 Ig G1 CH2ドメインのN末端に繋げられている。

30

【0033】

他の実施形態では、ヘテロ二量体化モジュールは、第1 Ig G1 CH3ドメインのC末端と、第2 Ig G1 CH2ドメインのN末端に繋げられた第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 Ig G1 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2 Fabを含む。

【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末端に繋げられており、CH1ドメインのC末端は第1ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第1ヒンジ領域のC末端は、第1 Ig G1 CH3ドメインに直接繋げられた第1 Ig G1 CH2ドメインのN末端に繋げられている。VLドメインのC末端はCLドメインのN末端に繋げられており、CLドメインのC末端は第2ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第2ヒンジ領域のC末端は、第2 Ig G1 CH3ドメインに直接繋げられた第2 Ig G1 CH2ドメインのN末端に繋げられている。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1 VH及び第1 VLならびに第2 VH及び第2 VLを含む。第1 VHと第1 VL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 VHと第2 VL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 VLのアミノ酸配列は第2 VL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1 Ig G4 CH2ドメイン及び第2 Ig G4 CH2ドメインを含み、第1 Ig G4 CH2ドメインは第1 Ig G1

50

CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、第1IgG4 CH2ドメインは第1IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第1IgG4ヒンジ領域が第1IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。ある場合には、第1IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU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1IgG1 CH3ドメインのC末端と、第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2IgG4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2IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU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2IgG4ヒンジ領域を介して第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2Fabを含む。特定の場合には、第2IgG4ヒンジ領域はS228P突然変異(EU付番)を含む。

#### 【0037】

いくつかの実施形態では、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末端に繋げられており、CH1ドメインのC末端は第1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第1IgG4ヒンジ領域のC末端は、第1IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた第1IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。VLドメインのC末端はCLドメインのN末端に繋げられており、CLドメインのC末端は第2IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、第2IgG4ヒンジ領域のC末端は、第2IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている。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。ある場合には、第1IgG4ヒンジ領域及び第2IgG4ヒンジ領域は各々、S228P突然変異(EU付番)を含む。

#### 【0038】

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。

#### 【0039】

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含まれる。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。

#### 【0040】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第1VH及び第1VLを含み、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いる、当該二特異性抗体を提供する。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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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

10

20

30

40

50

体はさらに、第 2 VH 及び第 2 VL を含み、第 2 VH と第 2 VL 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 VH は CH1 ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 2 VL は CL ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。CH1 ドメインと CL 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 EU 付番方式に基づくものである (IgE CH2 ドメインが、第 1 IgG1 CH3 ドメインまたは第 2 IgG1 CH3 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。)

#### 【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 VH 及び第 1 VL を含み、第 1 VH と第 1 VL 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 VH 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) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 1 VL 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) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げ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 VH 及び第 2 VL を含み、第 2 VH と第 2 VL 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 VH は CH1 ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 2 VL は CL ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (i i) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。CH1 ドメインと CL 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 IgG1 CH3 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 IgG1 CH3 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 EU 付番方式に基づくものである (IgE CH2 ドメインが、第 1 IgG1 CH3 ドメインまたは第 2 IgG1 CH3 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。)

#### 【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 IgG1 CH2 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 IgG4 CH2 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 VH と第 1 ポリペプチドと第 1 IgG1 CH3 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 VH と第 1 ポリペプチドと第 2 IgG1 CH3 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 VL と第 2 ポリペプチドと第 1 IgG1 CH3 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

10

20

30

40

50

が第 1 VL と第 2 ポリペプチドと第 2 IgG1 CH3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の单一のポリペプチド鎖が第 2 VH と CH1 ドメインと第 2 IgG1 CH3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の单一のポリペプチド鎖が第 2 VH と CH1 ドメインと第 1 IgG1 CH3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の单一のポリペプチド鎖が第 2 VL と CL ドメインと第 2 IgG1 CH3 ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、別の单一のポリペプチド鎖が第 2 VL と CL ドメインと第 1 IgG1 CH3 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 ~ 107 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 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。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 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 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 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。

#### 【 0043 】

別の態様において、本開示は、二特異性抗体であって、第 1 VH 及び第 1 VL を含み、第 1 VH と第 1 VL 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 VH 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 1 VL 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げ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 VH 及び第 2 VL を含み、第 2 VH と第 2 VL 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 VH は CH1 ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。第 2 VL は CL ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、CH1 ドメインと CL 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 IgG1 CH3 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 のアミノ酸がセリンであり；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 IgG1 CH3 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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 4 4 】

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 ~ 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 のアミノ酸がロイシンであり；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 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、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。

【 0 0 4 5 】

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 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 ~ 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。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 ~ 1 1 2 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 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 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

10

20

30

40

50

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ろう。

#### 【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つ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ドメインの通常の頭-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ヘ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-fabの作出の模式図である。E-fabにおいてCH1及びCLは、天然の二量体を形成するものであるIgE CH2(C2)ドメインで置き換わっている。

【図5 B】Igフォールドの全体的類似性を示す、ヒトC2ドメイン(白)とヒトIg G1 CH1 / カッパ定常ドメイン(黒)との構造の重ね合わせである。C2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の始まるところにあるPro(球として表されている)は、CH1 / CL及びC2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Ig G1 CH1及びカッパ定常ドメインならびにC2ドメインならびにE-Fab重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IMGT付番に整列しており、Ig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の始まるところにある保存されたProは下線の付いた太字で示されている。E-Fabにおけるagly突然変異(N38Q)及び鎖間ジスルフィドシステムも下線の付いた太字で示されている。

【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IgE CH2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。Fab Aの重鎖(HCA)はHSAと融合しており、他方、Fab Bの軽鎖(LCB)はN末端においてGFPでタグ付けした。鎖の正しい対合はFabの分子量によって確認することができる。

【図6 B】SDS-pageによるFab対合の分析である。示されているHSAタグ付抗EGFR M60-A02 FabまたはE-Fabは、GFPタグ付Fab抗IGF-1R C06と共に発現させた(表3も参照のこと)。重鎖の正しい対合によって非還元条件下で114kDa及び74kDaにバンドが生じ、他方、47kDaまたは140kDaのバンドは誤対合を指し示している。

【図6 C】SDS-pageによるFab対合の分析である。抗IGF-1R Fab C06をE-fabとして組み立て、別の抗IGF-1R Fab(G11)との軽鎖対合を、図6 Bに示すように試験した。

【図6 D】Octetによって試験したときの抗IGF-1R E-Fabの結合性を描写するグラフである。Fabを個々に発現させ、プロテインAスピンカラムで精製し、Hisチップ上に装填した可溶性IGF1-Rに対するOctet結合性(300nM、100nM及び30nM)において使用した。

【図7】E-Fab及びリジン再配置を有する非対称IgG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Fabアームの定常ドメインがE-Fabで置き換わっている一方で、もう片方のFabアームは野生型IgG CH1 / CL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CH3ドメインに含まれている。

【図8 A】CHO-S細胞で発現したEGFR / IGF-1R二特異性抗体及び上清のSDS-PAGEによる分析である。E体であるE0及びE2がE-Fabとして抗EGFRを含有する一方、IgG1ヘテロ二量体対照は軽鎖解決策を含有していない。

【図8 B】図8 Aの非対称IgGについての質量分析を表したもの、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LC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】Hisタグ付EGFR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。CHO-S細胞からの未希釈の上清を、Hisタグ付リガンド(5μg/mL)装填後にOctet結合性において使用した。

【図8 D】Hisタグ付IGF-1R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。CHO-S細胞からの未希釈の上清を、Hisタグ付リガンド(5μg/mL)の装填後のOctet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

10

20

30

40

50

合性を描写するグラフである。Hisタグ付可溶性HER2(5 μg/ml)をOctetチップ上に装填して、次のステップでの二特異性抗体(200nM)の捕捉に備えた。その後のEGFR(15 μg/ml)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9Bは、図9A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EGFRを装填し、その後に二特異性抗体及びHER2を結合させた。

【図10】図10Aは、様々なエルボーリンカー配列を有するFab構築物を示す。抗HER2抗体であるトラスツズマブをFab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IgE CH2ドメインの最初の5つのアミノ酸とを含む。図10Bは、Octet結合性試験のグラフである。CHO細胞において(図9の場合と同様に)Fabをセツキシマブとの非対称IgGとして発現させ、精製し、抗Hisチップ上に装填したHisタグ付HER2(5 μg/ml)と共にOctet結合性試験において使用した(100nM)。図10Cは、SDS-PAGEによるFab対合の分析である。IgM CH2ドメインがIgE CH2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Fab(抗EGFR M60及び抗IGF-1R C06)を共発現させた(片方のFabはHSAと融合させ、もう片方のFabはGFPと融合させた)。Fabのカッパ及びCH1定常ドメインをIgM CH2ドメインで置き換えた(結果として生じた分子はM-Fabと命名した)。鎖対合についてのSDS-PAGEによる分析によって、M-Fabは、対照において顕著に認められたM60とC06との間での軽鎖誤対合を解決したことが示された。図10Dは、Octet結合性試験のグラフである。CHO-SにおいてFab及びM-FabをFab(Fcを欠く)として発現させ、HER2との結合性をOctetによって試験するために上清を使用した。

【図11】図11Aは、mp3ヘテロ二量体突然変異を含有するIgG1 agly(T299A)定常領域と共に通常のFabとしての抗EGFR M60-A02 Fab及び抗IGF1R M13.C06を含んでいる、CHO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11Bは、同時結合性に関する二特異体を試験したOctet試験の結果を示す。上側のパネルでは、Hisタグ付可溶性IGF1R(5 μg/ml)をOctet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mAbと結合させた。第3ステップでは、第2抗原(EGFR)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EGFR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、Hisタグ付可溶性EGFR(5 μg/ml)をOctet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mAbと結合させた。第3ステップでは、第2抗原(IGF1R)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IGF1R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12】図12Aは、Fabとmp4ヘテロ二量体を含有するIgG4P/IgG1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(IgG4P/IgG1 agly)にN297Q置換を含む。図12Bは、抗HER2抗体ペルツズマブと抗IGF1R抗体C06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Fabとした。プロテインA精製した分量分のCHO細胞由来のヘテロ二量体をSDS-PAGEで分析した。図12Cは、可溶性IGF1RとHER2タンパク質とを使用するOctet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、Hisタグ付可溶性IGF1R(5 μg/ml)をOctet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mAbと結合させた。第3ステップでは、第2抗原(HER2)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HER2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、Hisタグ付可溶性HER2(5 μg/ml)をOctet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mAbと結合させた。第3ステップでは、第2抗原(IGF1R)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 IGF1R 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13】図13Aは、重鎖のC末端と融合しているFabを有するIgG(「Mab - Fab」)の模式図である。図13Bは、トラスツズマブと抗IGF-1R抗体C06とのMab - Fabのゲルの写真である。トラスツズマブと抗IGF-1R抗体C06とのMab - Fabを、CHO細胞で一過的に発現させ、プロテインAで精製した。SDS-PAGEは、タンパク質が正しく会合して約240kDaのMab - Fabを形成したことを示している。図13Cは、Octetによって試験した場合の結果を示す。Hisタグ付可溶性IGF1RまたはHER2(5μg/ml)をOctetチップ上に装填して次のステップでの二特異性抗体(200nM)の捕捉を可能にした。その後の第2リガンド(15μg/ml)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。

【図14】図14Aは、LC - Fc融合及びFcへ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14Bは、CHO細胞から產生されたLC - Fc一価抗体及び対応する二価IgG1(抗EGFR M60 - A02)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SDS-PAGEは、一価LC - Fc抗体の巧みな会合を示している。図14Cは、様々な濃度でのOctet結合性試験において一価LC - Fc及び二価IgGを描写するグラフである。一価LC - Fc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15】図15Aは、HAS(左)、ペプチドリンカー(右)によって通常のFabに繋げられたFabを有する二特異性抗体の模式図を提供する。図15Bは、CHO細胞で発現させ、プロテインA精製し、SDS-PAGEで分析した、図15Aに示すような2例の二特異体のゲルの写真である。抗EGFR抗体及び抗IGF1R抗体であるM60 - A02及びM13.C06を、両配向でそれぞれFabまたは通常のFabとして使用した。図15Cは、Octet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EGFRと結合してその後にIGF-1Rと結合した場合にのみ認められた。図15Dは、Octet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IGF-1Rと結合してその後にEGFRと結合した場合には認められなかった。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0049】

###### 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IgG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がなる2つの抗体も非対称IgG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CH3ドメインにおいてリジン再配置によって操作された、Fc領域を含有している。別の実施形態では、片方のFabアームのCH1及びCLドメインが、IgE CH2ドメイン(またはIgM CH2ドメイン)またはIgE CH2ドメイン(またはIgM CH2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Fab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

10

20

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CH2ドメイン間で安定なジスルフィド結合型二量体をなす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 <u>N</u> 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関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 <u>N</u> 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関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9～107）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7～112）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。

【0054】

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。

10

【0055】

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。

【0056】

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、12個以下、11個以下、10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、10個、11個もしくは12個のアミノ酸が異なっていてもよい。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12個以下、11個以下、10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12個以下、11個以下、10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関与する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17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103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5D）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。

20

【0057】

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

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。

#### 【0058】

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。

#### 【0059】

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、V H 1 及びV L 1 構築物のC H 2 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、V H 1 及びV L 1 構築物のC H 2 E ドメインはなおも対合し合うことができる。

#### 【0060】

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C H 2 M ドメインを採用する場合、C H 2 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、V H 1 及びV L 1 構築物のC H 2 M ドメインはなおも対合し合うことができる。

#### 【0061】

アミノ酸配列同士のパーセント同一性は、BLAST 2.0 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

プロコストは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ィンで置換されてもよく)；鎖間ジスルフィド結合形成に関与するシスティ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10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20

20 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I g 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
CL    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。

## 【化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 L  
 CL    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  
 WL    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)

## 【0066】

別の実施形態では、上記V H 1構築物において使用されることになる、上記V L 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C H 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C H 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I g G 1 C H 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    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  
 CL    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  
 WL    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5)

20

## 【0067】

上記V L 1構築物のV Lドメインに連結されることになる、上記V H 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C H 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C H 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    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  
 CL    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  
 WL    S D R T Y T C Q V T    Y Q G H T F E D S G  
 1 0 1    K K C A    (配列番号6)

## 【0068】

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 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V H 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V H 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げられていてもよいし、リンカーを介して繋げられていてもよい。F c領域は、V H 1構築物またはV L 1構築物に繋げられ得る。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ドメインに繋げられた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げ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末端に繋げ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末端に繋げられていてもよい。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末端に繋げ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末端に繋げられていてもよい。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末端に繋げられた、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末端に繋げられた、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、ペプチドリンカーである。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、ポリエチレンギリコールである。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、(ii)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末端に繋げられている。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ドメインに繋げられ得る。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げられ得る。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末端と繋げ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ンカーである。1～25個の残基（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20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ンカーの例としては、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 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 G l y S e r（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 G l y S e r)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ピートの接合部に生じる）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、ペプチドリンカーは(G G G X X)n G G G G S（配列番号62）及びG 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  $(G G G X_1 X_2)_n G G G G S$  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  $(G G G X_1 X_2)_n G G G G S$  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  $(G G G X_1 X_2)_n G G G G S$  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  $G G G G S (X G G G S)_n$  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  $(G G G G A)_2 G G G G S$  (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  $(G G G G Q)_2 G G G G S$  (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  $(G G G P S)_2 G G G G S$  (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  $G G G G S (P G G G S)_2$  (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ペレート (DSS)、ビス (スルホスクシンイミジル) スペレート (BSS)、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 (BSOCOES)、及びビス [2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル] スルホン (スルホ-BSOCOES) が挙げられる。

## 【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) 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】

A S T K G P S V F P    L A P S S K S T S G    G T A A L G C L V K    D  
Y F P E P V T V S    W N S G A L T S G V    H T F P A V L Q S S    G L  
Y S L S S V V T    V P S S S L G T Q T    Y I C N V N H K P S    N T K  
V D K K V    (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        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 45)

10

20

30

40

50

を含み、この場合、C H 2 E ( V C S R D F T P ( 配列番号 8 ) ) の最初の 8 つのアミノ酸がヒト I g G 1 C H 2 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 ) ) で置き換わっている。別の実施形態では、上記 V H 1 構築物のエルボー領域は S R D F T ( 配列番号 77 ) である。特定の実施形態では、V H 1 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 5 6 または配列番号 5 8 であり得る。

【 0 0 7 5 】

V L 1 構築物のエルボー領域は、例えば、カッパまたはラムダ C L ドメインの断片 ( 例えば、カッパ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パドメインに由来するものであり、カッパドメインの 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。ヒトカッパ C L ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

10

【 化 9 】

R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N  
F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K  
D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
L S S P V T K S F N R G E C ( 配列番号 73 )

20

【 0 0 7 6 】

ヒトラムダ C L 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 】

G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S  
D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K  
A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S  
H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V  
A P T E C S ( 配列番号 74 )

30

上記 V L 1 構築物のエルボー領域の非限定的な例は R T V A A ( 配列番号 9 ) である。一実施形態において、V L 1 構築物は以下のアミノ酸配列 :

【 化 11 】

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 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 46 )

40

を含み、この場合、C H 2 E ( V C S R D F T P ( 配列番号 8 ) ) の最初の 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 ( エルボー領域 R T V A A ( 配列番号 9 ) ) で置き換わっている。別の実施形態では、上記 V L 1 構築物のエルボー領域は G Q P K A A ( 配列番号 78 ) である。特定の実施形態では、V L 1 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 5 6 または配列番号 5 8 であり得る。

【 0 0 7 7 】

重鎖誤対合問題に対する解決策

50

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  
 VK    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)

10

20

【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  
 VK    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)

30

【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)

40

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:

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ある位置(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(Diebolder 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

は、ヒンジ領域は Ig 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 Ig G 4 抗体由来のヒンジである。ヒンジ領域が Ig 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 ( EU 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 末端切断があつてもよい）。

ヒト Ig 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 Ig 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 Ig 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 / または挿入があつてもよい。

#### 【 0 0 8 5 】

CH 2 ドメインは、いかなるクラスの抗体に由来するものであつてもよい。特定の実施形態では、CH 2 ドメインは Ig G 1 抗体に由来するものである。他の実施形態では、CH 2 ドメインは Ig G 4 抗体に由来するものである。CH 2 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、CH 2 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、CH 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がグルタミンへと突然変異している（例えば、Asn 2 9 7 Glu 1 ）。他の実施形態では、CH 2 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ィンへと突然変異している（例えば、Thr 2 9 9 Ala または Thr 2 9 9 Cys ）。他の例では、エフェクター機能を変化させるべく CH 2 ドメインを突然変異させてもよい（例えば、Leu 2 3 4 A 1 a / Leu 2 3 5 A 1 a 、 Pro 3 2 9 Glu 1 y 、及び / または Pro 3 3 1 Ser ）。Fc Rn に対する結合性を変化させるべく CH 2 ドメインを突然変異させることもできる。

#### 【 0 0 8 6 】

特定の実施形態では、定常ドメインは Ig G 4 P / Ig 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 Ig G 4 P / Ig G 1 ( agly ) ハイブリッドである。これらのハイブリッドは、Ig G 4 のヒンジ領域及び CH 2 ドメインならびに Ig G 1 の CH 3 ドメインを含む。Ig G 4 のヒンジ領域は S 2 2 8 P 突然変異を有する。 agly 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。

#### 【 0 0 8 7 】

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；CH 2 領域を通常のフォントで示し；CH 3 ドメインを太字で示す）：

#### 【 化 1 6 】

D K T H T C P P C P A P E L L G 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 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 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 18 )

10

20

30

40

50

を含む。

【0088】

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】

*D K T H T C P P C P* A P E L L G 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 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 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。

【0089】

別の実施形態では、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；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】

*D K T H T C P P C P* A P E L L G 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

20

【化18-2】

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  
 20)

30

を含む。

【0090】

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

50

## 【化19】

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 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  
 21)

10

を含む。

## 【0091】

これらのF<sub>c</sub>領域は、F<sub>c</sub>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。

20

## 【0092】

上記のC<sub>H</sub>3ドメイン及びF<sub>c</sub>ドメインのいずれかは、C<sub>H</sub>2Eドメイン（またはC<sub>H</sub>2Mドメイン）で置き換えられたC<sub>L</sub>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ドメインに直接繋げられているかまたは間に介在する配列を介して繋げられている第2C<sub>H</sub>2ドメインを含むことができ、ここで、第2C<sub>H</sub>2ドメインは、C<sub>H</sub>2Eドメインまたは、C<sub>H</sub>2E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ドメインに直接繋げられているかまたは間に介在する配列を介して繋げられている第2C<sub>H</sub>2ドメインを含むことができ、ここで、第2C<sub>H</sub>2ドメインは、C<sub>H</sub>2Mドメインまたは、C<sub>H</sub>2M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C<sub>H</sub>3ドメイン及びF<sub>c</sub>ドメインのいずれかは、C<sub>H</sub>1及びC<sub>L</sub>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C<sub>H</sub>3ドメイン及びF<sub>c</sub>ドメインのいずれかは、C<sub>H</sub>2Eドメイン（またはC<sub>H</sub>2Mドメイン）で置き換えられたC<sub>L</sub>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C<sub>H</sub>3ドメイン及びF<sub>c</sub>ドメインのいずれかは、C<sub>H</sub>1及びC<sub>L</sub>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】

—実施形態において重鎖は以下のアミノ酸配列：

40

50

## 【化20】

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 10  
 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22)

を含む。

## 【0094】

一実施形態において、この重鎖は、以下のアミノ酸配列：

## 【化21】

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)

を含んでいる軽鎖と二量体化する。

## 【0095】

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。

## 【0096】

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 領域のうちの一方に直接繋げ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げられている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。

## 【0097】

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1F c 領域に直接繋げられているかまたは間に介在するリンカーを介して繋げられており、当該F c 領域は第2F c 領域に繋げられている（例えば、第1F c 領域のC H 3 ドメインのC末端は、第2F c 領域のヒンジ領域のN末端に繋げられている）。

## 【0098】

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 に直接繋げられているかまたはリンカーを介して繋げられている。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1F c のヒンジ領域のN末端に繋げられており、F a b のV L / C L 含有部分はそのC末端を介して第2F c 領域のヒンジ領域のN末端に繋げられている。

## 【0099】

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

10

20

30

40

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応している。

【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て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。

【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することができる。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。

【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лемент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、Laike et al., Reprod. Fertil. 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。

【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、Sphingoptera 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】

10

20

30

40

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、(ii) 少ない突然変異、及び(iii) 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 IgG1にCH3突然変異S364K/K409S及びK370S/F405K生じさせるためのプライマー

PCR	順方向プライマー	逆方向プライマー	
S 3 6 C O 2 4 K - 9 6 5 , 6	T G G G C T G C C T G G T C A A G (配列番号23)	C O 2 - 9 6 8	g t c a g T T T g a c c t g g t t c t t g (配列番号24)
S 3 6 C O 2 4 K - 9 6 3 , 7	c a a g a a a c c a g g t c A A A c t g a c (配列番号25)	A V 1 - 1 7 7	G A A T T G G C C G C C C T A G A T G (配列番号26)
K 4 0 C O 2 9 S - 9 6	T G G G C T G C C T G G T C A A G	C O 2 - 9 7	g g t g a g G C T g c t g t a g a g G A

## 【表1-2】

5 , 6	(配列番号27)	2	(配列番号28)
K 4 0 C O 2 9 S - 9 7 3 , 1	T C c t c t a c a g c A G C c t c a c c (配列番号29)	A V 1 - 1 7 7	G A A T T G G C C G C C C T A G A T G (配列番号30)
K 3 7 C O 2 0 S - 5 4 5 , 8	G C T C T G G G T T C C A G G T T C (配列番号31)	C O 2 - 9 7 0	g a t a g a a g c c G C T g a c c a g g (配列番号32)
K 3 7 C O 2 0 S - 9 6 3 , 9	c c t g g t c A G C g g c t t c t a t c (配列番号33)	A V 1 - 1 7 7	G A A T T G G C C G C C C T A G A T G (配列番号34)
F 4 0 C O 2 5 K - 5 4 5 , 8	G C T C T G G G T T C C A G G T T C (配列番号35)	C O 2 - 9 7 4	t g t a g a g T T T g a a g g a g c c g t (配列番号36)
F 4 0 C O 2 3 K - 9 7 3 , 3	a c g g c t c c t t c A A A c t c t a c a (配列番号37)	A V 1 - 1 7 7	G A A T T G G C C G C C C T A G A T G (配列番号38)

## 【0108】

增幅は、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】

再配置されたリジンの個別の効果についての洞察をいかに得るために、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）。

10

20

30

40

50

【表2-1】

表2. Fcへ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EGFR - A02)						単量体B (ヒトIgG1 Fc)					
M P 1	p M P 2 3 3	M A m p 1 a	6 0 2	—	S 4 K	3 6	p P 3 4	M 2	F c p 1 b	m	K 3 S	7 0
M P 2	p M P 2 3 5	M A m p 2 a	6 0 2	—	K 9 S	4 0	p P 3 6	M 2	F c p 2 b	m	F 4 K	0 5
M P 3	p M P 2 3 7	M A m p 3 a	6 0 2	—	S 9 S	3 6	p P 3 8	M 2	F c p 3 b	m	K 3 F	7 0 5
M P 4	p M P 2 5 4	M A	6 0 2	—	S 4 K /	3 6	p P 2	M p 4 b	F c	m	K 3 S /	7 0

【表2-2】

20

タンパク質	単量体A (抗EGFR - A02)						単量体B (ヒトIgG1 Fc)						
Z W 1	p M P 2 0 5	M A z w 1 a	6 0 2	—	K 1 Y /	4 0	5 9	p P 0 8	M 2	F c z w 1 b	m	V 3 F	9 7 / 4 0 5
ノブ／ホール	p M P 2 0 9	M A 回	6 0 2	—	L 8 A /	3 5	T 0 V /	3 5	—	T 1 2	—	T 3 6 6	5 0 / V /
静電指向型	p M P 2 1 3	M A K D	6 0 2	—	K 9 D	4 0	p P 1 6	M 2	F c	D	D	3 9 9	— / L / T 3 9 2
野生型	p M P 2 2 1	M A w t	6 0 2	—	I なし	p P 2 2	M t	F c h u	w	D	D	3 9 9	— / T 3 9 4 W
IgG1													— / T 3 6 6 W

40

50

完全設計は、再配置されたリジンを両方とも有し ( p M P 2 3 7 は突然変異 S 3 6 4 K / K 4 0 9 S を有し、 p M p 2 3 8 は突然変異 K 3 7 0 S / F 4 0 5 K 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 M P 3 と命名した。 M P 3 の C H 3 ドメインのペプチド配列を以下に示す。

M P 3 单量体 A の C H 3 ドメインのアミノ酸配列 ( 突然変異は下線付きの太字 )

【化 2 2】

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 3 9 )

10

M P 3 单量体 B の C H 3 ドメインのアミノ酸配列 ( 突然変異は下線付きの太字 )

【化 2 3】

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 4 0 )

20

さらに、比較のために、公開されているいくつかの C H 3 ヘテロ二量体化突然変異を生じさせた ( A t w e l l e t a l . , J . M o l . B i o l . , 2 7 0 : 2 6 - 3 5 , 1 9 9 7 ; G u n a s e k a r a n e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 8 5 : 1 9 6 3 7 - 1 9 6 4 6 , 2 0 1 0 ; V o n K r e u d e n s t e i n e t a l . , m A b s 5 : 6 4 6 - 6 5 4 , 2 0 1 3 ) 。さらに、野生型 I g G 1 対照に相当する構築物 p M P 2 2 1 及び p M P 2 2 2 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 D N A 配列決定によって確認した。

【 0 1 1 0 】

抗体を一過的なトランスフェクションによって C H O 細胞で発現させた。全ての抗体は良好に発現し、 F e c t o p r o 及び D N A を 2 : 1 の比で使用して  $6 \times 10^6$  細胞 / m l でトランスフェクトされた C H O 細胞を使用する 9 日間の発現及び翌日の 2 8 への温度遷移の後に 1 0 0 ~ 2 0 0 m g / L の力値が得られた。上清をプロテイン A カラムで精製し、分量分を S D S - P A G E で分析した ( 図 3 A ) 。全ての試料において、 I g G 1 重鎖と遊離 F c 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 I g G 1 と F c 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、 3 5 ~ 8 0 % 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 M P 1 、 M P 2 及び M P 3 ではわずかにより高かった ( 図 3 B ) 。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 M P 2 及び M P 3 ならびに Z W 1 及びノブ・イントウ・ホール型突然変異体は全て单量体 F c を含有していた。单量体 F c の存在は、 F c 二量体が、 C H 3 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

【 0 1 1 1 】

40

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 M P 3 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 M P 4 と命名し、アミノ酸変化を表 2 に示す。M P 4 突然変異を有する I g G 1 / F c ヘテロ二量体を上記のように C H O 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、M P 4 が M P 3 と同じくらい効率的に I g G 1 重鎖と遊離 F c とのヘテロ二量体を生じさせたことが実証された（図 3 B）。

【0112】

全てのヘテロ二量体タンパク質を Kappa Select カラムでさらに精製して F c の二量体及び単量体を除去し、続いて Tandem Superdex S 200 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 I g G 1 対照は、C H 3 ドメインの予測 T m である約 83 を示した（図 3 C）。Z W 1 設計は同程度の C H 3 融点を有する（図 3 C）、というのも、それは野生型 I g G 1 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 Kruedenstein et al., mAbs 5: 646-654, 2013）。ノブ・イントウ・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、C H 3 ドメインの T m が約 70 に低下したこと及び、当該ドメインが C H 2 及び F a b 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 3 C）。M P 3 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、C H 3 の T m が同様に低下したことを指し示していた（図 3 C）。タンパク質 M P 4 及び M P 4 a 3 b (M P 4 の単量体 A と M P 3 の単量体 B) は、C H 2 / F a b ピークの右側に肩を現し（図 3 C）、突然変異 K 409L が元の突然変異 K 409S 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 T m 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 M P 4 は野生型 I g G 1 C H 3 ドメインと比べて T m がより低い。

M P 4 の C H 3 ドメインのペプチド配列を以下に示す。

M P 4 の単量体 A の C H 3 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  
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 41)

10

20

20

30

M P 4 の単量体 B の C H 3 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  
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 42)

40

【0113】

M P 4 をコードするプラスミド (p M P 254 及び p M P 259) の D N A 分子配列を以下に示す。

M P 4 A 突然変異 (S 634K, K 409L) を有する抗 E G F R M 60 - A 02 I g G 1 重鎖、p M P 254 の D N A 配列：

50

## 【化26-1】

```

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26-2】

```

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 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 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 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 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 a g c a g a g c t c g t t a g t g a a
30
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 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 a 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 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 g g t g a c g a
t a

```

10

20

30

40

50

## 【化26-3】

9 0 1 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  
 9 6 1 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 a c a g g a t g g g g t c t c  
 a t  
 1 0 2 1 t t a t t a 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 a t  
 t a  
 1 0 8 1 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  
 1 1 4 1 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 c a c c a g a c a t a a t a g c t g a c a g  
 a c  
 1 2 0 1 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  
 1 2 6 1 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 20  
 1 3 2 1 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  
 1 3 8 1 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 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  
 1 4 4 1 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  
 1 5 0 1 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 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 30  
 1 5 6 1 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  
 1 6 2 1 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 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  
 1 6 8 1 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 G T C T T C C C C C T G G C A C C C T C C C T  
 C A 40

## 【化 2 6 - 4】

1 7 4 1 A G A G C A C C T C T G G G G G C A C A G C G G C C C  
 T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T C C C C G A  
 A C  
 1 8 0 1 C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G  
 C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C G G C  
 T G  
 1 8 6 1 T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C  
 T C A G C A G C G T G G T G A C C G T G C C C T C C A G C A G  
 C T  
 1 9 2 1 T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A C G  
 T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A  
 C A  
 1 9 8 1 A G A A A G T T G A G C C C A A A T C T T G T G A C A  
 A G A C T C A C A C A T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C  
 T G  
 2 0 4 1 A A C T C C T G G G G G G A C C C G T C A G T C T T C C  
 T C T T C C C C C A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T  
 G A  
 2 1 0 1 T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G  
 T G G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C T G A  
 G G  
 2 1 6 1 T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G  
 T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G G C  
 G G  
 2 2 2 1 A G G A G C A G T A C A A C A G C A C G T A C C G T G  
 T G G T C A G C G T C C T C A C C G T C C T G C A C C A G G A  
 C T  
 2 2 8 1 G G C T G A A T G G C A A G G A G T A C A A G T G C A  
 A G G T C T C C A A C A A A G C C C C T C C C A G C C C C A T  
 C G  
 2 3 4 1 A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C  
 A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C  
 C C  
 2 4 0 1 C A T C C C G G G A T G A G G T G A C C A A G A A C C  
 A G G T C A A A C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T  
 C T  
 2 4 6 1 A T C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A T G G G  
 A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A C C A A C T A C A A  
 G A  
 2 5 2 1 C C A C G G C C T C C C G T G T T G G A C T C C G A C G  
 G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C C T C C T C A C C G T  
 G G

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

10

20

30

40

50

## 【化 26 - 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 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 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 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 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 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 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 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  
 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 g c c t t c c t g 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 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 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 t a g c t t c c c g g c a a c a a t t a  
 a a  
 5 7 0 1 t a g a c t g g a t g g a g 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 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 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 26 - 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 10  
 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 a g a g c t a c  
 c a a c t c 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 c t g c t g c  
 c a 20  
 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 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 30  
 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 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 g t g a t g c t c g t c a g 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 40

## 【化26-10】

6 7 8 1 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  
 6 8 4 1 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  
 6 9 0 1 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 10  
 c g  
 6 9 6 1 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  
 7 0 2 1 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  
 7 0 8 1 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) 20

MP4B突然変異(K370S、V397I、F405K)を有するIgG1Fc、p  
MP259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  
 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 30  
 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 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 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 40  
 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 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 c c

## 【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  
 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 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 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 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 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  
 9 0 1 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 a t t g g c t a t a t  
 g c  
 9 6 1 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 a c a g g a t g g g g t c t c  
 a t  
 1 0 2 1 t t a t t a t t a c a a a t t c a c a t a c a a a  
 c a 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 a t  
 t a  
 1 0 8 1 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  
 1 1 4 1 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 c a c c a g a c a t a a t a g c t g a c a g  
 a c  
 1 2 0 1 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 a t c  
 c g  
 1 2 6 1 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】

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

10

20

30

40

50

## 【化27-4】

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 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 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 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 a c a t g t g 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 c g a a c  
 c a  
 2 5 8 1 c g g g g g a c g t g g 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 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 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 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 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 t 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 g c c  
 10  
 20  
 30  
 40

## 【化 2 7 - 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 c c g a c g t 10  
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 g c a  
t c c c t g t g a c c c c t c c c a g t g c c t c t c c t g g t  
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 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 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 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 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  
40

## 【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 a c a a c g t c g t g a c t g g g a 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 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 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 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 c g g g g a a a t g  
 t g c g c g g a a c c c t a t t t g t t t a 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 g c  
 g g  
 4 5 0 1 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 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 2 7 - 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 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 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 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 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 a a a a c t t c a t t  
 t t t a a 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 c g t t 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  
 40

## 【化 27 - 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 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 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 a a c g c c a g c a a c g  
 c g g c c 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 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 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IgG1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つつ軽鎖対合問題を回避するために両方の重鎖上に同じFab (抗EGFR M60-A02)を含有していた。等量の2つの重鎖、及びM60-A02の軽鎖をCHO一過性発現体において発現させ、上清をSDS-PAGE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、LC-MC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MP4はMP3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Fabを有する設計MP4の重鎖 (プラスミドpMP254及びpMP399)を1:5~5:1の様々な比でCHO-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IgG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4A)。これらの実験ではどちらの重鎖も同じFab (抗EGFR M60)を含有していたことから、2つの重鎖の示差的発現はCH3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4B)。したがって、2つ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

## 【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 (LC:HC) 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 (VL:VH及びCL:CH1) 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。

30

## 【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CH1/CLの代わりにIgフォールドドメインが使用され得るという仮説を立て、CH1:CLドメインを置き換える候補IgフォールドドメインとしてIgE (C2) のCH2ドメインを選択した (図5A)。IgE (C2) のCH2ドメインは、2つの鎖間ジスルフィドによって繋げられたホモ二量体を形成する。このドメインは、(

40

50

IgEには存在していない) ヒンジ領域の代わりとして、IgE重鎖間の二量体化界面の役割を果たす。さらに、IgGのCH2ドメインとは違い、CH2ドメインはエフェクターモードに関与せず、FcRIと接触しない(Holdom et al., *Nature Struct. & Mol. Biol.*, 18: 571-576, 2011)。

#### 【0117】

CH2ドメインの構造は他のIgフォールドドメイン、例えばCL及びCH1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5B)。二量体の2つのCH2ドメインは他のIg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、CH2とCH1:CLとは全体的に非常に異なっているため、Ig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、Ig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5C中で下線付きの太字で強調されている)は、CH2定常ドメイン及びCH1/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CH2ドメインと融合させること及び、VH:VL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。CH2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Fab構築物を「E-Fab」と命名した(図5C)。ヒト免疫グロブリンE(IgE)のCH2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28】

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	20
Q L	L C L V S G Y T P G	T I <u>N</u> 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)		

#### 【0118】

VHドメインをCH2ドメインと融合させるために、IgG1 CH1定常領域のコネクタ配列(ASTKG(配列番号7))と、Pro2(CドメインのIMGT特有の付番、図5C)から始まるCH2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(VCSRDFTP(配列番号8))がヒトIgG1 CH1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)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(IgE)のCH2ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

#### 【化29】

1	<u>A S T K G</u> P T V K I	L Q S S C D G G G H	F P P T I Q L L	30
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45)		40

#### 【0119】

カッパ定常領域由来のコネクタ(RTVAA(配列番号9))を使用して、同じ方策を用いてVLをCH2ドメインと融合させた。最初の8つのアミノ酸(VCSRDFTP(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RTVAA(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CH2ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化30】

```

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
CL   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
WL   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 6)

```

## 【0120】

ヒトC 2ドメインは1つのN結合型グリコシル化部位をA s n 3 8 ( I M G T 付番) 10  
に有し、E - F a b ではそれをG 1 n 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 2ドメインと結び付けられており、当該C  
2ドメインは、a g 1 y 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 - F a b E 0と命名した。E - F a b の重鎖のE 0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31】

```

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
CL   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
WL   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 )

```

20

E - F a b の軽鎖のE 0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      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
CL   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
WL   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 )

```

30

## 【0121】

しかしながら、C 2ドメインは通常はホモ二量体化するため、H C : H C またはL C  
: L C 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 - F a b E 1 ~ E 3と命名した ( 表3 ; 位置はI M G T 付番方式による )。

40

50

## 【表3】

表3. E-Fab試験のための構築物

Fab A (抗EGF R M 6 0 - A 0 2)	軽鎖構築物	重鎖構築物 (HSA融合)
野生型 IgG1	p X W U 1 7 4	p M P 3 6 3
E-Fab E0	p M P 3 8 6 (N 3 8 Q)	p M P 3 9 0 (N 3 8 Q)
E-Fab E1	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-Fab E2	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-Fab E3	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)
Fab B (抗IGF -1 R C 0 6)	軽鎖 (GFP融合)	重鎖
野生型 IgG1 (突然 変異なし)	p M P 3 4 0	p M P 3 4 1

10

20

## 【0122】

E-Fabの重鎖のE1設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化33】

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  
 CL    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  
 WL    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47)

30

## 【0123】

E-Fabの軽鎖のE1設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化34】

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  
 CL    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  
 WL    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48)

40

## 【0124】

E-Fabの重軽鎖のE2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。

## 【0125】

E-Fabの重鎖のE3設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化35-1】

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  
 CL    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35-2】

WL 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49)

E-Fabの軽鎖のE3設計のアミノ酸配列を以下に示す。

## 【化36】

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  
WL 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50)

10

## 【0126】

軽鎖対合の制御においてE-Fabを評価するために、M60-A02抗EGFRとM13.C06抗IGF1Rとの2つのFab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HV3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SDS page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GFP(30kDa、Fab B 抗IGF-1RのLC)またはHSA(66kDa、Fab AまたはE-FabのHC、抗EGFR)でタグ付けした(図6A)。E-Fab構築物をgBlockによって組み立てた。PCRに基づく突然変異によってC2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pV90/pV100に由来するCHO発現ベクターにクローニングした(表3)。40ml規模のCHO-Sでの一過的なトランスフェクションによってFabを共発現させた。トランスフェクションから24時間後に発現のために細胞を28に遷移させ、8日後に上清を採取し、遠心分離及び濾過(0.22μm)によって浄化した。

20

## 【0127】

発現したタンパク質のSDS-PAGEによる分析は、C2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-Fab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。M60-A02とM13-C036との2つのFabを野生型IgG1/カッパFabとして共発現させた場合には、M60-A02軽鎖とM13-C06重鎖との誤対合が容易に検出された(図6B)。しかしながら、M60-A02をE-Fab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、CH1/CL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ことができなかった(データ示さず)。同様に、抗IGF-1R M13-C06をE-Fabとして構築すると、それを別のFab(抗IGF-1R G11)と共に発現させた場合に誤対合は検出されなかった(図6C)。重要なことに、Fabを個別に発現させて抗原との結合性をOctetによって試験した場合、E-fab及び野生型Fabは、抗Hisチップ上に装填されたHisタグ付IGF-1Rに対して同程度に結合した(図6D)。

30

## 【0128】

したがって、上記データに基づくと、E-Fab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、Fabの結合性が維持されるからである。興味深いことに、C2ドメインはE-Fab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E2及びE3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E1(図6B)のみ、さらなる試験を行わなかった。E-Fab設計E2の定常ドメインのペプチド配列を以下に示す。

E-Fab軽鎖定常領域agly N38Q(設計E2、T121G、pMP463)の

40

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 10  
 ミノ酸配列

## 【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て完全 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 5 1)

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】

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

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 I  
 Y R M Q W V R Q A P G K G L E W V S G I S P S G G T T W 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 R W S G G S G Y A F D I W G Q G T M V T V S S A S T K  
 G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E  
 P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S  
 S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K  
 V E P K S C D K T H T C P P C P A 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 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 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  
 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53)

20

成熟M13.C06 カッパ軽鎖 (pMP407) のアミノ酸配列

## 【化42-1】

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

30

## 【化42-2】

S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y  
 E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C  
 (配列番号54)

40

## 【0130】

異なる軽鎖の対合を制御するために、抗E G F R F a b をE f a b 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こと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ホ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 と組み合わさ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 とも I G F - 1 R とも結合したが、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

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

40

50

## 【化43】

1        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  
 5 1    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  
 1 0 1    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 T V  
 K I    L Q S I C D G G G H    F P P T I Q L L C L  
 1 5 1    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    10  
 2 0 1    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  
 2 5 1    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  
 3 0 1    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  
 3 5 1    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  
 4 0 1    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    20  
 S C    S V M H E A L H N H    Y T Q K S L S L S P  
 4 5 1    G    (配列番号79)

p M P 5 2 8 トラスツズマブ E f a b 軽鎖

## 【化44】

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    30  
 1 0 1    G T K V 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80)

p M P 5 2 1 セツキシマブ I g G 1 m p 4 b

## 【化45】

1        D I L L T Q S P V I    L S V S P G E R V S    F S C R A S Q S  
 I G    T N I H W Y Q Q R T    N G S P R L L I K Y    40  
 5 1    A S E S I S G I P S    R F S G S G S G T D    F T L S I N S V  
 E S    E D I A D Y Y C Q Q    N N N W P T T F G A  
 1 0 1    G T K L E L 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  
 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81)

p M P 5 2 6 セツキシマブ カッパ

## 【化46】

1 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S  
 L T N Y G V H W V R Q S P G K G L E W L G V  
 5 1 I W S G G N T D Y N T P F T S R L S I N K D N S K S Q V  
 F F K M N S L Q S N D T A I Y Y C A R A L T  
 1 0 1 Y Y D Y E F A Y W G Q G T L V T V S A A S T K G P S V F  
 P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D  
 1 5 1 Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S  
 S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y  
 2 0 1 I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C  
 P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K  
 2 5 1 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 N S  
 3 0 1 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  
 3 5 1 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  
 4 0 1 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 82)

10

20

30

## 【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、他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ップを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)セツキシマップとの非対称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、トラスツズマップがH E R 2と結合する能力にほとんど影響を与える、どの構築物も野生型トラスツズマップF a b と比べて同程度の結合性を示した。

## 【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。

## 【0138】

40

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HER2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 His タグを有するトラスツズマブM - f a b 重鎖 (pMP623) のアミノ酸配列 (エルボー領域を太字で示し、IgM CH2ドメインには下線を引き、6 x His をイタリック体で示す)

【化47】

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D  
 TYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY AD  
 SVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAV  
 YYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS ASTK  
GPKVSV FVPPRDGF<sub>FFG</sub> NPKSKLICQ ATGFS  
PRQIQ VSWLREGKQV GSGVTTDQVQ AEAKES  
GPTT YKVTSTLTIK ESDWLGQS<sub>MF</sub> TCRVDHR  
GLT FQQQASS<sub>SMC</sub>H HHHHH (配列番号75)

10

トラスツズマブM - f a b 軽鎖 (pMP596) のアミノ酸配列 (エルボー領域を太字で示し、IgM CH2ドメインには下線を引いてある)

20

【化48-1】

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN T  
 AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RF  
 SGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYT  
 TPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPKVSVFVP PRDG

【化48-2】

FFGNPR KSKLICQATG FSPRQIQVSW LREGK  
QVGSG VTTDQVQAEA KESGPTTYKV TSTLTI  
KESD WL<sub>GQSMFTCR</sub> VDHRG<sub>LTFQQ</sub> QASSMC  
 (配列番号76)

30

【0139】

E f a b 及びM - F a b をCHO-Sにおいて (Fcのない) F a b として発現させ、上清をOctetによるHER2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10D)。

【0140】

総じてこれらの結果は、IgM CH2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ということを示している。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

【0141】

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。

【0142】

第1に、Fcヘテロ二量体化突然変異を他のFc領域のCH3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、Ans

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Efab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。

pMP402 M60 Efab IgG1 agly T299A mp3a S364K / K409S

【化49-1】

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT  
 FS DYIMHWVRQAPGKGLEWVSV  
 51 ISSSGGDTSY ADSVKGRFTI SRDNSKNT  
 LY LQMNSLRAED TAVYYCAKVL  
 101 AGYFDWLPDF YWGQGTLVTV SSASTKGP

10

20

【化49-2】

TV KILQSI CDGG GHFPPTIQLL  
 151 CLVSGYTPGT IQITWLEDGQ VMVDVDSLST  
 AS TTQEGERLAST QSELTLSQKH  
 201 WLSDRTYTCQ VTYQGHTFED STKKC ASD  
 KT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF  
 251 PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDP  
 EV KFNWYVDGVE VHNAKTKP  
 301 EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKC  
 KV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
 351 REPQVYTLPP SRDELTKNQV KLTCLVK  
 FY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
 401 TPPVLDSDGFFFLYSSLTVDS KSRWQQGN  
 VF SC SVMHEALHNHYTQKSLSL  
 451 SPG (配列番号83)

30

pMP405 C06 IgG1 agly T299A mp3b K370S/F405K

40

50

## 【化 5 0】

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    I Y R M Q W V R Q A    P G K G L E W V S G  
 5 1    I S P S G G T T W 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 R W S  
 1 0 1   G G S G Y A F D I W    G Q G T M V T V S S    A S T K G P S V  
 F P    L A P S S K S T S G    G T A A L G C L V K  
 1 5 1   D Y F P E P V T V S    W N S G A L T S G V    H T F P A V L Q  
 S S    G L Y S L S S V V T    V P S S S L G T Q T  
 2 0 1   Y I C N V N H K P S    N T K V D K K V E P    K S C D K 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  
 2 5 1   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 N  
 3 0 1   S A 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  
 3 5 1   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  
 4 0 1   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 8 4)

10

20

30

## 【0 1 4 3】

第 2 に、別の F c 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 Ig G 4 C H 2 ドメインの最小のエフェクター機能と Ig G 1 C H 3 ドメインの安定性とを組み合わせたものである Ig G 4 P / Ig G 1 a g l y ( N 2 9 7 Q ) ハイブリッド定常ドメインの中に、m p 4 ヘテロ二量体突然変異 ( S 3 6 4 K / K 4 0 9 L 及び K 3 7 0 S / V 3 9 7 I / F 4 0 5 K ) をクローニングした ( 図 1 2 )。この F c もヒンジ安定化突然変異 S 2 2 8 P を含有する。こうして、このハイブリッド Ig G 4 P / Ig G 1 定常ドメインと、抗 H E R 2 抗体ペルツズマブの可変ドメインと、抗 I G F - 1 R 抗体 C 0 6 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 E f a b としての鎖 A 上または通常の F a b としての鎖 B 上で使用した。抗体を C H O 細胞において再び生成し、プロテイン A 精製材料を O c t e t 結合性試験において使用した ( 図 1 2 )。興味深いことに、精製された二特異性抗体は、 I G F 1 R を最初に装填してその後に抗体及び H E R 2 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 1 2 C )、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。

## 【0 1 4 4】

第 3 に、二特異性技術を M a b - F a b 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 M a b - F a b であり、それは、重鎖の C 末端に融合した F a b を有している Ig G を含有する ( 図 1 3 A )。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、F c 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 F a b 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 E f a b 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 I G F - 1 R 抗体 C 0 6 の E f a b を有している、Ig G 1 としてのトラスツズマブを使用して、M a b - F a b を構築した ( 図 1 3 )。さらに、C 末端に融合したトラスツズマブの E f a b を有している、Ig G 1 としての C 0 6 の逆構築物も作製した。どちらの場合においても、単一の G 4 S ( 配列番号 5 6 ) リンカーを使用して E f a b の重鎖の N 末端において E f a b を Ig G 重鎖の C 末端に繋げた。M a b - F a b を、ま

40

50

たしても C H O 一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、 p M P 7 5 9 / p M P 5 1 9 / p M P 5 1 1 または p M P 7 6 0 / p M P 5 2 8 / p M P 4 0 7 ) 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 S D S - P A G E による分析は、 M a b - F a b の 3 本の鎖が 2 5 0 k D a のタンパク質へと正しく会合したことを示した ( 図 1 3 B ) 。二特異性抗体はさらに、サンドイッチ O c t e t 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 1 3 C ) 。しかしながら、この同時結合性は、 E f a b が C 0 6 であるかトラスツズマブであるかにかかわらず、 E f a b 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。

p M P 7 5 9 トラスツズマブ Ig G 1 - C 0 6 E F a b

10

【化 5 1 - 1 】

1        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  
5 1      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  
1 0 1    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 S V  
F P    L A P S S K S T S G    G T A A L G C L V K

【化 5 1 - 2 】

20

1 5 1    D Y F P E P V T V S    W N S G A L T S G V    H T F P A V L Q  
S S    G L Y S L S S V V T    V P S S S L G T Q T  
2 0 1    Y I C N V N H K P S    N T K V D K K V E P    K S C D K 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  
2 5 1    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 N  
3 0 1    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  
3 5 1    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 Y K T T P P V  
4 0 1    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 L S L S P G S  
4 5 1    G G G G S 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 I Y R M Q    W V R Q A P G K G L  
5 0 1    E W V S G I S P S G    G T T W 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  
5 5 1    C A R W S G G S G Y    A F D I W G Q G T M    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  
6 0 1    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  
6 5 1    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 8 5 )

30

40

p M P 5 1 1 C 0 6 E f a b 軽鎖

50

## 【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 ト拉斯ツズマブ 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 - ト拉斯ツズマブ E f a b

30

40

50

## 【化54】

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    I Y R M Q W V R Q A    P G K G L E W V S G  
 5 1    I S P S G G T T W 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 R W S  
 1 0 1   G G S G Y A F D I W    G Q G T M V T V S S    A S T K G P S V  
 F P    L A P S S K S T S G    G T A A L G C L V K  
 1 5 1   D Y F P E P V T V S    W N S G A L T S G V    H T F P A V L Q  
 S S    G L Y S L S S V V T    V P S S S L G T Q T    10  
 2 0 1   Y I C N V N H K P S    N T K V D K K V E P    K S C D K 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  
 2 5 1   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 N  
 3 0 1   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  
 3 5 1   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 Y K T T P P V  
 4 0 1   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 L S L S P G S    20  
 4 5 1   G G G G S 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  
 5 0 1   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  
 5 5 1   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 T V K I L Q S I C    D G G G H F P P T I  
 6 0 1   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    30  
 6 5 1   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 88 )

## 【0145】

第4に、Fcへ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に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へテロ二量体化方策が必要とされる。mp4 Fcへ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へ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へテロ二量体化が、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。

## 【0146】

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

10

20

30

40

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<sub>a</sub>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<sub>a</sub>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（HSA）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<sub>a</sub>bの重軽鎖の対合が正しいことが必要である。それゆえ、E<sub>f</sub>a<sub>b</sub>軽鎖対合解決策は、二特異性分子への2つのF<sub>a</sub>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、M60-A02抗体及びM13.C06抗体を再び使用し、2つのF<sub>a</sub>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CHO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）。Octet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IgGのF<sub>c</sub>を欠く様々な構成で2つのF<sub>a</sub>bから二特異体を効率的に作製するためにE<sub>f</sub>a<sub>b</sub>軽鎖対合解決策を採用できることを示している。

#### 【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）

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、前記第1  
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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられてい  
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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋  
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2）

前記第1ポリペプチドがF<sub>c</sub>ドメインに直接繋げられている、項目1に記載の抗体。

##### （項目3）

前記第2ポリペプチドがF<sub>c</sub>ドメインに直接繋げられている、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。

##### （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。

(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。

20

(項目 13 )

(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

(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2VH)と第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)とを含み、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)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Fcドメインに直接繋げられている、項目16に記載の抗体。

(項目18)

前記第2ポリペプチドがFcドメインに直接繋げられている、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2VH)と第2軽鎖可変ドメイン(第2VL)とを含み、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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1VH)と第1軽鎖可変ドメイン(第1VL)とを含んでいる第1抗原結合性断片(第1Fab)を含み、前記第1VHと前記第1VLとが対合して第1可変領域を形成しており、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第1VLが、

10

20

30

40

50

ヒト Ig 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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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、

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 ）

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。

（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。

（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 ~

10

20

30

40

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

(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 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げ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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり；さらに、

(ii) 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げ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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げ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、

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ンカーである、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

(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 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 Ig G 抗体を含み、前記全 Ig G 抗体が第 1 CH 3 ドメイン及び第 2 CH 3 ドメインを含むものであり；さらに、

(ii) 第 1 Fab 及び第 2 Fab を含み、

前記第 1 Fab が第 1 重鎖可変ドメイン（第 1 VH ）及び第 1 軽鎖可変ドメイン（第 1 VL ）を含むものであり、前記第 1 VH と前記第 1 VL 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 Fab が第 2 重鎖可変ドメイン（第 2 VH ）及び第 2 軽鎖可変ドメイン（第 2 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 Fab 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 VH が、ヒト免疫グロブリン E ( Ig E ) の CH 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 1 VL が、ヒト Ig E の CH 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VH が、ヒト Ig E の CH 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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2V-L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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり；

前記第1Fabが前記全IgG抗体の前記第1CH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2Fabが前記全IgG抗体の前記第2CH3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1Fabが第1リンカーによって前記全抗体の前記第1CH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2Fabが第2リンカーによって前記全抗体の前記第2CH3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ンカーである、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1CH3ドメイン及び第2CH3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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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 ）直接繋げられているかまたは（ i i ）リンカーを介して繋げ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

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おり；さらに、

( 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、全抗体を含み、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おり、

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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋げ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 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 ) 直接繋げられているかまたは ( i i ) リンカーを介して繋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、前記四価二特異性抗体。

( 項目 7 3 )

前記第 1 F a b が第 1 リンカーによって前記第 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 7 2 に記載の四価抗体。

( 項目 7 4 )

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 7 3 に記載の四価抗体。

( 項目 7 5 )

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 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 7 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 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 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 7 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 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸 9 ~ 1 0 7 を含む、項目 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

( 項目 7 8 )

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 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 7 2 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の四価抗体。

10

20

30

40

50

(項目 7 9)

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 8 0)

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 8 1)

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 8 2)

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 8 3)四価二特異性抗体であって、(i) 第1F<sub>a</sub>b及び第2F<sub>a</sub>bを含み、

前記第1F<sub>a</sub>b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2F<sub>a</sub>b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1IgG CH2ドメイン及び第1IgG CH3ドメインを含んでいる第1重鎖と、第2IgG CH2ドメイン及び第2IgG 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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げ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）直接繋げられているかまたは（ii）リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第1ポリペプチドが前記第1IgG 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2IgG CH2ドメインのN末端に連結されており；

40

前記第1F<sub>a</sub>bが前記第1IgG CH3ドメインのC末端に連結されており、前記第2F<sub>a</sub>bが前記第2IgG 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 8 4)

前記第1F<sub>a</sub>bが第1リンカーによって前記第1IgG CH3ドメインのC末端に連結

50

されており、前記第2F a bが第2リンカーによって前記第2I g G 1 C H 3ドメインのC末端に連結されている、項目83に記載の四価抗体。

(項目85)

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84に記載の四価抗体。

(項目86)

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83～85のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目87)

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7～112と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目83～85のいずれか1項に記載の四価抗体。

10

(項目88)

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7～112を含む、項目83～85のいずれか1項に記載の四価抗体。

(項目89)

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12個のアミノ酸残基が異なっている、項目83～85のいずれか1項に記載の四価抗体。

20

(項目90)

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1I 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のアミノ酸がセリンであり；さらに、

(ii) 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2I 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り、

(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、

30

前記第1I g G 1 C H 3ドメインと前記第2I 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91)

第1I g G 1 C H 2ドメイン及び第2I g G 1 C H 2ドメインをさらに含み、前記第1I g G 1 C H 2ドメインが前記第1I g G 1 C H 3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2I g G 1 C H 2ドメインが前記第2I g G 1 C H 3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかである。項目90に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目92)

2本のポリペプチド鎖を含んでいる第1F 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末端に繋げられており、前記第1ヒンジ領域が前記第1I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋げられている、項目91に記載のヘテロ二量体化モジュール。

40

(項目93)

前記第1I g G 1 C H 3ドメインのC末端と、前記第2I g G 1 C H 2ドメインのN末端に繋げられた第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92に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目94)

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

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 末端に繋げられており、前記 C H 1 ドメインの C 末端が第 1 ヒンジ領域の N 末端に繋げられており、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 ドメインに直接繋げられた前記第 1 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋げられており、( 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 末端に繋げられており、前記 C L ドメインの C 末端が第 2 ヒンジ領域の N 末端に繋げられており、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 ドメインに直接繋げられた前記第 2 I g G 1 C H 2 ドメインの N 末端に繋げられており、( 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、項目 9 1 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(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。

(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 )直接繋げられているかまたは( i i )リンカーを介して繋げ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 )直接繋げられているかまたは( i i )リンカーを介して繋げ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 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 末端に繋げられており、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 末端に繋げられている、項目 9 8 に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(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 末端に繋げられた第 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。

(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 末端に繋げられた第 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)

10

20

30

40

50

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末端が前記CH1ドメインのN末端に繋げられており、前記CH1ドメインのC末端が第1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第1IgG4ヒンジ領域のC末端が、前記第1IgG1CH3ドメインに直接繋げられた前記第1IgG4CH2ドメインのN末端に繋げられており、(ii)前記VLドメインのC末端がCLドメインのN末端に繋げられており、前記CLドメインのC末端が第2IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第2IgG4ヒンジ領域のC末端が、前記第2IgG1CH3ドメインに直接繋げられた前記第2IgG4CH2ドメインのN末端に繋げられており、(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、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1IgG4ヒンジ領域及び前記第2IgG4ヒンジ領域が各々、S228P突然変異(EU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1VLのアミノ酸配列が前記第2VL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、

(ii)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り、

30

(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、前記ヘテロ二量体化モジュール。

## (項目110)

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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げら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末端に直接繋げられており、前記第2IgG1CH2ドメインが前記第2IgG1CH3ドメインのN末端に直接繋げられている、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末端に繋げられており、前記第1ヒンジ領域が前記第1IgG1CH2ドメインのN末端に繋げられている、項目

50

110に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目113)

前記第1IgG1 CH3ドメインのC末端と、第2IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンクーをさらに含む、項目112に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目114)

第2ヒンジ領域を介して前記第2IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2Fabをさらに含む、項目112に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目115)

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末端に繋げられており、前記CH1ドメインのC末端が第1ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第1ヒンジ領域のC末端が、前記第1IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた前記第1IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられており、(ii)前記VLドメインのC末端が前記CLドメインのN末端に繋げられており、前記CLドメインのC末端が前記第2ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第2ヒンジ領域のC末端が、前記第2IgG1 CH3ドメインに直接繋げられた前記第2IgG1 CH2ドメインのN末端に繋げられており、(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、項目110に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目116)

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110に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目117)

前記第1VLのアミノ酸配列が前記第2VLのアミノ酸配列と同一である、項目116に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目118)

第1IgG4 CH2ドメイン及び第2IgG4 CH2ドメインをさらに含み、前記第1IgG4 CH2ドメインが前記第1IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンクーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2IgG4 CH2ドメインが前記第2IgG1 CH3ドメインのN末端に(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンクーを介して繋げら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。

(項目119)

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1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第1IgG4ヒンジ領域が前記第1IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられている、項目118に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目120)

前記第1IgG4ヒンジ領域がS228P突然変異(EU付番)を含む、項目119に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目121)

前記第1IgG1 CH3ドメインのC末端と、前記第2IgG4 CH2ドメインのN末端に繋げられた第2IgG4ヒンジ領域のN末端とを繋げるリンクーをさらに含む、項目118に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目122)

前記第2IgG4ヒンジ領域がS228P突然変異(EU付番)を含む、項目121に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

20

30

40

50

(項目123)

第2IgG4ヒンジ領域を介して前記第2IgG4CH2ドメインのN末端に繋げられた第2Fabをさらに含む、項目119に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目124)

前記第2IgG4ヒンジ領域がS228P突然変異(EU付番)を含む、項目123に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目125)

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末端が前記CH1ドメインのN末端に繋げられており、前記CH1ドメインのC末端が第1IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第1IgG4ヒンジ領域のC末端が、前記第1IgG1CH3ドメインに直接繋げられた前記第1IgG4CH2ドメインのN末端に繋げられており、(ii)前記VLドメインのC末端が前記CLドメインのN末端に繋げられており、前記CLドメインのC末端が第2IgG4ヒンジ領域のN末端に繋げられており、前記第2IgG4ヒンジ領域のC末端が、前記第2IgG1CH3ドメインに直接繋げられた前記第2IgG4CH2ドメインのN末端に繋げられており、(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、項目118に記載のヘテロ二量体化モジュール。

10

(項目126)

前記第1IgG4ヒンジ領域及び前記第2IgG4ヒンジ領域が各々、S228P突然変異(EU付番)を含む、項目125に記載のヘテロ二量体化モジュール。

20

(項目127)

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118に記載のヘテロ二量体化モジュール。

(項目128)

前記第1VLのアミノ酸配列が前記第2VLのアミノ酸配列と同一である、項目127に記載のヘテロ二量体化モジュール。

30

(項目129)二特異性抗体であって、

(i) 第1VH及び第1VLを含み、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、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋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おり；

40

(ii) 第2VH及び第2VLを含み、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記CH1ドメインと前記CLドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、(iii)ヘテロ二量体化モジュールであって、

(a) 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

50

1 Ig G 1 CH 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

(b) 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 Ig G 1 CH 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り、

(a) 及び (b) において前記アミノ酸位置が EU 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 130)

二特異性抗体であって、

(i) 第 1 VH 及び第 1 VL を含み、前記第 1 VH と前記第 1 VL 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 VH がヒト免疫グロブリン E (IgE) の CH 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 1 VL が、ヒト IgE の CH 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) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋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おり；そして、

(ii) 第 2 VH 及び第 2 VL を含み、前記第 2 VH と前記第 2 VL 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 VH が CH 1 ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第 2 VL が CL ドメインに (i) 直接繋げられているかまたは (ii) リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記 CH 1 ドメインと前記 CL ドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、

(iii) ヘテロ二量体化モジュールであって、

(a) 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 Ig G 1 CH 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

(b) 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 Ig G 1 CH 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、

(a) 及び (b) において前記アミノ酸位置が EU 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 131)

2 つの Ig G 1 CH 2 ドメインをさらに含む、項目 129 または項目 130 に記載の二特異性抗体。

(項目 132)

2 つの Ig G 4 CH 2 ドメインをさらに含む、項目 129 または項目 130 に記載の二特異性抗体。

(項目 133)

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 VH と前記第 1 ポリペプチドと前記第 1 Ig G 1 CH 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 134)

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 VH と前記第 1 ポリペプチドと前記第 2 Ig G 1 CH 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 135)

単一のポリペプチド鎖が前記第 1 VL と前記第 2 ポリペプチドと前記第 1 Ig G 1 CH

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)

单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)

別の单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)

別の单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。

10

(項目139)

別の单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)

別の单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。

20

(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。

30

(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。

40

(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、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

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129～140または項目142のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目151)

二特異性抗体であって、

(i) 第1VH及び第1VLを含み、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、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋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おり；そして、

(ii) 第2VH及び第2VLを含み、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記CH1ドメインと前記CLドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、

(iii) ヘテロ二量体化モジュールであって、

(a) 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1IgG1 CH3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のアミノ酸がセリンであり；さらに

(b) 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2IgG1 CH3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り、

(a)及び(b)において前記アミノ酸位置がEU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152)

二特異性抗体であって、

(i) 第1VH及び第1VLを含み、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、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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げ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)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋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おり；

(ii) 第2VH及び第2VLを含み、前記第2VHと前記第2VL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2VHがCH1ドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リン

10

20

30

40

50

カーリーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記第2VLがCLドメインに(i)直接繋げられているかまたは(ii)リンカーを介して繋げられているかのどちらかであり、前記CH1ドメインと前記CLドメインとが対合して二量体を形成しており；さらに、(iii)ヘテロ二量体化モジュールであって、

(a)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

(b)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り、

(a)及び(b)において前記アミノ酸位置がEU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153)

2つのIgG1CH2ドメインをさらに含む、項目151または項目152に記載の二特異性抗体。

(項目154)

2つのIgG4CH2ドメインをさらに含む、項目151または項目152に記載の二特異性抗体。

(項目155)

単一のポリペプチド鎖が前記第1VHと前記第1ポリペプチドと前記第1IgG1CH3ドメインとを含む、項目151～154のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目156)

単一のポリペプチド鎖が前記第1VHと前記第1ポリペプチドと前記第2IgG1CH3ドメインとを含む、項目151～154のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目157)

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1IgG1CH3ドメインとを含む、項目151～154のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目158)

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151～154のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目159)

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155に記載の二特異性抗体。

(項目160)

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156に記載の二特異性抗体。

(項目161)

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157に記載の二特異性抗体。

(項目162)

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158に記載の二特異性抗体。

(項目163)

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151～162のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

(項目164)

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151～162のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

10

20

30

40

50

## (項目 165)

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151～162のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

## (項目 166)

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12個のアミノ酸残基が異なっている、項目151～162のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

## (項目 167)

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151～162のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

10

## (項目 168)

(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、

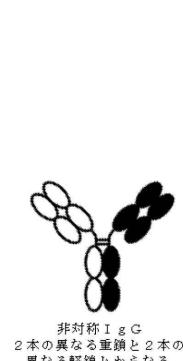
20

項目151～162または項目166のいずれか1項に記載の二特異性抗体。

## 【図面】

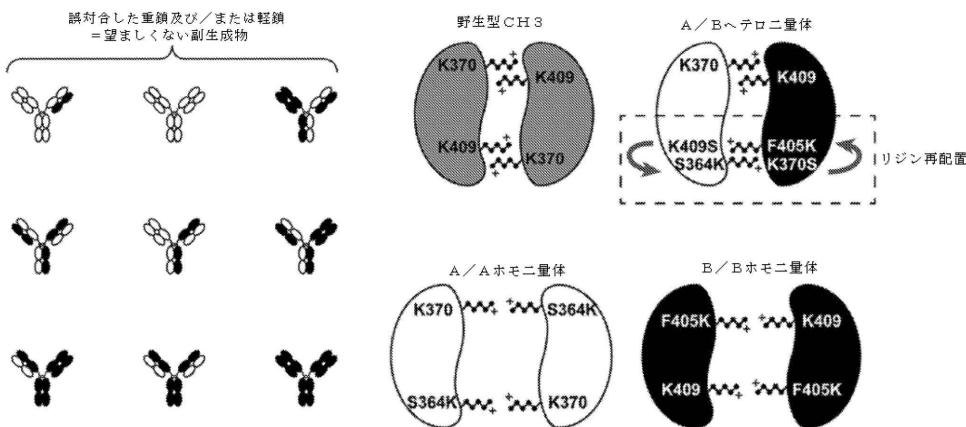
## 【図1】

【図1】



## 【図2】

【図2】



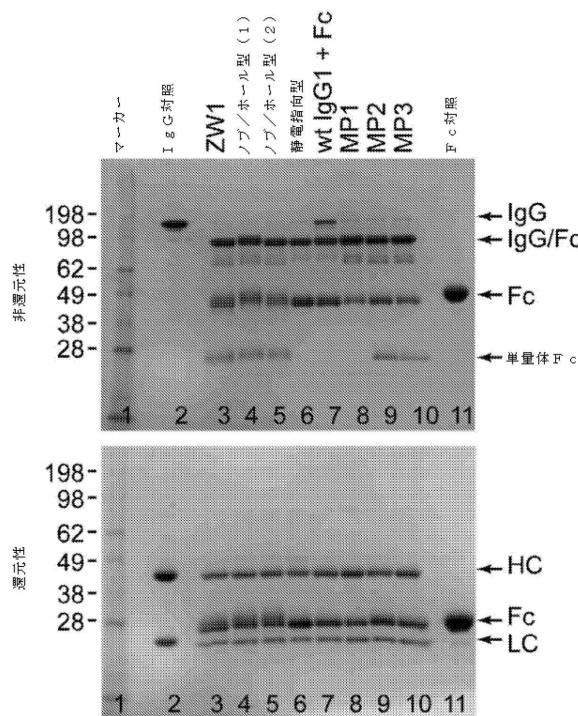
30

40

50

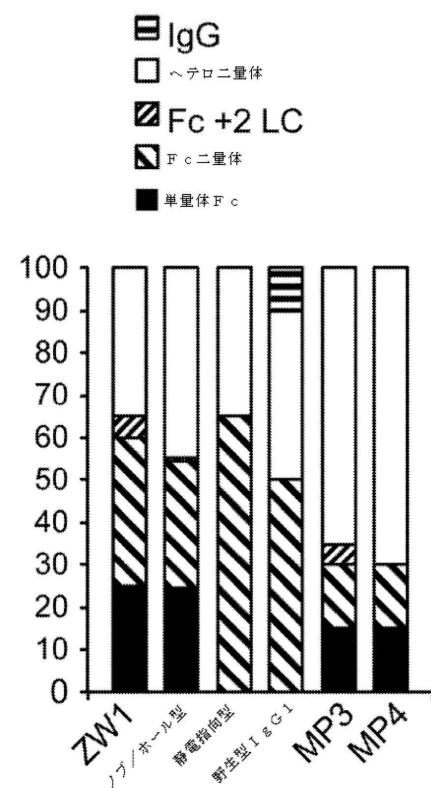
【図 3 A】

【図 3 A】



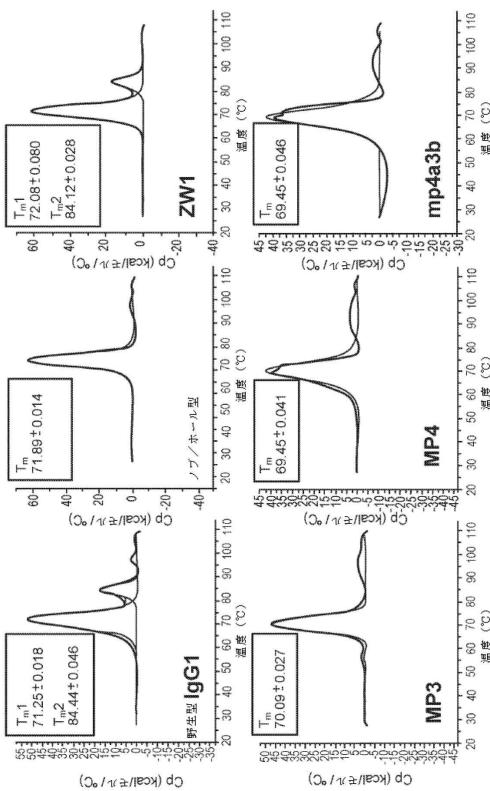
【図 3 B】

【図 3 B】



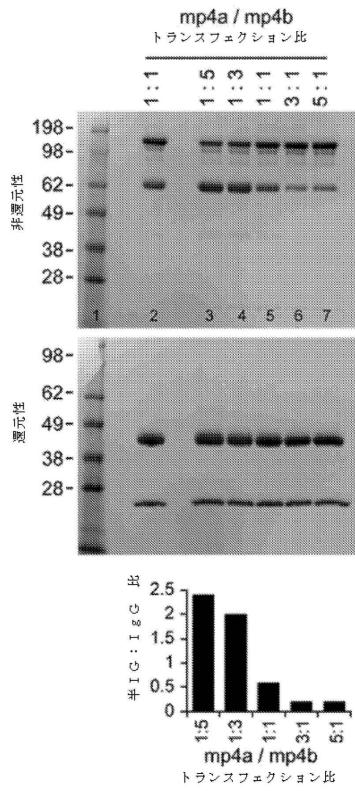
【図 3 C】

【図 3 C】



【図 4 A】

【図 4 A】



10

20

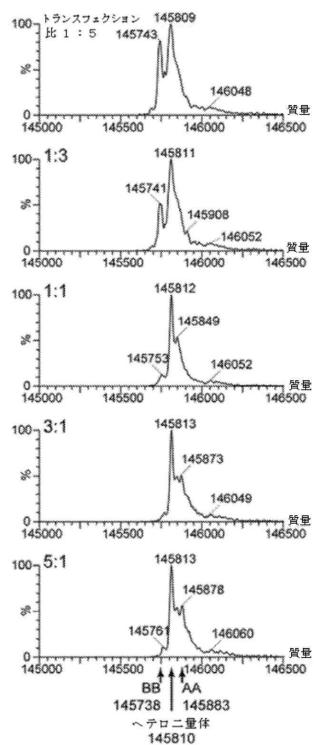
30

40

50

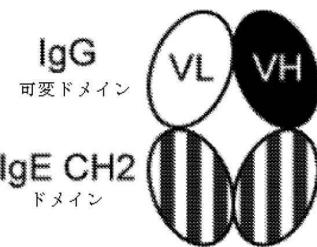
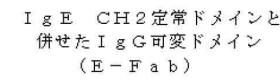
### 【図4B】

【図4B】



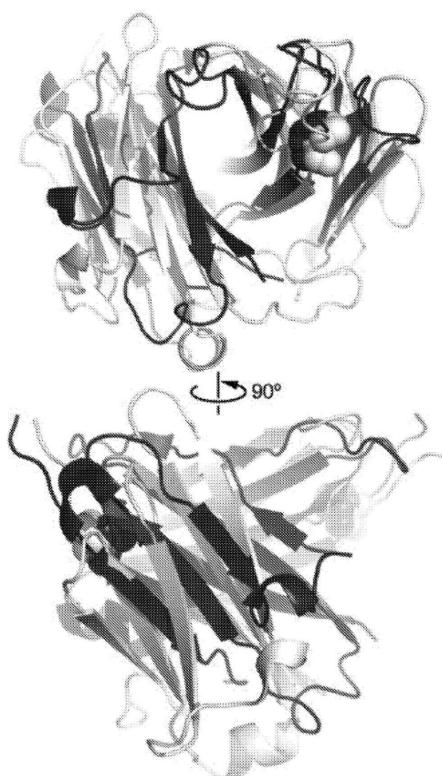
【図5A】

【図5A】



【図 5 B】

[図 5 B]



〔図5C〕

【図5C】

	A					B				
	1	10	15	16	23	26	27	38		
CH1 / ヘンジ	7654321	.....	[123]	.....	.....	.....	.....	.....		
Cカッパ	....ASTKGPSVFVPLAPSSKSTS...	GGTAALGCLVK	DYFP..EPVT							
IgE CH2	....RTVAAVPVFIPPPSDEQLK...	SGTASVCLVLNS	NFYP..REAK							
EFab HC	VCSRDFPTPEVKILQSSQCDGGGHF.	PPTIQLLCLVS	GYTP..GTIN							
Efab LC	....ASTKGPKVILQSSQCDGGGHF.	PPTIQLLCLVS	GYTP..GTIQ							
	....RTVAAVPVFVPLAPSSKSTS...	GGTAALGCLVK	DYFP..EPVT							

C → D → E →  
 39 45 77 84 85 89 96  
 |.....|1234567|.....|123454321|.....|12  
 CH1 / ヒンジ  
 C カッパ  
 IgE CH2  
 Efab HC  
 Efab LC

	F		G		
	97	104	105	117	118
CH1 / ヒンジ	.....	.....	.....	.....	.....
Cカッパ	GTQTYIC	NVNHHKP.	SNTKV	DKKVVPEKSKDTHTCP	PCP
IgE CH2	EKKHVYAC	EVTHHQG...	LSSPV	TKSFNRGE	C
Efab HC	LSDRTTYTC	QVTYQ...	GHTF	EDSTKK	CA
Efab LC	LSDRTTYTC	QVTYQ...	GHTF	EDSTKK	CA

10

20

30

40

50

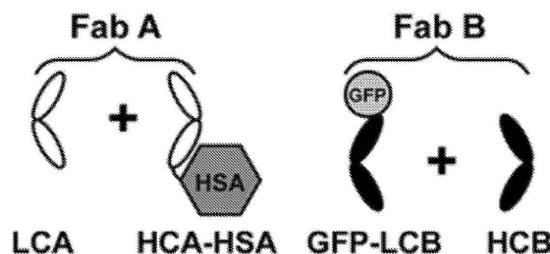
【図 5 D】

【図 5 D】

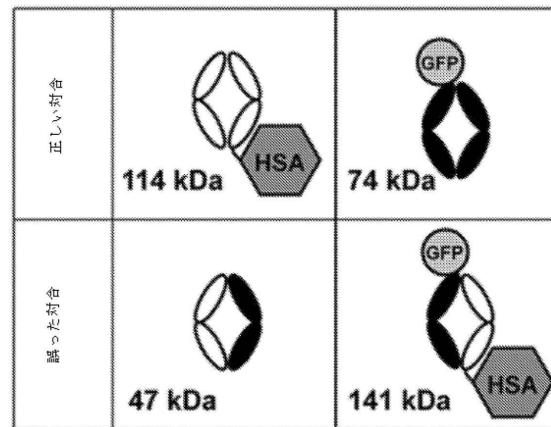
ヒト VCSRDTTPPTVKILQSSCDGGGHPPTIQLLCILVSGYTPGTTINITWL-EDGQVMDVDSL-  
チンパンジー .....V.....  
マウス ..NI.E..LEL.H...PNA-HS...Y.FY.HILNDVSVS..MD.RELT.TLAQ-  
ラット ..NI.K..DL.H...PNA-HS...Y.F.Y.HIQNDVS.H..MD.RKLYETRAQ-  
ウサギ A..VS...A.RLPH...PRENDTY.V.....I.....D.EV...V...KDPNNMF.I  
ヒト TASTTQEGELASTQELTISQKHNLSDRTTYTCQVITYQGHTFEDSTRKCA  
チンパンジー ...A.....  
マウス ..VLIKE..K...C.K.NITRQQ.M.ES.F..K.S..VDYLAH.RR.  
ラット NVLKE..K...Y.R.NIT.QQ.M.ES.F..K.S..ENYNAH.RR.S  
ウサギ ..QPR..K...H..NIT.GE.A.K....R.A..EL..AHARE.

【図 6 A】

【図 6 A】



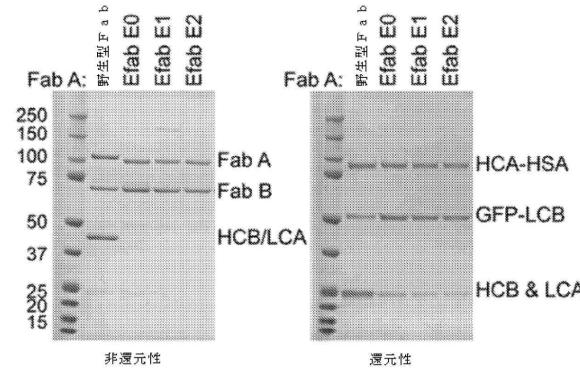
10



20

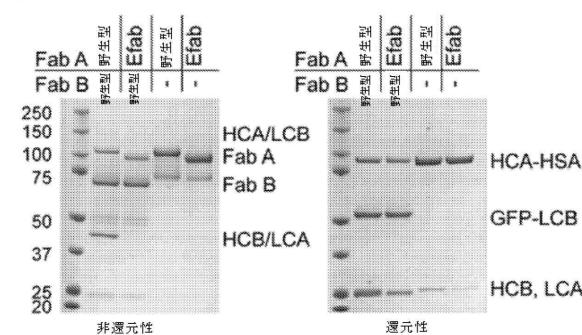
【図 6 B】

【図 6 B】



【図 6 C】

【図 6 C】



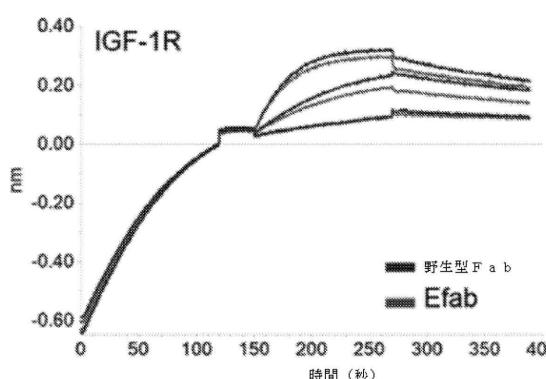
30

40

50

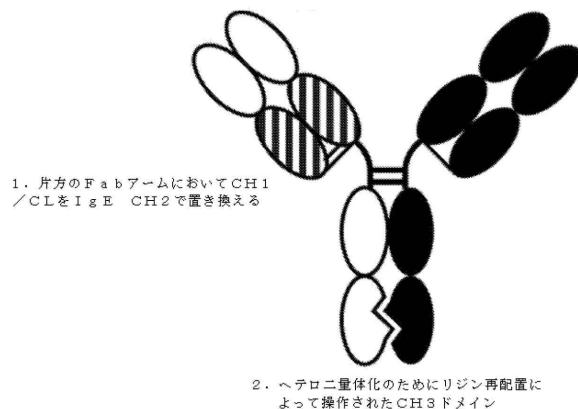
【図 6 D】

【図 6 D】



【図 7】

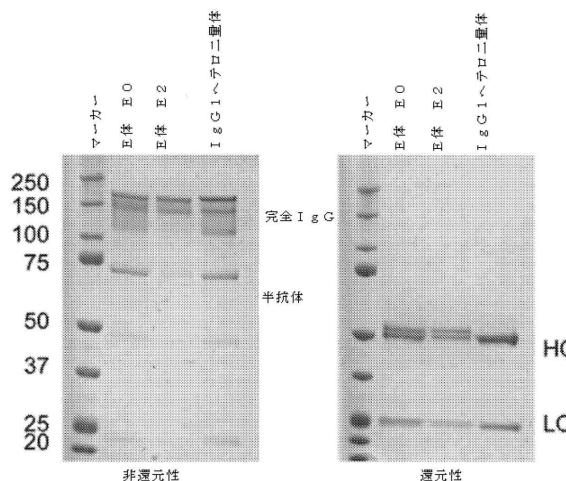
【図 7】



10

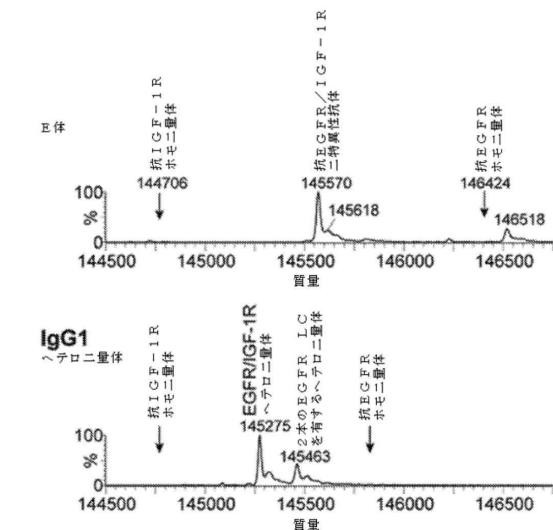
【図 8 A】

【図 8 A】



【図 8 B】

【図 8 B】



20

30

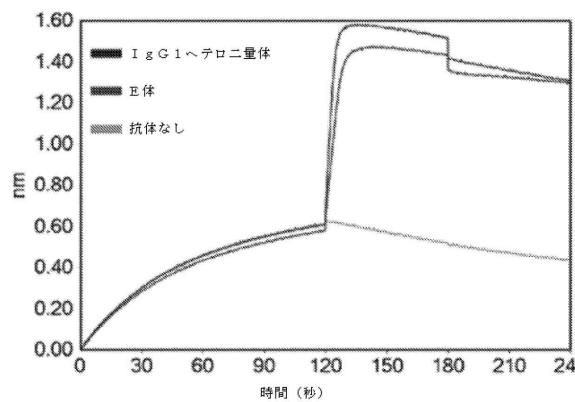
40

50

【図 8 C】

【図 8 C】

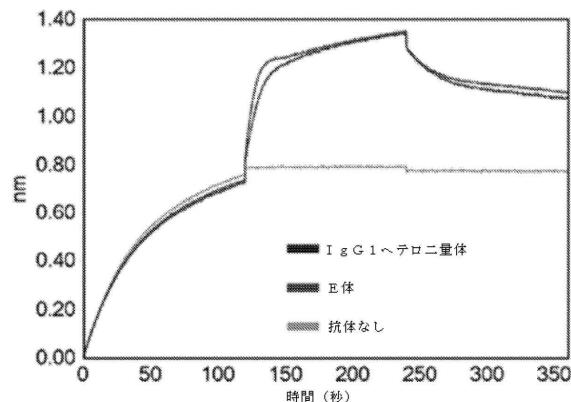
EGFR 結合性



【図 8 D】

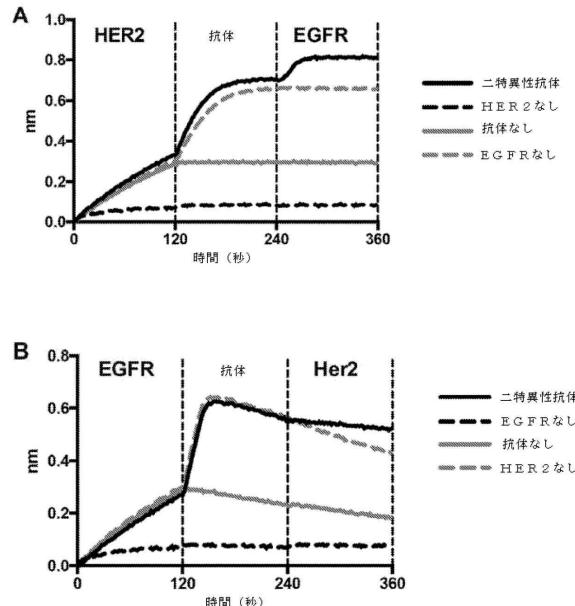
【図 8 D】

IGF-1R 結合性



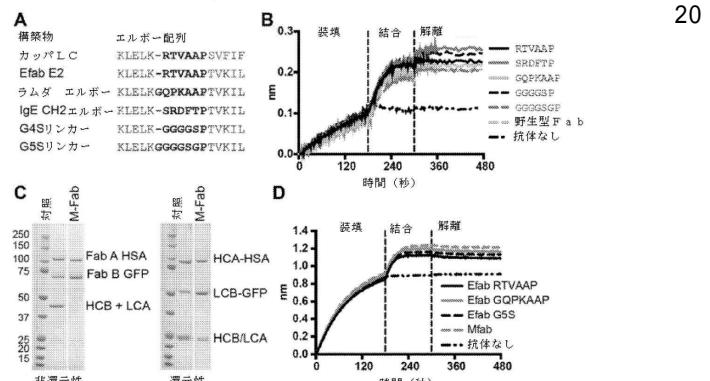
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】



10

20

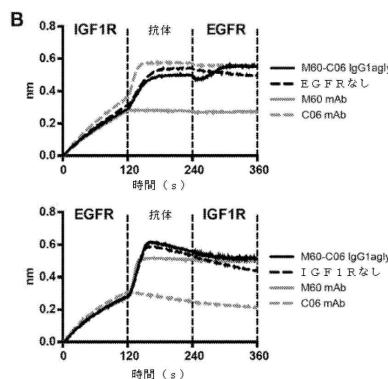
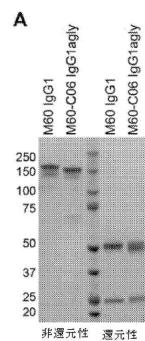
30

40

50

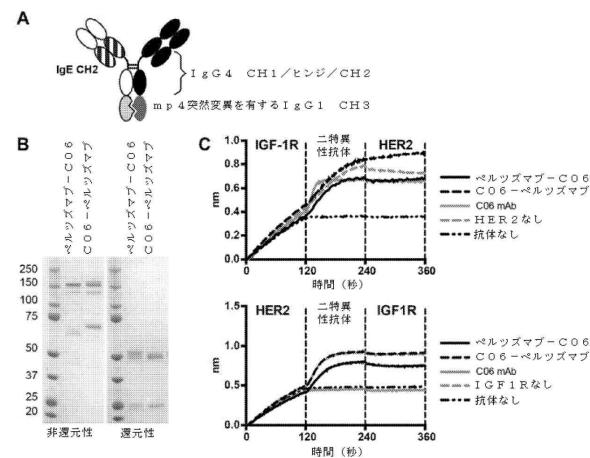
【図 1 1】

【図 1 1】



【図 1 2】

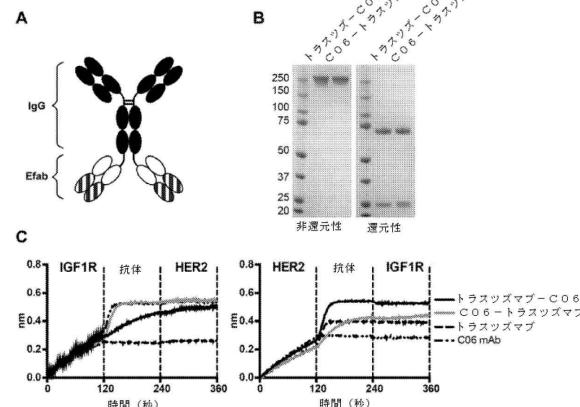
【図 1 2】



10

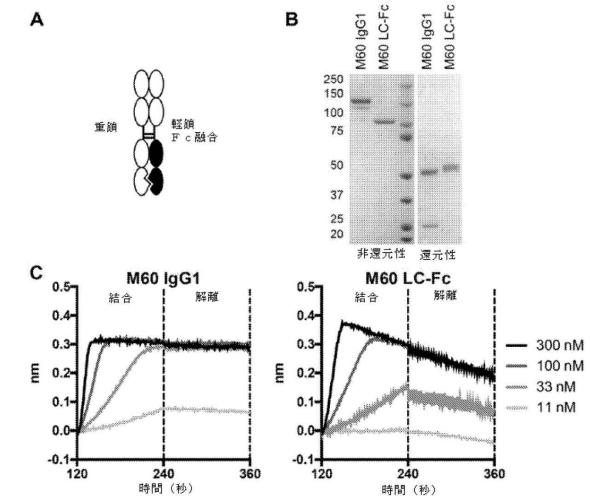
【図 1 3】

【図 1 3】



【図 1 4】

【図 1 4】



20

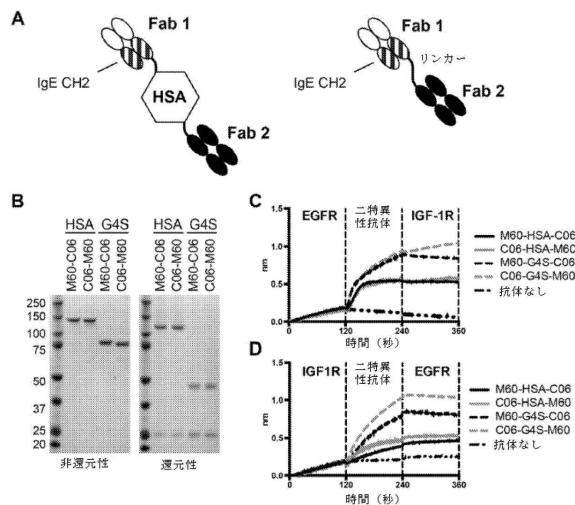
30

40

50

## 【図 1 5】

【図 1 5】



## 【配列表】

0007138046000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表2015-514405 (JP, A)

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

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

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB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 )