(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-542142
(P2024-542142A)
(43)公表日　令和6年11月13日(2024.11.13)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/18	*(2006.01)*	C07K	16/18		4B064
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46		4C084
A61K 38/02	*(2006.01)*	A61K	38/02		4C085
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	4H045
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全113頁）　最終頁に続く

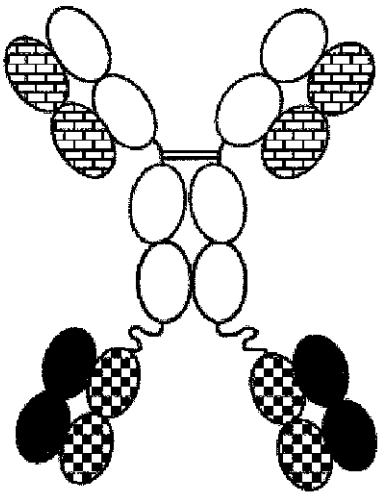
(21)出願番号　特願2024-526902(P2024-526902)
(86)(22)出願日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月3日(2024.7.3)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/080860
(87)国際公開番号　WO2023/079101
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　2115925.6
(32)優先日　令和3年11月5日(2021.11.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2204539.7
(32)優先日　令和4年3月30日(2022.3.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2212801.1
最終頁に続く

(71)出願人　503211529
アリゲーター・バイオサイエンス・アーベー
スウェーデン国・２２３・８１・ルンド・シュレヴェーゲン・２・メディコン・ヴィレッジ
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　ローラ・フォン・シャンツ
スウェーデン・２２３・８１・ルンド・シュレヴェーゲン・２・メディコン・ヴ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新規ポリペプチド

(57)【要約】
本発明は、製造中に免疫原性を低減し、かつ／又は純度を改善させる新しい変異を含むポリペプチド（特に、二重特異性抗体）に関する。

Figure 11



【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原に対する特異性を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、重鎖領域及び軽鎖領域を含み、
ｉ．前記ポリペプチドが、前記重鎖領域と前記軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又は前記ポリペプチドの免疫原性を増加させ、
ｉｉ．前記ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異によって引き起こされる免疫原性応答及び／又は免疫原性を誘導する前記予測されたリスクを低減又は回避するための１つ以上の二次変異を含む、ポリペプチド。
【請求項２】
前記免疫原性の前記増加が、一次変異対照ポリペプチドの予測された免疫原性リスクと比較した場合のより高い予測された免疫原性リスク及び／又は一次変異対照ポリペプチドの前記免疫原性と比較した場合のより高い免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、前記一次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異を含まない、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
前記一次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異が導入される前の前記ポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記免疫原性の前記低減が、第１の二次変異対照ポリペプチドの前記予測された免疫原性リスクと比較した場合のより低い予測された免疫原性リスク、及び／又は第１の二次変異対照ポリペプチドの前記免疫原性と比較した場合のより低い免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、前記第１の二次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異を含むが、前記１つ以上の二次変異を含まない、請求項１～３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記第１の二次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の二次変異が導入される前の前記一次変異のうちの１つ以上を含む前記ポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項４に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記免疫原性の回避が、第２の二次変異対照ポリペプチドの前記予測された免疫原性リスクと比較した場合の同様の若しくは同じ予測された免疫原性リスク、及び／又は第２の二次変異対照ポリペプチドの前記免疫原性と比較した場合の同様の若しくは同じ免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、前記第２の二次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異又は前記１つ以上の二次変異を含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記第２の二次変異対照ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異が導入される前及び前記１つ以上の二次変異が導入される前の前記ポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項６に記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記免疫原性が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）依存性免疫原性及び／又はＴ細胞依存性免疫原性である、請求項１～７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９】
前記二次変異が、ＭＨＣクラスＩＩ及び／又はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）への前記ポリペプチドの結合を低減又は回避する、請求項１～８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
前記ＡＰＣが、樹状細胞である、請求項８又は９に記載のポリペプチド。

【請求項１１】
前記重鎖領域が、ＣＨ１ドメインを含み、一次変異が、前記ＣＨ１ドメインの１８７位にある（ＥＵ番号付けシステムによる）、請求項１～１０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
前記ＣＨ１ドメインの１８７位における前記一次変異が、表Ｄから選択されるアミノ酸配列のＸ位にある、請求項１１に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記一次変異が、Ｔ１８７Ｅ／Ｄである、請求項１１又は１２に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記軽鎖領域が、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインを含み、一次変異が、前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１４位にある（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、請求項１～１３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位における前記一次変異が、表Ｂから選択されるアミノ酸配列のＸ位にある、請求項１～１４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
前記一次変異が、Ｔ／Ｓ１１４Ａである、請求項１～１５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記重鎖領域が、ＣＨ１ドメインを含み、前記二次変異が、前記ＣＨ１ドメインの１８０位、１８３位、及び／又は１８８位にある、請求項１～１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記軽鎖領域が、ＣＫａｐｐａ又はＣｌａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインを含み、前記二次変異が、前記ＣＫａｐｐａ又はＣｌａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位及び／又は１０９位にある、請求項１～１７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記軽鎖領域が、ＶＬドメインを含み、前記二次変異が、前記ＶＬドメインの１２６位にある、請求項１～１８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
前記二次変異が、以下の位置：前記ＣＨ１ドメインの１８０位、前記ＣＨ１ドメインの１８３位、前記ＣＨ１ドメインの１８８位、前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位、前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位、及び前記ＶＬドメインの１２６位、のうちの１つ以上（好ましくは、２つ以上）にある、請求項１～１９のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位の前記ＣＨ１ドメインの前記二次変異が、X^{180}位にあり、かつ／又は１８３位が、X^{183}位にあり、かつ／又は１８８位が、X^{188}位にある、請求項１～２０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項２２】
前記二次変異が、Ｙ１８０Ａ、Ｙ１８０Ｇ、Ｙ１８０Ｉ、Ｙ１８０Ｎ、Ｙ１８０Ｓ、Ｙ１８０Ｔ、Ｙ１８０Ｖ、若しくはＹ１８０Ｗ、及び／又はＳ１８３Ｎ若しくはＳ１８３Ｔ、及び／又はＶ１８８Ｇである、請求項１～２１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項２３】
表Ｅから選択される前記アミノ酸配列において、前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位の前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの前記二次変異が、

Ｘ１０９位にあり、かつ／又は前記ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位の前記二次変異が、Ｘ１１１位にある、請求項１～２２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２４】

前記二次変異が、Ａ１１１Ｒ、Ａ１１１Ｔ、Ａ１１１Ｗ、若しくはＡ１１１Ｖ、及び／又はＴ１０９Ｐである、請求項１～２３のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２５】

前記二次変異が、Ｉ１２６Ａ、Ｉ１２６Ｇ、Ｉ１２６Ｈ、Ｉ１２６Ｎ、Ｉ１２６Ｐ、Ｉ１２６Ｑ、Ｉ１２６Ｓ、又はＩ１２６Ｔである（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、請求項１～２４のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２６】

前記ポリペプチドが、プロテインＡ結合部位を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含み、前記ＶＨドメインが、前記プロテインＡ結合部位への前記プロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２７】

前記変異が、６５位にある（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、請求項２６に記載のポリペプチド。

【請求項２８】

前記変異が、Ｔ６５Ｅ又はＴ６５Ａ又はＴ６５Ｉである、請求項２６又は２７に記載のポリペプチド。

【請求項２９】

抗原に対する特異性を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、プロテインＡ結合部位を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含み、前記ＶＨドメインが、前記プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む、ポリペプチド。

【請求項３０】

前記ＶＨが、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来する、請求項２９に記載のポリペプチド。

【請求項３１】

前記変異が、前記ＶＨドメインの６５位にある（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、請求項２９又は３０に記載のポリペプチド。

【請求項３２】

前記変異が、Ｔ６５Ｅ又はＴ６５Ａ又はＴ６５Ｉである、請求項２９～３１のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３３】

前記ポリペプチドが、単一特異性ポリペプチドである、請求項１～３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

前記標的抗原が、免疫調節因子又は腫瘍細胞関連抗原（ＴＡＡ）である、請求項３３に記載のポリペプチド。

【請求項３５】

前記免疫調節因子が、チェックポイント分子である、請求項３４に記載のポリペプチド。

【請求項３６】

前記チェックポイント分子が、ＣＤ４０などの刺激性チェックポイント分子である、請求項３５に記載のポリペプチド。

【請求項３７】

前記ＴＡＡが、５Ｔ４、ＥｐＣＡＭ、及び／又はＣＥＡＣＡＭ５である、請求項３４に記載のポリペプチド。

【請求項３８】

前記ポリペプチドが、二重特異性ポリペプチドである、請求項１～３２のいずれか一項

に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
前記ポリペプチドが、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、前記免疫グロブリン分子が、第１の重鎖領域及び第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する少なくとも１つのＦａｂ断片であって、前記Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
前記第２の軽鎖領域が、前記第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
前記１つ以上の一次変異が、前記第１の重鎖領域と前記第１の軽鎖領域との会合を促進し、かつ／又は前記第２の重鎖領域と前記第２の軽鎖領域との会合を促進する、請求項３８に記載のポリペプチド。
【請求項４０】
前記免疫グロブリン分子が、前記第１の重鎖ポリペプチドの２つのコピー及び／又は前記第１の軽鎖ポリペプチドの２つのコピーを含む、請求項３９に記載のポリペプチド。
【請求項４１】
前記抗体が、（ｂ）に記載の２つのＦａｂ断片を含む、請求項３９又は４０に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
前記免疫グロブリン分子が、前記第１の重鎖ポリペプチドの２つのコピー及び前記第１の軽鎖ポリペプチドの２つのコピーを含み、
前記二重特異性抗体が、（ｂ）に記載の２つのＦａｂ断片を更に含み、
前記第１のＦａｂ断片が、前記Ｆａｂ断片の前記軽鎖ポリペプチドを介して、前記第１の重鎖ポリペプチドの第１のコピーのＣ末端に融合され、
前記第２のＦａｂ断片が、前記Ｆａｂ断片の前記軽鎖ポリペプチドを介して、前記第１の重鎖ポリペプチドの第２のコピーのＣ末端に融合される、請求項３９～４１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４３】
前記第１の重鎖領域及び／又は第２の重鎖領域が、ＣＨ１ドメインを含み、前記ＣＨ１ドメインが、前記一次変異及び二次変異を含む、請求項４２のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４４】
前記一次変異及び二次変異が、請求項１～２５のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項４２又は４３に記載のポリペプチド。
【請求項４５】
前記第１の重鎖領域及び／又は第２の重鎖領域、好ましくは前記第２の重鎖領域が、ＶＨドメインを含み、前記ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位を含み、前記ＶＨドメインが、前記プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む、請求項４２～４４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項４６】
前記変異が、請求項２７又は２８に定義されるとおりである、請求項４５に記載のポリペプチド。
【請求項４７】
二重特異性抗体であって、前記二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、前記免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、前記Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
前記第２の軽鎖領域が、前記第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
前記ポリペプチドが、前記重鎖領域と前記軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上

の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又は前記ポリペプチドの前記免疫原性を増加させ、
前記ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異によって引き起こされる免疫原性応答及び／又は免疫原性を誘導する前記予測されたリスクを低減又は回避するための１つ以上の二次変異を含む、二重特異性抗体。
【請求項４８】
前記一次変異及び二次変異が、請求項１～２５のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項４７に記載のポリペプチド。
【請求項４９】
二重特異性抗体であって、前記二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、前記免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、前記Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
前記第２の軽鎖領域が、前記第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
前記第２の重鎖領域が、ＶＨドメインを含み、前記ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位を含み、前記ＶＨドメインが、前記プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む、二重特異性抗体。
【請求項５０】
変異が、請求項２７又は２８に定義されるとおりである、請求項４９に記載のポリペプチド。
【請求項５１】
二重特異性抗体であって、前記二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、前記免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、前記Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
前記第２の軽鎖領域が、前記第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
前記ポリペプチドが、前記重鎖領域と前記軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又は前記ポリペプチドの前記免疫原性を増加させ、
前記ポリペプチドが、前記１つ以上の一次変異によって引き起こされる免疫原性応答及び／又は免疫原性を誘導する前記予測されたリスクを低減又は回避するための１つ以上の二次変異を含み、
前記第２の重鎖領域が、ＶＨドメインを含み、前記ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位を含み、前記ＶＨドメインが、前記プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は停止する変異を含む、二重特異性抗体。
【請求項５２】
前記一次変異及び二次変異が、請求項１～２５に定義されるとおりである、請求項５１に記載のポリペプチド。
【請求項５３】
前記プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は停止する前記変異が、請求項２６又は２７に定義されるとおりである、請求項５１又は５２に記載のポリペプチド。
【請求項５４】
前記第１の抗原及び／又は第２の抗原が、免疫調節因子である、請求項３９～５３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５５】

前記免疫調節因子が、チェックポイント分子である、請求項５４に記載のポリペプチド。
【請求項５６】
前記チェックポイント分子が、ＣＤ４０などの刺激性チェックポイント分子である、請求項５５に記載のポリペプチド。
【請求項５７】
前記第１の抗原及び／又は第２の抗原が、ＴＡＡである、請求項３９～５６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５８】
前記ＴＡＡが、ＥｐＣＡＭ、５Ｔ４、又はＣＥＡＣＡＭ５である、請求項５７に記載のポリペプチド。
【請求項５９】
請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチドと、少なくとも１つの薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。
【請求項６０】
医薬に使用するための、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド又は請求項５９に定義される組成物。
【請求項６１】
がんの治療又は予防に使用するための、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド又は請求項５９に定義される組成物。
【請求項６２】
治療を必要とする個体においてそれを行う方法であって、前記個体に、治療有効量の、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド又は請求項５９に定義される組成物を投与することを含む、方法。
【請求項６３】
がんの治療又は予防を必要とする個体においてそれを行う方法であって、前記個体に、治療有効量の、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド又は請求項５９に定義される組成物を投与することを含む、方法。
【請求項６４】
治療を必要とする個体の治療のための医薬品の製造における使用のための、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド。
【請求項６５】
がんの治療又は予防のための医薬品の製造における使用のための、請求項１～５８のいずれか一項に定義されるポリペプチド。
【請求項６６】
説明及び／又は実施例及び／又は図を参照して本明細書に説明される使用のための、ポリペプチド及び／又は組成物及び／又は二重特異性抗体及び／又は方法及び／又は治療方法及び／又はポリペプチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、製造中に免疫原性を低減し、かつ／又は純度を改善させる新しい変異を含むポリペプチド（特に、二重特異性抗体）に関する。
【背景技術】
【０００２】
がんは、先進国において早死の主な原因である。がんの免疫療法の目的は、腫瘍細胞に対して効果的な免疫応答を仕掛けることである。これは、例えば、腫瘍抗原に対する寛容性を破壊すること、抗腫瘍免疫応答を増強すること、及び腫瘍部位における局所的なサイトカイン応答を刺激することによって達成され得る。長期にわたる抗腫瘍免疫応答の主要なエフェクター細胞は、活性化された腫瘍特異的エフェクターＴ細胞である。活性化エフ

ェクターＴ細胞の強力な拡張は、免疫応答を腫瘍に対して再指向することができる。これに関連して、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、抗腫瘍免疫を阻害する役割を果たす。したがって、Ｔｒｅｇを枯渇させるか、阻害するか、元に戻すか、又は不活性化することにより、抗腫瘍効果を提供し、腫瘍微小環境における免疫抑制を元に戻すことができる。更に、例えば、樹状細胞によるエフェクターＴ細胞の不完全な活性化は、Ｔ細胞アネルギーを引き起こす可能性があり、それは、不十分な抗腫瘍応答をもたらすのに対し、樹状細胞による適切な誘導は、活性化エフェクターＴ細胞の強力な拡張を生じて、免疫応答を腫瘍に対して再指向することができる。加えて、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、下方制御されたヒト白血球抗原（ＨＬＡ）の発現で腫瘍細胞を攻撃することによって、また、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を誘導することによって、腫瘍免疫学的に重要な役割を果たす。したがって、ＮＫ細胞を刺激することにより、腫瘍の成長をも低減し得る。

【０００３】

治療用ポリペプチド（特に、二重特異性抗体）は、細胞の二重標的化を可能にするため、がん治療に有用である。例えば、二重特異性抗体は、腫瘍細胞付近の宿主免疫細胞を活性化することが可能であり得、したがって、１つの抗原のみを標的とする既存の単一特異性薬物の代替物である。

【０００４】

二重特異性抗体は、モノクローナル抗体と比較して、生成がより困難である。多くの異なる形式が発明されており、全ての形式は、異なる長所及び制限を有する。

【０００５】

二重特異性抗体の開発に対する課題は、治療用途への好適性を低減させるであろう免疫原性の増加につながるいかなる修飾（特に、変異）も回避しながら、良好な収率及び純度で産生するために実用的である構造及びアミノ酸配列を設計することである。

【０００６】

このような背景を踏まえて、本発明者らは、驚くべきことに、製造中に免疫原性を低減させ、かつ／又は純度を改善させるポリペプチド変異を特定した。

【発明の概要】

【０００７】

以下の発明は、ポリペプチド（特に、好ましくは、図１１に示されているＲＵＢＹ形式構造の二重特異性抗体）の新しい変異を提供する。これらの変異（本明細書に記載の「二次変異」）は、抗体に導入された他の変異（本明細書に記載の「一次変異」）の免疫原性を更に低減し、かつ／又はポリペプチドの純度及び製造の容易さを改善する（本明細書に記載の「改善された純度変異」）。

【０００８】

本明細書に記載の新しい変異は、それらが適用されるポリペプチドの特性を更に大幅に改善することに留意すべきであり、ポリペプチド自体は、すでに良好な免疫原性プロファイル及び製造の容易さを有し得る。例えば、新しい変異が適用される例示的なポリペプチドは、すでに以前から多くが利用可能であり、臨床では安全であった。本明細書に記載の新しい変異は、それらの優れた以前の特性を改善する。これに基づいて、これらの新しい変異は、「最適化」されると称され得る。

【発明を実施するための形態】

【０００９】

第１の態様では、本発明は、抗原に対する特異性を有するポリペプチドを提供し、ポリペプチドが、重鎖領域及び軽鎖領域を含み、

ｉ．ポリペプチドが、重鎖領域と軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又はポリペプチドの免疫原性を増加させ、

ｉｉ．ポリペプチドが、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを低減若しくは回避する、かつ／又は１つ以上の一次変異によって引き起こされる予測されたリスク免疫原性を低減若しくは回避するための１つ以上の二次変異を含む。

【００１０】
「ポリペプチド」という用語は、２つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、又は他のペプチド模倣体の化合物を指すために、その最も広い意味で本明細書で使用される。したがって、「ポリペプチド」という用語は、短いペプチド配列、及びより長いポリペプチド及びタンパク質を含む。本明細書で使用する場合、「アミノ酸」という用語は、Ｄ又はＬ光学異性体、並びにアミノ酸類似体及びペプチド模倣体の両方を含む、天然及び／又は非天然若しくは合成アミノ酸のいずれかを指す。
【００１１】
好ましい実施形態では、ポリペプチドは、抗体である。
【００１２】
更に好ましい実施形態では、ポリペプチドは、二重特異性ポリペプチドであり、より好ましくは二重特異性抗体である。代替的な実施形態では、ポリペプチドは、単一特異性ポリペプチドである。
【００１３】
本明細書中で使用される場合、「抗体」又は「抗体（複数）」という用語は、抗原結合部位を含有する分子、例えば、免疫グロブリン分子、及び抗原結合部位を含有する免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片を指す。免疫グロブリン分子は、任意の種類（例えばＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、又はサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。抗体としては、合成抗体、モノクローナル抗体、単一ドメイン抗体、一本鎖抗体、組換え生成された抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内抗体、ｓｃＦｖ（例えば、単一特異的及び二重特異性などを含む）、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体、並びに上記のもののうちのいずれかのエピトープ結合断片が挙げられるが、これらに限定されない。
【００１４】
本明細書で使用される「二重特異性」という用語は、ポリペプチドが２つの異なる標的実体に特異的に結合することが可能であることを意味する。２つの標的を標的とする二重特異性ポリペプチド（例えば、抗体）は、両方の標的が過剰発現している位置で免疫系の特異的活性化を誘導する可能性がある。
【００１５】
「に対する特異性を有する」抗体という用語は、ある特定の標的／マーカー／エピトープ／抗原にその結合特異性（複数可）を指向するように構成された抗体、すなわち標的／マーカー／エピトープ／抗原に免疫特異的に結合する抗体を指す。また、ある特定の標的／マーカー／エピトープ／抗原に「選択的」、「指向された」、「結合する」、「対する」、又は「対して指向された」という表現は、「特異性を有する」と同じ定義を有するように使用され得る。２つの異なる標的／マーカー／エピトープ／抗原に対する特異性を有する二重特異性抗体は、両方の標的／マーカー／エピトープ／抗原に免疫特異的に結合する。抗体がＣＤ４０などのある特定の標的抗原に指向される場合、当該抗体は、当該標的抗原構造上に存在する任意の好適なエピトープに指向され得ると考えられる。
【００１６】
免疫学の当業者は、「重鎖領域と軽鎖領域との会合を促進する」という概念を理解及び認識するであろう。ここでは、一次変異が重鎖領域及び軽鎖領域の誤った結合を防止すること、つまり、変異が製造副産物の形成を防止することが含まれる。あるいは、又は加えて、一次変異は、重鎖領域及び軽鎖領域の自己凝集を防止し得る。すなわち、変異は、凝集体の形成を防止する。一実施形態では、一次変異が、立体障害及び／又は電荷間の不適合性を生成することによって、凝集体及び／又は副産物の形成を防止し得ることが、当業者には理解されるであろう。これらの用語は、以下で更に詳細に論じられる。
【００１７】
「免疫原性」という用語は、免疫学の当業者にはよく理解されているであろうが、これ

には、ポリペプチドが投与された個体において、当該ポリペプチドに対して指向された望ましくない免疫応答を刺激させるポリペプチドの特徴が含まれる。

【００１８】

好ましい実施形態では、免疫原性の増加は、一次変異対照ポリペプチドの予測された免疫原性リスクと比較した場合のより高い予測された免疫原性リスク、及び／又は一次変異対照ポリペプチドの免疫原性と比較した場合のより高い免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、一次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の一次変異を含まない。

【００１９】

特定の実施形態では、一次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の一次変異が導入される前のポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【００２０】

好ましい実施形態では、免疫原性の低減は、第１の二次変異対照ポリペプチドの予測された免疫原性リスクと比較した場合のより低い予測された免疫原性リスク、及び／又は第１の二次変異対照ポリペプチドの免疫原性と比較した場合のより低い免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、第１の二次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の一次変異を含むが、１つ以上の二次変異を含まない。

【００２１】

特定の実施形態では、第１の二次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の二次変異が導入される前の一次変異のうちの１つ以上を含むポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【００２２】

好ましい実施形態では、免疫原性の回避は、第２の二次変異対照ポリペプチドの予測された免疫原性リスクと比較した場合と同様の若しくは同じ予測された免疫原性リスク、及び／又は第２の二次変異対照ポリペプチドの免疫原性と比較した場合と同様の若しくは同じ予測された免疫原性として特徴付けられ、好ましくは、第２の二次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の一次変異又は１つ以上の二次変異を含まない。

【００２３】

特定の実施形態では、第２の二次変異対照ポリペプチドは、１つ以上の一次変異が導入される前及び１つ以上の二次変異が導入される前のポリペプチドと同じであるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

【００２４】

実施例（特に、実施例１）で説明されるように、ポリペプチドの免疫原性を予測又は特定する１つの方法は、そのアミノ酸配列が、主要組織適合複合体ＩＩ（ＭＨＣＩＩ）に結合するであろうかどうかを考慮するなど、望ましくない免疫応答をもたらすであろう個体における分子及び／又は受容体に結合するであろうかどうかを、インシリコで予測することである。この作業は、他の技術の中でも、ＡｂＥｐｉＡｎａｌｙｚｅｒツール（ＥＩＲ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して行うことができる。本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を一次変異対照ポリペプチド、第１の二次変異対照ポリペプチド、及び／又は第２の二次変異対照ポリペプチドと比較するなど、上述の実施形態内でそのような予測を行う方法は、免疫学及び／又は計算生物学の当業者によって理解されるであろう。

【００２５】

また、理解されるであろうが、本発明のポリペプチドの免疫原性に関するインビボ及び／又はインビトロ実験も（本明細書で論じられる対照ポリペプチドと併せて、を含む）、例えば、適切なモデル生物を使用して行うことができる。

【００２６】

一実施形態では、免疫原性は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）免疫原性及び／又はＴ細胞依存性免疫原性である。

【００２７】

抗原提示細胞（ＡＰＣ）及びＴ細胞という用語は、免疫学の当業者には既知であろう。特に、ＡＰＣに関して、これらは、ＭＨＣの文脈内で抗原をプロセシング及び提示する細

胞である。その後、ＡＰＣは、これらの抗原をＴ細胞などの他の免疫細胞に提示することができる。

【００２８】

特定の実施形態では、ＡＰＣは、樹状細胞、マクロファージ、又はＢ細胞、好ましくは樹状細胞を含むリストから選択される１つ以上のＡＰＣである。

【００２９】

好ましい実施形態では、二次変異は、ＭＨＣクラスＩＩ及び／又はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、好ましくはＭＨＣクラスＩＩへのポリペプチド結合を低減又は回避する。

【００３０】

ＭＨＣクラスＩＩ及び／又はＴＣＲへのポリペプチドの結合の低減又は回避を引き起こす変異の概念は、免疫学の当業者によって認識及び理解されるであろう。「ポリペプチド結合を低減する」とは、ＭＨＣクラスＩＩ及び／又はＴＣＲの二次変異とのポリペプチドの親和性が、それらの二次変異のないポリペプチド（上記の第１の二次変異対照ポリペプチドなど）よりも低いことを含む。「ポリペプチド結合を回避する」ことは、二次変異を有するポリペプチドとＭＨＣクラスＩＩ及び／又はＴＣＲとの間に検出可能な結合がないことを含む。結合親和性を測定するための例示的な方法は、実施例に記載されているように、競合免疫アッセイ（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００８　ＰＬｏＳ　Ｃｏｍｐｕｔ　Ｂｉｏｌ．４（４）：ｅ１０００００４８に記載されているものなど）又はＯｃｔｅｔである。

【００３１】

第２の態様では、本発明は、抗原に対する特異性を有するポリペプチドを提供し、ポリペプチドが、プロテインＡ結合部位を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含み、ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む。

【００３２】

免疫学の当業者によって知られているように、プロテインＡは、元々Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ（黄色ブドウ球菌）に見出され、ＩｇＧ（ＶＨドメインなど）を含むいくつかの哺乳類タンパク質に対して高い親和性を有する。ＩｇＧに対するその親和性のために、プロテインＡは、精製中にポリペプチドを選択的に単離するためにしばしば使用される。これは有用なツールであるが、ポリペプチドが複合体である場合、特に、ポリペプチドが本明細書に記載の二重特異性抗体などの複数のポリペプチド鎖で作製されている場合、ポリペプチドにおけるプロテインＡ部位は、完全な目的のポリペプチドと、望ましくないミスフォールディングした又は結合してない成分ポリペプチド鎖との共精製もたらす可能性がある。理解されるであろうが、この共精製は、望ましくないポリペプチドによる汚染を引き起こし得る。したがって、本発明者らは、特に、製造プロセス中に望ましくないポリペプチドを形成する傾向があるポリペプチド領域におけるプロテインＡ結合部位を変異させることが望ましい場合があることを特定した。本発明者らは、驚くべきことに、ＶＨドメインのプロテインＡ結合部位を変異させることにより、製造プロセス中の目的のポリペプチドの純度が改善され得ることを見出した。本明細書に記載のプロテインＡ結合部位の変異は、「最適化されたＲＵＢＹ」変異であり、「改善された純度」変異とも称され得る。

【００３３】

プロテインＡの結合部位へのプロテインＡの結合の低減又は回避を引き起こす変異の概念は、免疫学の当業者によって認識及び理解されるであろう。「プロテインＡのプロテインＡ結合部位への結合を低減する」とは、変異を有するプロテインＡのプロテインＡ結合部位への親和性が、変異を有しないプロテインＡのプロテインＡ結合部位への親和性よりも低いこと、並びに／又は変異が、抗体産生中に、プロテインＡ特異的方法によって、プロテインＡの親和性をもはや結合（及び／若しくは共精製）し得ない程度に減少させることを含む。「プロテインＡのプロテインＡ結合部位への結合を回避する」とは、プロテインＡと変異を有するタンパク質結合部位との間に検出可能な結合がないことを含む。結合親和性を測定するための例示的な方法は、実施例に記載されているように、Ｏｃｔｅｔで

ある。

【００３４】

特定の実施形態では、プロテインＡのプロテインＡ結合部位への結合を低減若しくは回避する変異は、プロテインＡのプロテインＡ結合部位への結合を低減若しくは回避する１つ以上の変異である。

【００３５】

本発明の第２の態様の一実施形態では、ＶＨは、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来する。

【００３６】

ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨは、フレームワーク領域１、３及びＣＤＲＨ２の保存部分で特定されているその部位を構成するプロテインＡ結合ドメインを有するプロテインＡ結合部位を有するため、プロテインＡ結合を低減又は回避する変異に特に影響を受けやすい。これは、Ｂａｃｈ，Ｌｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．２０１５ Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ａ．；１４０９：６０－９、Ｐｏｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．１９９６，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１５７（７）：２９８２－８．ＰＭＩＤ：８８１６４０６、及びＰｏｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ １９９７，Ｉｎｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１４（４）：２９１－３０８．ｄｏｉ：１０．３１０９／０８８３０１８９７０９１１６５２１．ＰＭＩＤ：９１８６７８２で更に論じられる。

【００３７】

一実施形態では、プロテインＡ結合部位への変異は、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨのフレームワーク１領域、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨのフレームワーク２領域、及びＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨのＣＤＲＨ２、好ましくはＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨのＣＤＲＨ２のうちの１つ以上にある。

【００３８】

例示的なＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーメンバーは、ＩＧＨＶ３－２３＊０１であり、以下の配列を有する：

【化１】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK （ＣＤＲ２に下線－配列番号１）

【００３９】

好ましい態様では、プロテインＡ結合部位への変異は、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来するＶＨのＣＤＲＨ２の最後のアミノ酸（すなわち、Ｃ末端アミノ酸）への変異である。

【００４０】

本発明の第１の態様の変異は、同じポリペプチドにおいて、本発明の第２の態様の変異と組み合わせることができることが含まれる。本明細書で論じられる変異のそのような潜在的な組み合わせは、以下に開示されている。

【００４１】

第１及び第２の態様の好ましい態様では、ポリペプチドは、二重特異性抗体であり、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、第１の重鎖領域及び第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する少なくとも１つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
１つ以上の一次変異が、第１の重鎖領域と第１の軽鎖領域との会合を促進し、かつ／又は第２の重鎖領域と第２の軽鎖領域との会合を促進する。この特定の実施形態は、概して図１１に示されるように、ＲＵＢＹ形式構造を有するポリペプチドを含む。

【００４２】
したがって、「免疫グロブリン」という用語には、上記のように、免疫グロブリン分子及び抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片が含まれることが、当業者には理解されるであろう。
【００４３】
本明細書で使用される場合、「抗体断片」という用語は、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ）２、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖなどの抗体の一部分である。構造にかかわらず、抗体断片は、インタクトな抗体によって認識されるのと同じ抗原に結合する。例えば、抗ＣＤ４０抗体断片はＣＤ４０に結合する。「抗体断片」という用語はまた、重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Ｆｖ」断片などの可変領域からなる単離された断片、並びに軽鎖及び重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結している組換え一本鎖ポリペプチド分子（「ｓｃＦｖタンパク質」）を含む。本明細書で使用される場合、「抗体断片」という用語は、Ｆｃ断片又は単一アミノ酸残基などの、抗原結合活性を有さない抗体の部分を含まない。
【００４４】
「Ｆａｂ断片」とは、インタクトな抗体によって認識されるのと同じ抗原に結合することが可能であるＦａｂ断片（完全な軽鎖と、重鎖の可変領域及びＣＨ１領域とを含む）を含む。Ｆａｂ断片は、当該技術分野で既知の用語であり、Ｆａｂ断片は、重鎖及び軽鎖の各々の１つの定常ドメイン及び１つの可変ドメインを含む。
【００４５】
本発明の一実施形態では、結合ドメインＢ１又は結合ドメインＢ２のうちの１つは、免疫グロブリン分子であり、結合ドメインＢ１又は結合ドメインＢ２のうちの１つは、Ｆａｂ断片であり、Ｆａｂ断片は、Ｆａｂ断片の軽鎖を介して、免疫グロブリンの重鎖のＣ末端に融合される。
【００４６】
例えば、ポリペプチドは、図１１に示されているような形式を有し得る。そのような形式は、「ＲＵＢＹ（商標）形式」と称される（係属中の英国特許出願第１８２０５５６．７号及びＰＣＴ出願第ＷＯ２０２０／１２７３５４号に記載されている）。本明細書に記載される「ＲＵＢＹ（商標）形式」及び「最適化ＲＵＢＹ（商標）形式」の抗体は、本発明の二重特異性ポリペプチドにとって特に好ましい。
【００４７】
一実施形態では、１つ以上のＦａｂ断片は、リンカーを介して免疫グロブリンのＣ末端に連結される。
【００４８】
本発明の一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、四価であり、２つの抗原の各々に二価で結合することが可能である。
【００４９】
一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、２つのアームを有する抗体として配置された免疫グロブリンを含み、したがって、第１の抗原に対する２つの結合部位と、各々が第２の抗原に対する結合部位を提供するＦａｂ断片の２つの結合部位と、を含む。したがって、第１の抗原に対して２つの結合部位があり、第２の抗原に対して２つの結合部位がある。この実施形態の二重特異性ポリペプチドは、以下の３つのポリペプチド鎖を含む：（１）ＩｇＧの重鎖、リンカー、及びＦａｂの軽鎖を含む鎖Ｈ１、（２）ＩｇＧの軽鎖である鎖Ｌ１、並びに（３）付加された（結合された）Ｆａｂの重鎖である鎖Ｈ２。好ましい実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、以下の６つのポリペプチド鎖を含み得る：（ａ）ＩｇＧの重鎖、リンカー、及びＦａｂの軽鎖を含む２つの鎖Ｈ１、（ｂ）ＩｇＧの軽鎖である２つの鎖Ｌ１、並びに（ｃ）付加された（結合された）Ｆａｂの重鎖である２つの鎖Ｈ２。この構造は、「ＲＵＢＹ（商標）形式」及び「最適化ＲＵＢＹ（商標）形式」抗体の両方に使用することができ、これらの「Ｈ１」、「Ｈ２」及び「Ｌ１」鎖は、特定の変異を参照して以下に記載される。

【００５０】
一実施形態では、結合ドメインＢ１は、免疫グロブリンであり、結合ドメインＢ２は、Ｆａｂである。代替的な実施形態では、結合ドメインＢ１は、Ｆａｂであり、結合ドメインＢ２は、免疫グロブリンである。
【００５１】
したがって、第１の重鎖ポリペプチドは、第１の抗体又は抗原結合断片の重鎖を含むか、又はそれからなるポリペプチドであり、第１の軽鎖ポリペプチドは、第１の抗体又は抗原結合断片の軽鎖を含むか、又はそれからなるポリペプチドである。
【００５２】
したがって、第２の重鎖ポリペプチドは、第２の抗体又は抗原結合断片の重鎖を含むか、又はそれからなるポリペプチドであり、第２の軽鎖ポリペプチドは、第２の抗体又は抗原結合断片の軽鎖を含むか、又はそれからなるポリペプチドである。
【００５３】
第１の抗体及び第２の抗体又は抗原結合断片は、それぞれ、第１の抗原及び第２の抗原に対する特異性を有する。
【００５４】
本発明の二重特異性抗体の一実施形態では、免疫グロブリン分子は、第１の重鎖ポリペプチドの２つのコピー及び／又は第１の軽鎖ポリペプチドの２つのコピーを含む。
【００５５】
したがって、一実施形態では、免疫グロブリン分子は、２つの重鎖ポリペプチド及び２つの対応する軽鎖ポリペプチドを含む。「対応する」とは、重鎖及び軽鎖が、抗体形式に組み立てられること、すなわち、重鎖が、ＣＨ１及びＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ領域を介して軽鎖と会合し、ＶＨ及びＶＬ領域、並びに重鎖も、ＣＨ２及びＣＨ３領域を介して一緒に連結されることを意味する。
【００５６】
本発明の二重特異性抗体の一実施形態では、免疫グロブリン分子は、第１の重鎖ポリペプチドの２つのコピー及び／又は第１の軽鎖ポリペプチドの２つのコピーを含む。
【００５７】
したがって、一実施形態では、免疫グロブリン分子は、２つの重鎖ポリペプチド及び２つの対応する軽鎖ポリペプチドを含む。「対応する」とは、重鎖及び軽鎖が、抗体形式に組み立てられること、すなわち、重鎖が、ＣＨ１及びＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ領域を介して軽鎖と会合し、ＶＨ及びＶＬ領域、並びに重鎖も、ＣＨ２及びＣＨ３領域を介して一緒に連結されることを意味する。
【００５８】
一実施形態では、二重特異性抗体は、（ｂ）に記載の２つのＦａｂ断片、すなわち、第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片を含み、Ｆａｂ断片が、各々、第２の重鎖ポリペプチド及び第２の軽鎖ポリペプチドを含む。
【００５９】
したがって、一実施形態では、二重特異性抗体は、
（ａ）免疫グロブリン分子であって、第１の抗原に対する特異性を有し、２つの重鎖ポリペプチド及び２つの軽鎖ポリペプチドを含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）２つのＦａｂ断片であって、第２の抗原に対する特異性を有し、第２の重鎖ポリペプチド及び第２の軽鎖ポリペプチドを含む、２つのＦａｂ断片と、を含む。
【００６０】
したがって、一実施形態では、二重特異性抗体は、
●免疫グロブリン分子であって、第１の重鎖ポリペプチドの２つのコピー及び第１の軽鎖ポリペプチドの２つのコピーを含む、免疫グロブリン分子を含み、
●二重特異性抗体が、第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片を更に含み、Ｆａｂ断片が、各々、第２の重鎖ポリペプチド及び第２の軽鎖ポリペプチドを含み、
●第１のＦａｂ断片が、Ｆａｂ断片の軽鎖ポリペプチドを介して第１の重鎖ポリペプチ

ドの第１のコピーのＣ末端に融合され、
●第２のＦａｂ断片が、Ｆａｂ断片の軽鎖ポリペプチドを介して、第１の重鎖ポリペプチドの第２のコピーのＣ末端に融合される。
【００６１】
本発明の第１の態様による二重特異性抗体の一実施形態では、免疫グロブリン分子は、ヒトＦｃ領域又は当該領域のバリアントを含み、領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４領域、好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ４領域である。
【００６２】
抗体の定常（Ｆｃ）領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第１の成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主組織又は因子との結合を媒介し得る。Ｆｃ領域は、好ましくはヒトＦｃ領域、又は当該領域のバリアントである。Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４領域、好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ４領域であり得る。Ｆｃ領域のバリアントは、典型的には、親和性が変更されたＦｃガンマＲ及び／又は新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）などのＦｃ受容体に結合し、ポリペプチドの機能及び／又は半減期の改善を提供する。生物学的機能及び／又は半減期は、天然Ｆｃ領域を含むポリペプチドの半減期と比較して、延長するか又は減少するかのいずれかであり得る。バリアントＦｃ領域の存在によって調節され得るそのような生物学的機能の例としては、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、及び／又はアポトーシスが挙げられる。
【００６３】
当業者は、一実施形態では、Ｆｃ領域が天然に存在する（すなわち、野生型）ヒトＦｃ領域であることを理解するであろう。代替的な実施形態では、Ｆｃ領域は、天然に存在しない（例えば、変異した）ヒトＦｃ領域である。
【００６４】
一実施形態では、免疫グロブリンのＦｃ領域は、修飾されたグリコシル化を有し得る。例えば、Ｆｃ領域は、アフコシル化され得る。
【００６５】
「アフコシル化」、「脱フコシル化」又は「非フコシル化」抗体とは、抗体のＦｃ領域に、フコース糖単位が全く付着していない、又はフコース糖単位の減少した含有量を有することを意味する。減少した含有量とは、フコシル化「野生型」抗体と比較した修飾抗体でのフコースの相対量、例えば、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で、及び／又はＧＤＰ－６－デオキシ－Ｄ－リキソ－４－ヘキスロースレダクターゼの存在下で、発現される同等の抗体と比較して、免疫グロブリン１分子当たりのフコース糖単位が少ないことによって定義することができる。
【００６６】
一実施形態では、１つ以上のＦａｂ断片は、リンカーを介して免疫グロブリンのＣ末端に連結される。したがって、リンカーは、第２の軽鎖ポリペプチドを第１の重鎖ポリペプチドに連結するペプチドリンカーであり得る。一実施形態では、２つのＦａｂ断片（したがって、２つの第２の軽鎖ポリペプチド）が存在し、免疫グロブリンにおいて２つの第１の重鎖ポリペプチドもまた存在する場合、各Ｆａｂ断片は、リンカーを介して第１の重鎖ポリペプチドのうちの１つに結合される。
【００６７】
一実施形態では、リンカーは、以下から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドである：ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２）、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＡＰ（配列番号３）、ＮＦＳＱＰ（配列番号４）、ＫＲＴＶＡ（配列番号５）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６）、又は（ＳＧ）ｍ（式中、ｍ＝１～７）。
【００６８】
一次変異
一実施形態では、軽鎖領域は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインを含み、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４

位にあり（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、及び／又は重鎖領域は、ＣＨ１ドメインを含み、一次変異は、ＣＨ１ドメインの１８７位にある（ＥＵ番号付けシステムによる）。特定の実施形態では、軽鎖領域は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインを含み、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位にある。代替的な特定の実施形態では、重鎖領域は、ＣＨ１ドメインを含み、一次変異は、ＣＨ１ドメインの１８７位にある。更なる実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及びＣＨ１ドメインの１８７位（ＥＵ番号付けシステムによる）にある。

【００６９】

好ましい実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＸ１１４Ａ、及び／又はＣＨ１ドメインのＸ１８７Ｅ／Ｄ位である。特定の実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＸ１１４Ａである。代替的な特定の実施形態では、一次変異は、ＣＨ１ドメインのＸ１８７Ｅ／Ｄである。更なる実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＸ１１４Ａ（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及びＣＨ１ドメインのＸ１８７Ｅ／Ｄ（ＥＵ番号付けシステムによる）である。Ｘは、任意のアミノ酸を指す。

【００７０】

代替的な好ましい実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ｘ、及び／又はＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｘである。特定の実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ｘである。代替的な特定の実施形態では、一次変異は、ＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｘである。更なる実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ｘ（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及びＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｘ（ＥＵ番号付けシステムによる）である。Ｘは、任意のアミノ酸を指す。

【００７１】

変異が論じられる文脈における「／」の使用は、代替的なアミノ酸を例示することであり、例えば、「Ｘ１８７Ｅ／Ｄ」は、アミノ酸「Ｘ」の代替物として、Ｅ又はＤが１８７位に含まれ得ることを示す。

【００７２】

更なる好ましい実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ａ、及び／又はＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｅ／Ｄである。特定の実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ａである。代替的な特定の実施形態では、一次変異は、ＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｅ／Ｄである。更なる実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＴ／Ｓ１１４Ａ（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及びＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｅ／Ｄ（ＥＵ番号付けシステムによる）である。

【００７３】

好ましい実施形態では、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖、好ましくは「Ｈ２」鎖にある。

【００７４】

好ましい実施形態では、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位における一次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖、好ましくは「Ｈ１」鎖にある。

【表１－１】

表Ａ：関連する野生型又は出発物質の CKappa、CLambda、及び VL J セグメントドメインのアミノ酸配列。以下に説明するように、CKappa ドメインの境界は、EU 又は Kabat 番号付けシステムによれば、108 位（すなわち、ドメインの最も N 末端のアミノ酸）にあり、CLambda ドメインの境界は、Kabat 番号付けシステムによれば、107A 位にある。隣接するアミノ酸は、VL ドメインにあり、IMGT 番号付けシステムによれば、127 位（すなわち、ドメインの最も N 末端のアミノ酸）に番号付けされている。以下の表では、最後の VL ドメインアミノ酸は斜体で示され、第 1 の CKappa/CLambda ドメインアミノ酸は太字で示されている。

CKappa+VL 又は CLambda+VL	アミノ酸配列	配列番号
CKappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	7
CLambda (1)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	8
CLambda (2)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	9
CLambda (3)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	10
CLambda (6)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNT GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP AECS	11

【表１－２】

CLambda (7)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLVSDFNPGAVTVAWKADGSPVKV GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAP AECS	12
CKappa-関連セクション	RTVAAPSVFIFPPSDEQL	13
CLambda (1)-関連セクション	GQPKANPTVTLFPPSSEEL	14
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)-関連セクション	GQPKAAPSVTLFPPSSEEL	15
VL の CKappa J1	WTFGQGTKVEIK	16
VL の CKappa J2	YTFGQGTKLEIK	17
VL の CKappa J3	FTFGPGTKVDIK	18
VL の CKappa J4	LTFGGGTKVEIK	19
VL の CKappa J5	ITFGQGTRLEIK	20
更なる VL の CKappa J	TFGAGTKLEIK	284
VL の CKappa J1-関連セクション	TFGQGTKVEIK	21
VL の CKappa J2-関連セクション	TFGQGTKLEIK	22
VL の CKappa J3-関連セクション	TFGPGTKVDIK	23
VL の CKappa J4-関連セクション	TFGGGTKVEIK	24
VL の CKappa J5-関連セクション	TFGQGTRLEIK	25
VL の CLambda J1	YVFGTGTKVTVL	26
VL の CLambda J2	VVFGGGTKLTVL	27
VL の CLambda J4	FVFGGGTQLIIL	28

【表１－３】

VL の CLambda J5	WVFGEGTELTVL	29
VL の CLambda J7	AVFGGGTQLTVL	30
VL の CLambda J1-関連セクション	VFGTGTKVTVL	31
VL の CLambda J2-関連セクション	VFGGGTKLTVL	32
VL の CLambda J4-関連セクション	VFGGGTQLIIL	33
VL の CLambda J5-関連セクション	VFGEGTELTVL	34
VL の CLambda J7-関連セクション	VFGGGTQLTVL	35
CKappa+VL J1-関連セクション	TFGQGTKVEI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	36
CKappa+VL J2-関連セクション	TFGQGTKLEI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	37
CKappa+VL J3-関連セクション	TFGPGTKVDI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	38
CKappa+VL J4-関連セクション	TFGGGTKVEI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	39
CKappa+VL J5-関連セクション	TFGQGTRLEI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	40
CKappa+VL J-関連セクション	TFGAGTKLEI*K***R**TVAAPSVFIFPPSDEQL	206
CLambda (1)+VL J1-関連セクション	VFGTGTKVTV*L***G**QPKANPTVTLFPPSSEEL	41
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)+VL J1-関連セクション	VFGTGTKVTV*L***G**QPKAAPSVTLFPPSSEEL	42

【表１－４】

CLambda (1)+VL J2-関連セクション	VFGGGTKLTV*L***G**QPKANPTVTLFPPSSEEL	43
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)+VL J2-関連セクション	VFGGGTKLTV*L***G**QPKAAPSVTLFPPSSEEL	44
CLambda (1)+VL J4-関連セクション	VFGGGTQLII*L***G**QPKANPTVTLFPPSSEEL	45
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)+VL J4-関連セクション	VFGGGTQLII*L***G**QPKAAPSVTLFPPSSEEL	46
CLambda (1)+VL J5-関連セクション	VFGEGTELTV*L***G**QPKANPTVTLFPPSSEEL	47
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)+VL J5-関連セクション	VFGEGTELTV*L***G**QPKAAPSVTLFPPSSEEL	48
CLambda (1)+VL J7-関連セクション	VFGGGTQLTV*L***G**QPKANPTVTLFPPSSEEL	49
CLambda (2)、(3)、(6)、又は(7)+VL J7-関連セクション	VFGGGTQLTV*L***G**QPKAAPSVTLFPPSSEEL	50

【表２－１】

表Ｂ：本発明に関連するアミノ酸配列である、CKappa/CLambda 及び VL、又は CKappa/CLambda における一次変異。EU 又は Kabat 番号付けシステムによれば、CKappa/CLambda ドメインの 114 位は、X にある。表 A で説明したように、最後の VL ドメインアミノ酸は斜体で示され、第 1 の CKappa/CLambda ドメインアミノ酸は太字で示されている。

CKappa、CLambda、CKappa+VL、又は CLambda+VL	アミノ酸配列	配列番号
CKappa+VL	TFGQGTKVEI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	51
CKappa+VL	TFGQGTKLEI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	52
CKappa+VL	TFGPGTKVDI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	53
CKappa+VL	TFGGGTKVEI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	54
CKappa+VL	TFGQGTRLEI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	55
CKappa+VL	TFGAGTKLEI*K***R**TVAAP**X**VFIFPPSDEQL	285
CKappa+VL	EI*K***R**TVAAP**X**V	56
CKappa+VL	DI*K***R**TVAAP**X**V	57
CKappa	RTVAAP**X**V	58
CKappa 又は CLambda	P**X**V	59
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**QPKANP**X**VTLFPPSSEEL	60
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**QPKAAP**X**VTLFPPSSEEL	61
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**QPKANP**X**VTLFPPSSEEL	62
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**QPKAAP**X**VTLFPPSSEEL	63
CLambda+VL	VFGGGTQLI*L***G**QPKANP**X**VTLFPPSSEEL	64
CLambda+VL	VFGGGTQLI*L***G**QPKAAP**X**VTLFPPSSEEL	65
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QPKANP**X**VTLFPPSSEEL	66
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QPKAAP**X**VTLFPPSSEEL	67
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QPKANP**X**VTLFPPSSEEL	68
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QPKAAP**X**VTLFPPSSEEL	69
CLambda+VL	V*L***G**QPKANP**X**V	70

【表２－２】

CLambda+VL	VLGQPKAAPXV	71
CLambda+VL	ILGQPKANPXV	72
CLambda+VL	ILGQPKAAPXV	73
CLambda	GQPKANPXV	74
CLambda	GQPKAAPXV	289

Ｘは、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＴ又はＳであり、好ましくはＡによって置き換えられる。

【００７５】
一実施形態では、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位における一次変異は、表Ｂから選択されるアミノ酸配列のＸ位にある。
【００７６】
特定の実施形態では、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位における一次変異は、Ｘ位を中心として、表Ｂから選択される３ｍｅｒ、５ｍｅｒ、７ｍｅｒ、９ｍｅｒ、１１ｍｅｒ、１３ｍｅｒ、１５ｍｅｒ、１７ｍｅｒ、１９ｍｅｒ、２１ｍｅｒ、又は２３ｍｅｒのアミノ酸配列のＸ位にあり、例えば、９ｍｅｒのこの実施形態の配列
【化２】

TFGQGTKVEIKRTVAAPXVFIFPPSDEQL

（配列番号５１）は、
【化３】

VAAPXVFIF

（配列番号７５）である。
【００７７】
更なる実施形態では、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位における一次変異は、配列
【化４】

PXV

を含むアミノ酸配列のＸ位にあり、表Ｂから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有する。
【００７８】
好ましい実施形態では、ＣＫａｐｐａドメインの１１４位における一次変異は、アミノ酸配列
【化５】

TFGQGTKLEIKRTVAAPXVFIFPPSDEQL

（配列番号５２）、又は

【化６】

EIKRTVAAPXV

（配列番号５６）、又は

【化７】

PXV

（配列番号５９）のＸ位にある。

【００７９】

更なる好ましい実施形態では、ＣＫａｐｐａドメインの１１４位における一次変異は、アミノ酸配列

【化８】

TFGAGTKLEIKRTVAAPXVFIFPPSDEQL

（配列番号２８５）のＸ位にある。

【００８０】

特に好ましい実施形態では、上で更に説明したように、表Ｂのアミノ酸配列のうちのいずれかの１１４位におけるアミノ酸を置き換えるアミノ酸は、Ａである。

【表３】

表Ｃ：関連する野生型 CH1 アミノ酸配列。

Fc アイソタイプ	アミノ酸配列	配列番号
IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	290
IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV	291
IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV	292
IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV	293
IgG1-関連セクション	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV	76
IgG2-関連セクション	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV	77
IgG3-関連セクション	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV	78
IgG4-関連セクション	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV	79

【００８１】

一実施形態では、ＣＨ１ドメインは、以下を含むリストから選択されるＦｃアイソタイプ由来である：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４。

【００８２】

最も好ましくは、ＣＨ１ドメインは、ＩｇＧ１由来である。

【表４】

表Ｄ：本発明に関連するCH1アミノ酸配列における一次変異。CH1ドメインの187位は、EU番号付けシステムによれば、Xにある。

Fcアイソタイプ	アミノ酸配列	配列番号
IgG1	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYICNV	80
IgG2	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSNFGTQTYTCNV	81
IgG3	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYTCNV	82
IgG4	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTKTYTCNV	83
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	GLYSLSSVV**X**VP	84
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	V**X**V	85

Xは、任意のアミノ酸であるが、好ましくはTであり、好ましくは、E又はDによって置き換えられる。

【００８３】

一実施形態では、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、表Ｄから選択されるアミノ酸配列のＸ位にある。

【００８４】

特定の実施形態では、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、表Ｄから選択される３ｍｅｒ、５ｍｅｒ、７ｍｅｒ、９ｍｅｒ、１１ｍｅｒ、１３ｍｅｒ、１５ｍｅｒ、１７ｍｅｒ、１９ｍｅｒ、２１ｍｅｒ、２３ｍｅｒ、２５ｍｅｒ、２７ｍｅｒ、２９ｍｅｒ、又は３１ｍｅｒのアミノ酸配列のＸ位にあり、例えば、配列

【化９】

AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYICNV

（配列番号８０）における本実施形態の９ｍｅｒは、

【化１０】

SSVV**X**VPSS

（配列番号８６）である。

【００８５】

更なる実施形態では、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、配列

【化１１】

V**X**V

を含むアミノ酸配列のＸ位にあり、表Ｄから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有する。

【００８６】

本明細書に記載のアミノ酸配列における変異の位置付けは、数値を参照しているが（例えば、「ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＸＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号８０）のＸ位にある」）、それは、これらの特定の実施形態と、それらの変異が更に論じられる他の実施形態との間

の相互参照を可能にするためであることが理解されるであろう。したがって、開示されるアミノ酸配列内に記載される変異はまた、その配列の文脈に含まれ得るが、関連付けられた番号によって指定される全体的な位置には含まれないことも包含される。したがって、一例として、一次変異が、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＸＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号８０）又はＧＬＹＳＬＳＳＶＶＸＶＰ（配列番号８４）又はＶＸＶ（配列番号８５）のＸ位にあるＣＨ１ドメインの１８７位にあることによって、一次変異が、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＸＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号８０）又はＧＬＹＳＬＳＳＶＶＸＶＰ（配列番号８４）又はＶＸＶ（配列番号８５）のＸ位にあり得ることも含まれる。

【００８７】

二次変異

本明細書に記載の「二次変異」は、「最適化ＲＵＢＹ（商標）」の変異、特に「変異セット２」（「セット２ａ」及び／又は「セット２ｂ」を含む）と称され得る。

【００８８】

「ＲＵＢＹ（商標）形式」の二重特異性ポリペプチドは、臨床用に設計され、免疫原性が低いが、「二次変異」を有する「最適化ＲＵＢＹ（商標）形式」の二重特異性ポリペプチドは、二重特異性ポリペプチド自体に対する免疫原性応答を誘発するリスクを更に低減するように操作されている。

【００８９】

これらの二次変異の様々な組み合わせを、本発明のポリペプチド（好ましくは二重特異性ポリペプチド）、並びに上記の一次変異のうちのいずれかと組み合わせて使用され得ることが、当業者には理解されるであろう。同じポリペプチドで使用される一次変異及び二次変異の組み合わせを以下に記載する。また、本明細書に記載されるこれらの変異のバリエーションは、本発明の一部として機能するであろうことも理解されたい。可変ドメイン（ＶＨ又はＶＬ）における全ての変異は、ＩＭＧＴ番号付けシステムに従って番号付けされ、定常ＣＫａｐｐａ軽鎖ドメインの全ての変異は、ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムに従って番号付けされ、定常ＣＬａｍｂｄａ軽鎖ドメインの全ての変異は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従って番号付けされ、全ての定常重鎖の変異は、ＥＵ番号付けシステムに従って番号付けされる。

【００９０】

一実施形態では、１つ以上の二次変異は、連続したアミノ酸の配列において、一次変異から８アミノ酸以下の上流及び／又は下流の１つ以上の位置にある。

【００９１】

特定の実施形態では、１つ以上の二次変異は、連続したアミノ酸の配列（表Ｂのアミノ酸配列など）において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣｋａｐｐａ）ドメインの１１４位における一次変異から８アミノ酸以下の上流及び／又は下流の１つ以上の位置にある。

【００９２】

ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１４位の上流のアミノ酸の位置付けが論じられる場合、この範囲は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインのＮ末端にあるＶＬドメインまで及ぶ可能性がある。

【００９３】

ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによれば、ＣＫａｐｐａドメインのＮ末端境界は１０８位であり、その前に、隣接するアミノ酸は、ＩＭＧＴ番号付けによれば、ＶＬドメインにあり、１２７位に番号付けされる。したがって、ＣＫａｐｐａドメインとＶＬドメインとの間の位置の番号付けは、以下のとおりである（ＣＫａｐｐａドメインは下線で示され、ＶＬは太字で示されている－Ｘは、その位置のアミノ酸及び番号を示す）。

【化１２】

$$\mathbf{X^{123}X^{124}X^{125}X^{126}X^{127}}\underline{X^{108}X^{109}X^{110}X^{111}X^{112}X^{113}X^{114}X^{115}X^{116}}$$

－本出願の以下の配列におけるドメインの境界は、以下のとおりである：
【化１３】
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

（配列番号３６：この配列に関連して、ＣＫａｐｐａドメインは下線で示され、ＶＬは太字で示されている）。
【００９４】
Ｋａｂａｔ番号付けシステムによれば、ＣＬａｍｂｄａドメインのＮ末端境界は１０７Ａ位であり、その前に、隣接するアミノ酸は、ＩＭＧＴ番号付けによれば、ＶＬドメインにあり、１２７位に番号付けされる。したがって、ＣＬａｍｂｄａドメインとＶＬドメインとの間の位置の番号付けは、以下のとおりである（ＣＬａｍｂｄａドメインは下線で示され、ＶＬは太字で示されている－Ｘは、その位置のアミノ酸及び番号を示す）。
【化１４】
$X^{123}X^{124}X^{125}X^{126}X^{127}$$X^{107}X^{108}X^{109}X^{110}X^{111}X^{112}X^{113}X^{114}X^{115}X^{116}$

－
【化１５】
VFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

（配列番号４１：この配列に関連して、ＣＬａｍｂｄａドメインは下線で示され、ＶＬは太字で示されている）。
【００９５】
したがって、一実施形態では、１つ以上の二次変異は、ＶＬドメインの１２６位からＣＫａｐｐａドメインの１２２位までの領域にある。代替的な実施形態では、１つ以上の二次変異は、ＶＬドメインの１２７位からＣＬａｍｂｄａドメインの１２３位までの領域にある。
【００９６】
更なる特定の実施形態では、１つ以上の二次変異は、連続したアミノ酸の配列（表Ｄから選択されるアミノ酸配列など）において、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異から８アミノ酸以下の上流及び／又は下流の１つ以上の位置にあり、例えば、１つ以上の二次変異は、ＣＨ１ドメインの１７９位～１９５位までの領域にある。
【００９７】
一実施形態では、二次変異は、表Ｂから選択されるアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ａであり、かつ／又は二次変異は、表Ｄから選択されるアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ｅ又はＤである。
【００９８】
特定の実施形態では、二次変異は、Ｘ位を中心として、表Ｂから選択される３ｍｅｒ、５ｍｅｒ、７ｍｅｒ、９ｍｅｒ、１１ｍｅｒ、１３ｍｅｒ、１５ｍｅｒ、１７ｍｅｒ、１９ｍｅｒ、２１ｍｅｒ、又は２３ｍｅｒのアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ａである。
【００９９】
更なる実施形態では、二次変異は、配列
【化１６】
P**X**V

を含むアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、表Ｂから選択されるアミノ酸

配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有し、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ａである。

【０１００】

特定の実施形態では、二次変異は、Ｘ位を中心として、表Ｄから選択される３ｍｅｒ、５ｍｅｒ、７ｍｅｒ、９ｍｅｒ、１１ｍｅｒ、１３ｍｅｒ、１５ｍｅｒ、１７ｍｅｒ、１９ｍｅｒ、２１ｍｅｒ、２３ｍｅｒ、２５ｍｅｒ、２７ｍｅｒ、２９ｍｅｒ、又は３１ｍｅｒのアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ｅ又はＤである。

【０１０１】

更なる実施形態では、二次変異は、配列

【化１７】

VXV

を含むアミノ酸配列の位置における１つ以上の変異であり、表Ｄから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有し、変異が、Ｘ位にはなく、Ｘが、アミノ酸Ｅ又はＤである。

【０１０２】

一実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａ及びＶＬドメインのアミノ酸配列

【化１８】

XKRXVXAPA

（配列番号８７）の１位、４位、及び６位のうちの１つ以上にあり、９位が、一次変異であり、

【化１９】

XK

が、ＶＬドメインの一部であり、

【化２０】

RXVXAPA

が、ＣＫａｐｐａドメインの一部である。好ましい実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａ及びＶＬドメインのアミノ酸配列

【化２１】

IKRXVXAPA

（配列番号８８）の４位及び／又は６位にあり、Ｘが、任意のアミノ酸であり、９位が、一次変異であり、

【化２２】

IK

が、ＶＬドメインの一部であり、

【化２３】

RXVXAPA

が、ＣＫａｐｐａドメインの一部である。この実施形態における１位、４位、及び６位は、本明細書の実施形態のＶＬドメインの１２６位、並びにＣＫａｐｐａドメインの１０９位及び１１１位に対応する。この実施形態のアミノ酸配列のより長いバージョンは、表Ｂに記載されており、この実施形態に記載されている二次変異を含むそれらのより長い配列は、当業者には理解されるであろう。

【０１０３】

代替的な実施形態では、二次変異は、ＣＬａｍｂｄａ及びＶＬドメインのアミノ酸配列

【化２４】

LGQXKXNPA

（配列番号８９）の４位及び／又は６位にあり、Ｘが、任意のアミノ酸であり、９位が、一次変異であり、Ｌが、ＶＬドメインの一部であり、

【化２５】

GQXKXNPA

が、ＣＬａｍｂｄａドメインの一部である。更なる代替的な実施形態では、二次変異は、ＣＬａｍｂｄａ及びＶＬドメインのアミノ酸配列

【化２６】

LGQXKXAPA

（配列番号９０）の４位及び／又は６位にあり、Ｘが、任意のアミノ酸であり、９位が、一次変異であり、Ｌが、ＶＬドメインの一部であり、

【化２７】

GQXKXAPA

が、ＣＬａｍｂｄａドメインの一部である。この実施形態の４位及び６位は、本明細書の実施形態のＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位及び１１１位に対応する。この実施形態のアミノ酸配列のより長いバージョンは、表Ａ及びＢに記載されており、この実施形態に記載されている二次変異を含むそれらのより長い配列は、当業者には理解されるであろう。

【０１０４】

一実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインにおけるアミノ酸配列

【化２８】

XSLXSXVEX

（配列番号９１）の１位、４位、６位、及び９位のうちの１つ以上にあり、Ｘが、任意のアミノ酸であり、８位が、一次変異であり、ＣＨ１ドメインにおける

【化２９】

XSLXSXVDX

（配列番号９２）であり、Ｘが、任意のアミノ酸であり、８位が、一次変異であり、ＣＨ

１ドメインにおけるＹＳＬＳＳＶＶＥＶ（配列番号９３）であり、８位が、一次変異又はＣＨ１ドメインにおけるＹＳＬＳＳＶＶＥＶ（配列番号９３）であり、８位が、一次変異、好ましくは１位及び４位、より好ましくは４位である。この実施形態における１位、４位、６位、及び９位は、以下の実施形態における１８０位、１８３位、１８５位、及び１８８位に対応する。この実施形態のアミノ酸配列のより長いバージョンは、表Ｃ及びＤに記載されており、この実施形態に記載されている二次変異を含むそれらのより長い配列は、当業者には理解されるであろう。

【０１０５】

以下及び実施例で更に論じられるように、本発明者らは、驚くべきことに、一次変異に対する二次変異（複数可）の相対位置が一次変異の免疫原性の低減に関連し得ることを特定した。それは、一次及び二次変異の相対的な位置が、ＭＨＣクラスＩＩなどの免疫原性を引き起こす受容体に対するポリペプチドの結合特性を変化させるために重要である可能性があるからである。

【０１０６】

一実施形態では、重鎖領域は、ＣＨ１ドメインを含み、二次変異は、ＣＨ１ドメインの１８０位、１８３位、及び／又は１８８位、好ましくは１８０位又は１８３位、より好ましくは１８３位にある（ＥＵ番号付けシステムによる）。

【０１０７】

一実施形態では、軽鎖領域は、ＣＫａｐｐａ又はＣｌａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインを含み、二次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣｌａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位及び／又は１０９位にある。

【０１０８】

一実施形態では、軽鎖領域は、ＶＬドメインを含み、二次変異は、ＶＬドメインの１２６位にある。

【０１０９】

特定の実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの以下の位置のうちの１つ以上である：ＶＬドメインの１１１位及び１０９位（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）１２６位。

【０１１０】

本発明の一実施形態では、二次変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１８０位、１８３位、及び１８８位、好ましくは１８０位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１１１位及び１０９位（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの１２６位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１１１】

特定の実施形態では、二次変異は、以下の位置のうちの２つ以上にある：ＣＨ１ドメインの１８０位、ＣＨ１ドメインの１８３位、ＣＨ１ドメインの１８８位、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位、及びＶＬドメインの１２６位、例えば、３つ以上、４つ以上、５つ以上、又はそれらの位置の６つ全て。

【０１１２】

本発明の一実施形態では、二次変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｙ１８０、Ｓ１８３、及びＶ１８８、好ましくはＹ１８０（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ａ１１１及びＴ１０９、若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ａ１１１及びＰ１０９（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は

（ｃ）ＶＬドメインのＩ１２６位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０１１３】
特定の実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上である：Ｙ１８０、Ｓ１８３、及びＶ１８８、好ましくはＹ１８０又はＳ１８３、より好ましくはＳ１８３（ＥＵ番号付けシステムによる）。
【０１１４】
特定の実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａドメインの以下の位置のうちの１つ以上である：Ａ１１１及びＴ１０９（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又はＶＬにおけるＩ１２６の位置（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。特定の代替的な実施形態では、二次変異は、ＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上である：Ａ１１１及びＰ１０９（Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる）。
【０１１５】
本発明の一実施形態では、二次変異は、以下からなる群から選択される：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｙ１８０Ｘ、Ｓ１８３Ｘ、及びＶ１８８Ｘ、好ましくはＹ１８０Ｘ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ａ１１１Ｘ及びＴ１０９Ｘ、又はＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ａ１１１Ｘ及びＰ１０９Ｘ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインのＩ１２６Ｘ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１１６】
特定の実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上である：Ｙ１８０Ｘ、Ｓ１８３Ｘ、及びＶ１８８Ｘ、好ましくはＹ１８０Ｘ又はＳ１８３Ｘ、より好ましくはＳ１８３Ｘ（ＥＵ番号付けシステムによる）。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１１７】
特定の実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａドメインの以下の変異のうちの１つ以上である：Ａ１１１Ｘ、及びＴ１０９Ｘ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は変異は、ＶＬドメインのＩ１２６Ｘ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）である。特定の代替的な実施形態では、二次変異は、ＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上である：Ａ１１１Ｘ及びＰ１０９Ｘ（ＥＵ番号付けシステムによる）。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１１８】
本発明の一実施形態では、二次変異は、以下からなる群から選択される：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｘ１８０Ａ／Ｇ／Ｉ／Ｎ／Ｓ／Ｔ／Ｖ／Ｗ、Ｘ１８３Ｎ／Ｔ、及びＸ１８８Ｇ、好ましくはＸ１８０Ｔ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｘ１１１Ｒ／Ｔ／Ｗ／Ｖ及びＸ１０９Ｐ、好ましくはＸ１１１Ｖ及びＸ１０９Ｐ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬのＸ１２６Ａ／Ｇ／Ｈ／Ｎ／Ｐ／Ｑ／Ｓ／Ｔ（ＩＭＧＴナンバリングシステムによる）。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１１９】
変異が論じられる文脈における「／」の使用は、代替的なアミノ酸を例示することであり、例えば、「Ｘ１８０Ａ／Ｇ／Ｉ／Ｎ／Ｓ／Ｔ／Ｖ／Ｗ」は、アミノ酸「Ｘ」の代替物として、Ａ又はＧ又はＩ又は又はＳ又はＴ又はＶ又はＷが１８０位に含まれ得ることを示す。
【０１２０】

特定の実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上である：Ｘ１８０Ａ／Ｇ／Ｉ／Ｎ／Ｓ／Ｔ／Ｖ／Ｗ、Ｘ１８３Ｎ／Ｔ、及びＸ１８８Ｇ、好ましくはＸ１８０Ｔ又はＸ１８３Ｎ／Ｔ、より好ましくはＸ１８３Ｎ／Ｔ（ＥＵ番号付けシステムによる）。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１２１】
特定の実施形態では、二次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの以下の変異のうちの１つ以上である：Ｘ１１１Ｒ／Ｔ／Ｗ／Ｖ及びＸ１０９Ｐ、好ましくはＸ１１１Ｖ及びＸ１０９Ｐ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は変異は、ＶＬのＸ１２６Ａ／Ｇ／Ｈ／Ｎ／Ｐ／Ｑ／Ｓ／Ｔ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）である。
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す
【０１２２】
例えば、二次変異は、以下からなる群から選択され得る：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｙ１８０Ａ、Ｙ１８０Ｇ、Ｙ１８０Ｉ、Ｙ１８０Ｎ、Ｙ１８０Ｓ、Ｙ１８０Ｔ、Ｙ１８０Ｖ、若しくはＹ１８０Ｗ、及び／又はＳ１８３Ｎ若しくはＳ１８３Ｔ、及び／又はＶ１８８Ｇ、好ましくはＹ１８０Ｔ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインのＡ１１１Ｒ、Ａ１１１Ｔ、Ａ１１１Ｗ、若しくはＡ１１１Ｖ、及び／又はＴ１０９Ｐ、好ましくはＴ１０９Ｐ及びＡ１１１Ｖ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）のうちの１つ以上の以下の変異、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの以下の変異のうちの１つ：Ｉ１２６Ａ、Ｉ１２６Ｇ、Ｉ１２６Ｈ、Ｉ１２６Ｎ、Ｉ１２６Ｐ、Ｉ１２６Ｑ、Ｉ１２６Ｓ、若しくはＩ１２６Ｔ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０１２３】
特定の例では、二次変異は、ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つである：Ｙ１８０Ａ、Ｙ１８０Ｇ、Ｙ１８０Ｉ、Ｙ１８０Ｎ、Ｙ１８０Ｓ、Ｙ１８０Ｔ、Ｙ１８０Ｖ、若しくはＹ１８０Ｗ、及び／又はＳ１８３Ｎ若しくはＳ１８３Ｔ、及び／又はＶ１８８Ｇ、好ましくはＹ１８０Ｔ、Ｓ１８３Ｎ、及び／又はＳ１８３Ｔ、より好ましくはＳ１８３Ｎ及び／又はＳ１８３Ｔ（ＥＵ番号付けシステムによる）。
【０１２４】
特定の例では、二次変異は、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの以下の変異のうちの１つ以上である：Ａ１１１Ｒ、Ａ１１１Ｔ、Ａ１１１Ｗ、若しくはＡ１１１Ｖ、及び／又はＴ１０９Ｐ、好ましくはＴ１０９Ｐ及び／又はＡ１１１Ｖ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又はＶＬドメインの以下の変異のうちの１つ：Ｉ１２６Ａ、Ｉ１２６Ｇ、Ｉ１２６Ｈ、Ｉ１２６Ｎ、Ｉ１２６Ｐ、Ｉ１２６Ｑ、Ｉ１２６Ｓ、若しくはＩ１２６Ｔ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０１２５】
一実施形態では、変異は、Ａ１１１Ｒではない。
【０１２６】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１８０位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖、好ましくは「Ｈ２」鎖にある。
【０１２７】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１８３位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖、好ましくは「Ｈ２」鎖にある。
【０１２８】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１８８位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖、好ましくは「Ｈ２」鎖にある。

【０１２９】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖、好ましくは「Ｈ１」鎖にある。

【０１３０】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖、好ましくは「Ｈ１」鎖にある。

【０１３１】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、本明細書に記載される「Ｌ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖、好ましくは「Ｈ１」鎖にある。

【０１３２】

特に好ましい実施形態では、二次変異は、二次変異対、例えば、ＶＬドメインの１２６位における変異及びＣＨ１ドメインの１８０位における変異である。

【０１３３】

好ましい態様では、二次変異対は、以下からなるリストから選択される位置にある：

●ＶＬドメインの１２６位及びＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＶＬドメインの１２６位及びＣＨ１ドメインの１８３位、
●ＶＬドメインの１２６位及びＣＨ１ドメインの１８８位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及びＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及びＣＨ１ドメインの１８３位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及びＣＨ１ドメインの１８８位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及びＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及びＣＨ１ドメインの１８３位、並びに
●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及びＣＨ１ドメインの１８８位、好ましくはＣＫａｐｐａドメインの１０９位及びＣＨ１ドメインの１８３位。

【０１３４】

特に好ましい実施形態では、二次変異対は、以下からなるリストから選択される：

●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、

●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、並びに
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
好ましくは：
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、並びに
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及びＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、最も好ましくはＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及びＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ。

【表５－１】

表Ｅ：本発明に関連するCKappa及びVL、又はCKappa/CLambda、アミノ酸配列の二次変異。CKappa/CLambdaドメインの109位は、X^{109}にあり、CKappa/CLambdaドメインの111位は、X^{111}にあり（EU又はKabat番号付けシステムによる）、VLドメインの126位は、X^{126}にある（IMGT番号付けシステムによる）。表Aで説明したように、最後のVLドメインアミノ酸は斜体で示され、第1のCKappa/CLambdaドメインアミノ酸は太字で示されている。

CKappa+VL又はCLambda+VL	アミノ酸配列	配列番号
CKappa+VL	TFGQGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	94
CKappa+VL	TFGQGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	95
CKappa+VL	TFGPGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	96
CKappa+VL	TFGGGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	97
CKappa+VL	TFGQGTRL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	98
CKappa+VL	TFGAGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAVFIFPPSDEQL	286
CKappa+VL	TFGQGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	99
CKappa+VL	TFGQGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	100
CKappa+VL	TFGPGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	101
CKappa+VL	TFGGGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	102
CKappa+VL	TFGQGTRL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	103
CKappa+VL	TFGAGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APSVFIFPPSDEQL	287
CKappa+VL	TFGQGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	104
CKappa+VL	TFGQGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	105
CKappa+VL	TFGPGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	106
CKappa+VL	TFGGGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	107
CKappa+VL	TFGQGTRL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	108
CKappa+VL	TFGAGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	294
CKappa+VL	V**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAV	109
CKappa+VL	L**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APAV	110
CKappa+VL	V**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	111
CKappa+VL	L**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**A	112

【表５－２】

CKappa	R**X**^{109}V**X**^{111}APAV	113
CKappa	R**X**^{109}V**X**^{111}A	114
CKappa	V**X**^{111}APAV	115
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPAVTLFPPSSEEL	116
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APAVTLFPPSSEEL	117
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPAVTLFPPSSEEL	118
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APAVTLFPPSSEEL	119
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPAVTLFPPSSEEL	120
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APAVTLFPPSSEEL	121
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPAVTLFPPSSEEL	122
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APAVTLFPPSSEEL	123
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPAVTLFPPSSEEL	124
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APAVTLFPPSSEEL	125
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPTVTLFPPSSEEL	126
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APSVTLFPPSSEEL	127
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPTVTLFPPSSEEL	128
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APSVTLFPPSSEEL	129
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPTVTLFPPSSEEL	130
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APSVTLFPPSSEEL	131
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPTVTLFPPSSEEL	132
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APSVTLFPPSSEEL	133
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}NPTVTLFPPSSEEL	134
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}APSVTLFPPSSEEL	135
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}N	136
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}A	137
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}N	138
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}A	139
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}N	140
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**Q**X**^{109}K**X**^{111}A	141

【表５－３】

CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QX^{109}KX^{111}N	142
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QX^{109}KX^{111}A	143
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QX^{109}KX^{111}N	144
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QX^{109}KX^{111}A	145
CLambda	GQX^{109}KX^{111}NPAV	146
CLambda	GQX^{109}KX^{111}APAV	147
CLambda	GQX^{109}KX^{111}N	148
CLambda	GQX^{109}KX^{111}A	149
CLambda	KX^{111}NPAV	150
CLambda	KX^{111}APAV	151

X^{109}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＴであり、好ましくはＰによって置き換えられる。

X^{111}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＡであり、好ましくはＲ又はＴ又はＷ又はＶによって置き換えられる。

X^{126}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＩであり、好ましくはＡ又はＧ又はＨ又はＮ又はＰ又はＱ又はＳ又はＴによって置き換えられる。

【０１３５】

一実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、かつ／又はＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、かつ／又はＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。特定の実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＣＫａｐｐａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＣＫａｐｐａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。更なる実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にある。更なる実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＣＫａｐｐａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。更なる実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＣＫａｐｐａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。

【０１３６】

特定の実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にある。代替的な特定の実施形態では、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にある。代替的な特定の実施形態では、表Ｅから選択されるアミノ酸配列において、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。変異がＸ１０９位、Ｘ１１１位、及びＸ１２６位のうちの１つ又は２つに存在しない場合、表Ａにおける対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置にあるアミノ酸が含まれることが理解され

るであろう。

【０１３７】

一実施形態では、アミノ酸配列は、Ｘ１０９及び／又はＸ１１１及び／又はＸ１２６を含む配列を含み、表Ｅから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有する。

【表６】

表Ｆ：本発明に関連するCH1アミノ酸配列の二次変異。EU番号付けシステムによれば、180位は、X^{180}にあり、183位は、X^{183}にあり、188位は、X^{188}にある。

Fcアイソタイプ	アミノ酸配列	配列番号
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTQTYICNV	152
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	153
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	154
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	155
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTQTYICNV	156
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	157
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	158
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	159
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTQTYICNV	160
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	161
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	162
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	163
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}P	164
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}P	165
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}P	166

X^{180}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＹであり、好ましくはＡ又はＧ又はＩ又はＮ又はＳ又はＴ又はＶ又はＷによって置き換えられる。

X^{183}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＳであり、好ましくはＮ又はＴによって置き換えられる。

X^{188}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＶであり、好ましくはＧによって置き換えられる。

【０１３８】

一実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位のＣＨ１ドメインの二次変異は、Ｘ１８０位にあり、かつ／又は１８３位は、Ｘ１８３位にあり、かつ／

又は１８８位は、X^{188}位にある。一実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{180}位にあり、１８３位は、X^{183}位にあり、１８８位は、X^{188}位にある。一実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{180}位にあり、１８３位は、X^{183}位にある。一実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{180}位にあり、１８８位は、X^{188}位にある。一実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８３位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{183}位にあり、１８８位は、X^{188}位にある。

【０１３９】

特定の実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８０位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{180}位にある。代替的な特定の実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８３位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{183}位にある。代替的な特定の実施形態では、表Ｆから選択されるアミノ酸配列において、１８８位のＣＨ１ドメインの二次変異は、X^{188}位にある。変異がX^{180}位、X^{183}位、及びX^{188}位のうちの１つ又は２つに存在しない場合、表Ｃの対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置にあるアミノ酸が含まれることが理解されるであろう。

【０１４０】

一実施形態では、アミノ酸配列は、X^{180}及び／又はX^{183}及び／又はX^{188}を含む配列を含み、表Ｆから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有する。

【０１４１】

上で論じたように、本明細書に記載のアミノ酸配列における変異の位置付けは数値を参照しているが、これは、これらの特定の実施形態と、それらの変異が更に論じられる他の実施形態との間の相互参照を可能にすることが理解されるであろう。したがって、開示されるアミノ酸配列内に記載される変異はまた、その配列の文脈に含まれ得るが、関連付けられた番号によって指定される全体的な位置には含まれないことも包含される。したがって、一例として、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬX^{180}ＳＬX^{183}ＳＶＶＥX^{188}ＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号１５６）のX^{180}位にある１８０位、及び／又はX^{183}位にある１８３位、及び／又はX^{188}位にある１８８位のＣＨ１ドメインの二次変異によって、二次変異が、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＸＳＬＸＳＶＶＥＸＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号１５６）のＸ位のうちの１つ以上であり得ることも含まれる。

【０１４２】

参照として、変異セット２－セット２ａ及びセット２ｂに列挙されている変異の任意の個別及び／又は任意の組み合わせ。セット２ａ－ＣＨ１の変異：Ｙ１８０Ａ、Ｙ１８０Ｇ、Ｙ１８０Ｉ、Ｙ１８０Ｎ、Ｙ１８０Ｓ、Ｙ１８０Ｔ、Ｙ１８０Ｖ、若しくはＹ１８０Ｗ、及び／又はＳ１８３Ｎ若しくはＳ１８３Ｔ、及び／又はＶ１８８Ｇ、好ましくはＹ１８０Ｔ及び／又はＳ１８３Ｔ。セット２ｂ－ＣＫａｐｐａドメインの変異：Ａ１１１Ｒ、Ａ１１１Ｔ、Ａ１１１Ｗ、若しくはＡ１１１Ｖ、及び／又はＴ１０９Ｐ、好ましくは：Ｔ１０９Ｐ及び／又はＡ１１１Ｖ、並びに／又は可変ドメイン軽鎖（ＶＬ）の変異：Ｉ１２６Ａ、Ｉ１２６Ｇ、Ｉ１２６Ｈ、Ｉ１２６Ｎ、Ｉ１２６Ｐ、Ｉ１２６Ｑ、Ｉ１２６Ｓ、若しくはＩ１２６Ｔ。

【０１４３】

更なる実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインの１８５位を更に含み得る（ＥＵ番号付けシステムによる）。

【０１４４】

更なる実施形態では、二次変異は、ＣＨ１ドメインのＶ１８５Ｘを更に含み得る（ＥＵ番号付けシステムによる）＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す。

【０１４５】

改善された純度変異

本明細書に記載の「改善された純度変異」は、「最適化ＲＵＢＹ（商標）」の変異、特に、「変異セット１」とも称され得る。

【０１４６】

「ＲＵＢＹ（商標）形式」の二重特異性ポリペプチドは、優れたレベルの純度で再現可能に産生され得るが、「改善された純度変異」を有する「最適化ＲＵＢＹ（商標）形式」の二重特異性ポリペプチドは、更に高いレベルの純度で再現可能に産生され得る。

【０１４７】

改善された純度変異が、本発明のポリペプチド（好ましくは二重特異性ポリペプチド）、並びに上記の一次変異及び／又は二次変異のうちのいずれかと組み合わせて使用され得ることが、当業者には理解されるであろう。

【０１４８】

本発明の一実施形態では、改善された純度変異は、ＶＨドメインの６５位にある（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１４９】

好ましい実施形態では、改善された純度変異は、ＶＨドメインのＸ６５Ｅ／Ａ／Ｉである。代替的な好ましい実施形態では、改善された純度変異は、ＶＨドメインのＴ６５Ｘである。

【０１５０】

更なる好ましい実施形態では、ＶＨドメインの改善された純度変異は、Ｔ６５Ｅ又はＴ６５Ａ又はＴ６５Ｉである。

【０１５１】

好ましい実施形態では、本明細書に記載される二重特異性抗体において、ＶＨドメインの６５位における改善された純度は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖、好ましくは「Ｈ２」鎖にある。

【表７】

表Ｇ：例示的なIGHV3生殖系列遺伝子ファミリーメンバーIGHV3-23*01における改善された純度変異。IMGT番号付けシステムによれば、VHドメインの65位は、X^{65}にある。CDR2は下線で示されている。X^{cn}は、X^{65}以外のCDR2のアミノ酸であり、式中、X^{c}は、任意のアミノ酸であり、nは、数3～12、好ましくは5～10、最も好ましくは7である－例えば、CDR2の場合、n=7であり、配列は、$X^{C}X^{C}X^{C}X^{C}X^{C}X^{C}X^{C}X^{65}$である。

アミノ酸配列	配列番号
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSX^{65}YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	167
PGKGLEWVSAISGSGGSX^{65}YYADSVKGRF	168
WVSAISGSGGSX^{65}YYADS	169
AISGSGGSX^{65}Y	170
ISGSGGSX^{65}	171
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AX^{cn}X^{65}YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	172
PGKGLEWVSAX^{cn}X^{65}YYADSVKGRF	173
WVSAX^{cn}X^{65}YYADS	173
AX^{cn}X^{65}Y	175

X^{65}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはTであり、好ましくはE又はA又はIによって置き換えられる。

【０１５２】

一実施形態では、ＶＨドメインの６５位における改善された純度変異は、表Ｇから選択されるアミノ酸配列のＸ６５位にある。

【０１５３】

一実施形態では、アミノ酸配列は、Ｘ６５を含む配列を含み、表Ｇから選択されるアミノ酸配列と１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有する。

【０１５４】

第３の態様では、本発明は、二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、

（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、

（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、

第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、

第２の重鎖領域が、ＶＨドメインを含み、ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位を含み、ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は回避する変異を含む。

【０１５５】

第３の態様発明の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、本発明の第２の態様に記載される変異のうちのいずれか、並びにそれに記載される任意の他の特徴を含み得る。

【０１５６】
本発明の第３の態様の特定の実施形態は、二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端にリンカーを介して融合され、
二重特異性抗が、免疫グロブリンの第１の重鎖領域、リンカー、及びＦａｂの第２の軽鎖領域を各々含む２つのＨ１鎖と、免疫グロブリンの第１の軽鎖領域を各々含む２つのＬ１鎖と、Ｆａｂの第２の重鎖領域を含む２つのＨ２鎖と、を含み、
２つの第２の重鎖領域（すなわち、Ｈ２）が、６５位に変異を含むＶＨドメインを含む（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０１５７】
参照として、変異セット１－可変ドメイン重（ＶＨ）における変異：
Ｔ６５Ｅ、Ｔ６５Ａ、Ｔ６５Ｉ。
【０１５８】
「最適化ＲＵＢＹ（商標）」の一次変異及び変異の特に好ましい組み合わせ
上で論じたように、本明細書に開示される一次変異のうちのいずれかを、本明細書に開示される最適化ＲＵＢＹ（商標）の二次変異と組み合わせることができ、更に最適化ＲＵＢＹ（商標）の改善された純度変異と組み合わせることができる。しかしながら、以下は、一次変異及び二次変異の特に好ましい組み合わせである。
【０１５９】
上で論じたように、一次変異及び二次変異の任意の組み合わせ、（ａ）及び（ｂ）における一次変異の両方のいずれか１つ以上などを、（ｃ）及び（ｄ）における以下の二次変異のうちのいずれか１つ以上、又は本明細書に記載のバリエーションと組み合わせて、同じポリペプチドで使用することができる：
（ａ）ＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｅ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａドメインのＳ１１４Ａ、並びに
（ｃ）ＣＨ１ドメインのＹ１８０Ｔ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＣＫａｐｐａドメインのＴ１０９Ｐ及び／若しくはＡ１１１Ｖ（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）。
【０１６０】
したがって、特定の実施形態では、一次変異及び二次変異を組み合わせたポリペプチドは、以下の変異を含み得る：
●ＣＨ１ドメインにおける：Ｙ１８０Ｔ及びＴ１８７Ｅ（ＥＵ番号付けシステムによる）、
●ＣＫａｐｐａドメインにおける：Ｔ１０９Ｐ及び／又はＡ１１１Ｖ、並びにＳ１１４Ａ（ＥＵ又はＫａｂａｔ番号付けシステムによる）。
【０１６１】
一実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａドメインの１１４位及び／又はＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異対であり、
二次変異は、以下からなるリストから選択される二次変異対である：
●ＶＬドメインの１２６位及び／又はＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＶＬドメインの１２６位及び／又はＣＨ１ドメインの１８３位、
●ＶＬドメインの１２６位及び／又はＣＨ１ドメインの１８８位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及び／又はＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及び／又はＣＨ１ドメインの１８３位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１０９位及び／又はＣＨ１ドメインの１８８位、

●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及び／又はＣＨ１ドメインの１８０位、
●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及び／又はＣＨ１ドメインの１８３位、並びに
●ＣＫａｐｐａドメインの１１１位及び／又はＣＨ１ドメインの１８８位。

【０１６２】

好ましい実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａドメインのＳ１１４Ａ及び／又はＣＨ１ドメインのＴ１８７Ｅの一次変異対であり、
二次変異は、以下からなるリストから選択される二次変異対である：

●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ａ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｇ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｉ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｙ１８０Ｗ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、並びに
ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、

好ましくは：

●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＶＬドメインの変異Ｉ１２６Ｓ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ、並びに
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ａ１１１Ｖ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｖ１８８Ｇ、最も好ましくは、
●ＣＫａｐｐａドメインの変異Ｔ１０９Ｐ及び／又はＣＨ１ドメインの変異Ｓ１８３Ｔ。

【表８－１】

表H：本発明に関連するCKappa及びVL、又はCKappa/CLambda、アミノ酸配列における一次変異及び二次変異の組み合わせ。CKappa/CLambdaドメインの109位における二次変異は、X^{109}にあり、CKappa/CLambdaドメインの111位における二次変異は、X^{111}であり、CKappa/CLambdaドメインの114位における一次変異は、X^{114}であり（EU又はKabat番号付けシステムによる）、VLドメインの126位における二次変異は、X^{126}である（IMGT番号付けシステムによる）。表Aで説明したように、最後のVLドメインアミノ酸は斜体で示され、第1のCKappa/CLambdaドメインアミノ酸は太字で示されている。

CKappa+VL又はCLambda+VL	アミノ酸配列	配列番号
CKappa+VL	TFGQGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	176
CKappa+VL	TFGQGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	177
CKappa+VL	TFGPGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	178
CKappa+VL	TFGGGTKV**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	179
CKappa+VL	TFGQGTRL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	180
CKappa+VL	TFGAGTKL**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**VFIFPPSDEQL	288
CKappa+VL	V**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**V	181
CKappa+VL	L**X^{126}**I*K***RX^{109}**VX^{111}**APX^{114}**V	182
CKappa	R**X^{109}**VX^{111}**APX^{114}**V	183
CKappa	V**X^{111}**APX^{114}**V	184
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**NPX^{114}**VTLFPPSSEEL	185
CLambda+VL	VFGTGTKVTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**APX^{114}**VTLFPPSSEEL	186
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**NPX^{114}**VTLFPPSSEEL	187
CLambda+VL	VFGGGTKLTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**APX^{114}**VTLFPPSSEEL	188
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**QX^{109}**KX^{111}**NPX^{114}**VTLFPPSSEEL	189
CLambda+VL	VFGGGTQLII*L***G**QX^{109}**KX^{111}**APX^{114}**VTLFPPSSEEL	190
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**NPX^{114}**VTLFPPSSEEL	191
CLambda+VL	VFGEGTELTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**APX^{114}**VTLFPPSSEEL	192
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**NPX^{114}**VTLFPPSSEEL	193
CLambda+VL	VFGGGTQLTV*L***G**QX^{109}**KX^{111}**APX^{114}**VTLFPPSSEEL	194

【表８－２】

CLambda	GQX^{109}KX^{111}NPX^{114}V	195
CLambda	GQX^{109}KX^{111}APX^{114}V	196
CLambda	KX^{111}NPX^{114}V	197
CLambda	KX^{111}APX^{114}V	198

X^{114}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＴ又はＳであり、好ましくはＡによって置き換えられる。

X^{109}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＴであり、好ましくはＰによって置き換えられる。

X^{111}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＡであり、好ましくはＲ又はＴ又はＷ又はＶによって置き換えられる。

X^{126}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＩであり、好ましくはＡ又はＧ又はＨ又はＮ又はＰ又はＱ又はＳ又はＴによって置き換えられる。

【０１６３】

一実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、かつ／又はＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、かつ／又はＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。特定の実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＣＫａｐｐａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。更なる実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にある。更なる実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａドメインの１０９位における二次変異は、Ｘ１０９位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。更なる実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。特定の実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１０９位における一次変異は、Ｘ１０９位にある。代替的な特定の実施形態では、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａドメインの１１１位における二次変異は、Ｘ１１１位にある。別の特定の実施形態では、表Ｈから選択されるアミノ酸配列において、１１４位における一次変異は、Ｘ１１４位にあり、ＶＬドメインの１２６位における二次変異は、Ｘ１２６位にある。変異がＸ１０９位、Ｘ１１１位、及びＸ１２６位のうちの１つ又は２つに存在しない場合、表Ａにおける対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置にあるアミノ酸が含まれることが理解されるであろう。

【０１６４】

一実施形態では、アミノ酸配列は、表Ｈから選択されるアミノ酸配列と、１０％以上、

２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有するＸ１１４及びＸ１０９及び／又はＸ１１１及び／又はＸ１２６を含む配列を含む。変異がＸ１０９位、Ｘ１１１位、及びＸ１２６位のうちの１つ又は２つに存在しない場合、表Ａの対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置にあるアミノ酸が含まれることが理解されるであろう。

【表９】

表Ｉ：本発明に関連するCH1アミノ酸配列の二次変異。EU番号付けシステムによれば、180位は、X^{180}にあり、183位は、X^{183}にあり、188位は、X^{188}にある。

Fcアイソタイプ	アミノ酸配列	配列番号
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTQTYICNV	199
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSNFGTQTYTCNV	200
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTQTYTCNV	201
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTKTYTCNV	202
IgG1/IgG2/ IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$P	203

X^{187}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＴであり、好ましくはＥ又はＤによって置き換えられる。

X^{180}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＹであり、好ましくはＡ又はＧ又はＩ又はＮ又はＳ又はＴ又はＶ又はＷによって置き換えられる。

X^{183}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＳであり、好ましくはＮ又はＴによって置き換えられる。

X^{188}は、任意のアミノ酸であるが、好ましくはＶであり、好ましくはＧによって置き換えられる。

【０１６５】

一実施形態では、表Ｉから選択されるアミノ酸配列において、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異は、Ｘ１８７位にあり、１８０位における二次変異は、Ｘ１８０位にあり、かつ／又は１８３位における二次変異は、Ｘ１８３位にあり、かつ／又は１８８位における二次変異は、Ｘ１８８位にある。一実施形態では、表Ｉから選択されるアミノ酸配列において、ＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異はＸ１８７位にあり、１８０位における二次変異は、Ｘ１８０位にあり、１８３位における二次変異は、Ｘ１８３位にあり、１８８位における二次変異は、Ｘ１８８位にある。一実施形態では、表Ｉから選択されるアミノ酸配列において、ＣＨ１ドメインの１８７位にある一次変異は、Ｘ１８７位にあり、１８０位における二次変異は、Ｘ１８０位にあり、１８３位における二次変異は、Ｘ１８３位にある。一実施形態では、表Ｉから選択されるアミノ酸配列において、ＣＨ１ドメインの１８７位の一次変異は、Ｘ１８７位にあり、１８０位における二次変異は、Ｘ１８０位にあり、１８８位における二次変異は、Ｘ１８８位にある。一実施形態では、表Ｉから選択されるアミノ酸配列において、ＣＨ１ドメインの１８７位の一次変異は、Ｘ１８７位にあり、１８３位における二次変異は、Ｘ１８３位にあり、１８８位における二次変異は、Ｘ１８８位にある。Ｘ１８０位、Ｘ１８３位、及びＸ１８８位のうちの１つ又は２つに変異が存在しない場合、表Ｃにおける対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置

にあるアミノ酸が含まれることが理解されるであろう。
【０１６６】
一実施形態では、アミノ酸配列は、表Ｉから選択されるアミノ酸配列と、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上の配列同一性を有するＸ^{187}及びＸ^{180}及び／又はＸ^{183}及び／又はＸ^{188}を含む配列を含む。変異がＸ^{180}位、Ｘ^{183}位、及びＸ^{188}位のうちの１つ又は２つに存在しない場合、表Ｃの対応する野生型アミノ酸配列からの同じ位置にあるアミノ酸が含まれることが理解されるであろう。
【０１６７】
上で論じたように、本明細書に記載のアミノ酸配列における変異の位置付けは数値を参照しているが、これは、これらの特定の実施形態と、それらの変異が更に論じられる他の実施形態との間の相互参照を可能にすることが理解されるであろう。したがって、開示されるアミノ酸配列内に記載される変異はまた、その配列の文脈に含まれ得るが、関連付けられた番号によって指定される全体的な位置には含まれないことも包含される。したがって、一例として、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＸ^{180}ＳＬＸ^{183}ＳＶＶＸ^{187}Ｘ^{188}ＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号１９９）のＣＨ１ドメインの１８７位における一次変異が、Ｘ^{187}位にあり、１８０位における二次変異が、Ｘ^{180}位にあり、かつ／又は１８３位における二次変異が、Ｘ^{183}位にあり、かつ／又は１８８位における二次変異が、Ｘ^{188}位にあることによって、アミノ酸配列ＡＶＬＱＳＳＧＬＸ^{s}ＳＬＸ^{s}ＳＶＶＸ^{p}Ｘ^{s}ＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ（配列番号１９９）の一次変異が、Ｘ^{p}位にあり、二次変異が、Ｘ^{s}位のうちの１つ以上であり得ることも含まれる。
【０１６８】
一実施形態では、一次変異は、ＣＫａｐｐａドメインの１１４位及びＣＨ１ドメインの１８７位の一次変異対であり、
二次変異は、以下の位置：ＣＨ１ドメインの１８０位、ＣＨ１ドメインの１８３位、ＣＨ１ドメインの１８８位、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位、ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位、及びＶＬドメインの１２６位のうちの２つ以上にあり、
かつ／又はポリペプチドは、ＶＨドメインの６５位における変異を更に含む。
【０１６９】
第４の態様では、本発明は、以下を含む二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
ポリペプチドが、重鎖領域と軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又はポリペプチドの免疫原性を増加させ、
ポリペプチドが、１つ以上の一次変異によって引き起こされる免疫原性応答及び／又は免疫原性を誘導する予測されたリスクを低減又は回避するための１つ以上の二次変異を含む。
【０１７０】
本発明の第４の態様の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、本発明の第１及び／又は第２の態様に記載される変異のうちのいずれか、並びにそれに記載される任意の他の特徴を含み得る。
【０１７１】
本発明の第４の態様の特定の実施形態は、二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、

（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端にリンカーを介して融合され、
二重特異性抗が、免疫グロブリンの第１の重鎖領域、リンカー、及びＦａｂの第２の軽鎖領域を各々含む２つのＨ１鎖と、免疫グロブリンの第１の軽鎖領域を各々含む２つのＬ１鎖と、Ｆａｂの第２の重鎖領域を含む２つのＨ２鎖と、を含み、
二重特異性抗体が、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくは、ＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及び／又は２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８７位（ＥＵ番号付けシステムによる）における変異を含み、
二重特異性抗体が、以下の位置：２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８０位、２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８３位、２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８８位、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位、及び２つのＨ１鎖のＶＬドメインの１２６位の２つ以上の変異を含む。

【０１７２】

第５の態様では、本発明は、二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端に融合され、
ポリペプチドが、重鎖領域と軽鎖領域との会合を促進するための１つ以上の一次変異を含み、かかる変異が、免疫原性応答を誘導する予測されたリスクを増加させ、かつ／又はポリペプチドの免疫原性を増加させ、
ポリペプチドが、１つ以上の一次変異によって引き起こされる免疫原性応答及び／又は免疫原性を誘導する予測されたリスクを低減又は回避するための１つ以上の二次変異を含み、
第２の重鎖領域が、ＶＨドメインを含み、ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位を含み、ＶＨドメインが、プロテインＡ結合部位へのプロテインＡの結合を低減又は停止する変異を含む。

【０１７３】

本発明の第３の態様の第５の実施形態では、ポリペプチドは、本発明の第１及び／又は第２の態様に記載される変異のうちのいずれか、並びにそれに記載される任意の他の特徴を含み得る。

【０１７４】

本発明の第５の態様の特定の実施形態は、二重特異性抗体を提供し、二重特異性抗体が、
（ａ）第１の抗原に対する特異性を有する免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子が、２つの第１の重鎖領域及び２つの第１の軽鎖領域を含む、免疫グロブリン分子と、
（ｂ）第２の抗原に対する特異性を有する２つのＦａｂ断片であって、Ｆａｂ断片が、第２の重鎖領域及び第２の軽鎖領域を含む、Ｆａｂ断片と、を含み、
第２の軽鎖領域が、第１の重鎖領域のＣ末端にリンカーを介して融合され、
二重特異性抗が、免疫グロブリンの第１の重鎖領域、リンカー、及びＦａｂの第２の軽鎖領域を各々含む２つのＨ１鎖と、免疫グロブリンの第１の軽鎖領域を各々含む２つのＬ１

鎖と、Ｆａｂの第２の重鎖領域を含む２つのＨ２鎖と、を含み、
二重特異性抗体が、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１４位（ＥＵ若しくはＫａｂａｔ番号付けシステムによる）及び／又は２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８７位（ＥＵ番号付けシステムによる）における変異を含み、
二重特異性抗体が、以下の位置：２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８０位、２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８３位、２つのＨ２鎖のＣＨ１ドメインの１８８位、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１１１位、２つのＨ１鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１０９位、及び２つのＬ１鎖のＶＬドメインの１２６位の２つ以上の変異を含む。
２つの第２の重鎖領域（すなわち、Ｈ２）が、６５位に変異を含むＶＨドメインを含む（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１７５】

本明細書に記載の変異と組み合わせることができる追加の変異

本明細書に記載の「一次変異」、「二次変異」、及び「改善された純度変異」に加えて、以下の「追加の変異」もまた、本発明のポリペプチドに含まれ得る。これらの追加の変異は、係属中のＵＫ特許出願第１８２０５５６．７号及びＰＣＴ出願第ＷＯ２０２０／１２７３５４号における「ＲＵＢＹ（商標）形式」について記載されている変異であり、本明細書に記載の一次変異ではない。

【０１７６】

一実施形態では、追加の変異は、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドと免疫グロブリンの軽鎖ポリペプチドとの会合を促進するための１つ以上の変異、及び／又はＦａｂの重鎖ポリペプチドとＦａｂの軽鎖ポリペプチドとの会合を促進するための１つ以上の変異である。

【０１７７】

一実施形態では、１つ以上の追加の変異は、凝集体及びＦａｂ副産物の形成を防止する。

【０１７８】

一実施形態では、追加の変異が、立体障害及び／又は電荷間の不適合性を生成することによって、凝集体及び／又は副産物の形成を防止し得ることが、当業者には理解されるであろう。

【０１７９】

「立体障害」とは、立体的な嵩張りに起因する反応の遅延を意味し、すなわち、アミノ酸分子のサイズは、そうでなければより小さいアミノ酸が存在する場合に生じ得る２つのタンパク質表面の会合を防止する。

【０１８０】

「電荷間の不適合性」とは、電荷が不適合性であり、生成物の形成を妨げるため、不要な生成物が形成されないことを意味する（例えば、不要な生成物の形成を妨げる２つの負に帯電した部分が存在する可能性がある）。

【０１８１】

上記のように、当該追加の変異は、例えば、凝集体又は副産物Ｆａｂ断片の形成を制限する表面を生成することによって、Ｆａｂ副産物及び／又は凝集体の形成を制限する。一実施形態では、一次変異は、立体障害及び／又は電荷間の不適合性を生成することによって（誤った鎖の電荷不適合性をもたらす）Ｆａｂ副産物の形成を防止する。一次変異はまた、例えば、塩又はジスルフィド架橋を生成することにより、正しい鎖間（すなわち、第１の重鎖ポリペプチドと第１の軽鎖ポリペプチドとの間、及び／又は第２の重鎖ポリペプチドと第２の軽鎖ポリペプチドとの間）の相互作用を促進し得る。

【０１８２】

したがって、追加の変異は、二重特異性ポリペプチドの形成に有利であり得る。

【０１８３】

一実施形態では、製造中に形成される凝集体の割合は、２５％以下である。任意選択的に、凝集体の割合は、２０％、１７．５％、１５％、１３．５％、又は１０％以下である。好ましくは、凝集体の割合は、１０％未満である。任意選択的に、これらの測定は、二重特異性ポリペプチドの鎖が等しい比率で（例えば、生産中に３つの鎖が使用される場合、１：１：１の比率で）トランスフェクトされる場合に行われる。

【０１８４】

あるいは、鎖のトランスフェクション比を最適化することができる。任意選択的に、鎖のトランスフェクション比を最適化する場合の凝集体の割合は、３．５％、３％、２．５％、又は２％以下であり得る。

【０１８５】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、各々が２つの機能的に適合する変異を含む１つ以上の変異対を含む。

【０１８６】

「機能的に適合する変異」とは、変異が相補的な機能を有することを意味し、例えば、対の一方の（１つの鎖における）変異は、正に帯電した領域を形成する変異であり得、他方の（別の鎖における）変異は、負に帯電した領域を形成する変異であり得る。これらの変異は、機能的に適合する方法で一緒に作用し、それぞれの鎖の会合を促進する。

【０１８７】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、以下の領域群のうちの１つ以上において、１つ以上の追加の変異対を含む：

（ａ）免疫グロブリンのＣＨ１領域及びＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ領域、並びに／又は

（ｂ）ＦａｂのＣＨ１領域及びＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ領域、及び／又は

（ｃ）免疫グロブリンのＶＬ及びＶＨ領域、並びに／又は

（ｄ）ＦａｂのＶＬ及びＶＨ領域。

【０１８８】

したがって、一実施形態では、追加の変異対は、Ｆａｂ及び／又は免疫グロブリンのＣＨ１領域及びＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａ領域にあり、一次変異対は、以下から選択される：

（ａ）凹部及び凸部表面の変異（すなわち、立体変異）、並びに／又は

（ｂ）疎水性スワップ変異、並びに／又は

（ｃ）荷電変異（すなわち、塩変異）、並びに／又は

（ｄ）ジスルフィド架橋の形成をもたらす変異。

【０１８９】

追加の変異対は、あるいは、又は加えて、Ｆａｂ及び／又は免疫グロブリンのＶＨ及びＶＬ領域にあり得、ＶＨ及びＶＬ領域の一次変異対は、以下から選択される：

（ａ）荷電変異（すなわち、塩変異）、及び／又は

（ｂ）二重荷電変異、及び／又は

（ｃ）ジスルフィド架橋の形成をもたらす変異。

【０１９０】

本発明の一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：

（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１６８位、１７０位、及び１４５位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は

（ｂ）ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：１３２～１３８位、１７３～１７９位、１３０～１３６位、１１１～１１７位、及び１３４～１４０位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は

（ｃ）ＶＬの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、１１７～１２３位、及び４６～５２位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は

（ｄ）ＶＨの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、４６～５２位、及び１１７～１２３位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１９１】
本発明の一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１６８位、１７０位、及び１４５位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：１３２～１３８位、１７３～１７９位、１３０～１３６位、１１１～１１７位、及び１３４～１４０位（Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、１１７～１２３位、及び４６～５２位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、４６～５２位、及び１１７～１２３位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１９２】
本発明の一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１６８位、１７０位、及び１４５位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：１３２～１３８位、１７３～１７９位、１３０～１３６位、１１１～１１７位、及び１３４～１４０位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、１１７～１２３位、及び４６～５２位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨの以下の位置範囲のうちの１つ以上から選択される位置：４１～４７位、４６～５２位、及び１１７～１２３位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１９３】
上に与えられた範囲の各々における１つの変異は、対応するドメイン／鎖のアミノ酸と接触する位置となるため、したがって、鎖間の関連する界面であるため、関連する機能的変異となる。

【０１９４】
したがって、関連する機能的特徴は、位置が他の鎖上の対応する位置に接触するかどうか、すなわち、ＶＬ鎖の対応する位置に接触するＶＨ鎖の位置が関連する位置であるか、又はＣＨ１鎖の位置に接触するＣＬａｍｂｄａの位置が関連する位置であるかどうかであるため、上に与えられた位置範囲における追加の変異が好適であることが当業者には理解されるであろう。

【０１９５】
本発明の好ましい実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１６８位、１７０位、及び１４５位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１１４位、１３３位、１３５位、１３７位、及び１７６位（Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの以下の位置のうちの１つ以上：４４位、４９位、及び１２０位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨドメインの以下の位置のうちの１つ以上：４４位、４９位、及び１２０位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１９６】
本発明の一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１６８位、１７０位、及び１４５位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａ若しくはＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：１

１４位、１３３位、１３５位、１３７位、及び１７６位（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの以下の位置のうちの１つ以上：４４位、４９位、及び１２０位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨドメインの以下の位置のうちの１つ以上：４４位、４９位、及び１２０位（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。

【０１９７】

一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される：
ＶＨ　Ｘ４４Ｒ／Ｅ／Ｄ／Ｋ、Ｘ４９Ｃ、Ｘ１２０Ｋ
ＶＬ　Ｘ４４Ｒ／Ｅ／Ｄ／Ｋ、Ｘ４９Ｄ　Ｘ１２０Ｃ
ＣＨ１　Ｘ１６８Ａ／Ｇ、Ｘ１７０Ｇ／Ａ、及びＸ１４５Ｑ
ＣＫａｐｐａ／ＣＬａｍｂｄａ　Ｘ１１４Ａ、Ｘ１３３Ｔ、Ｘ１３５Ｙ／Ｗ、Ｘ１３７Ｋ／Ｒ／Ｈ、Ｘ１７６Ｗ／Ｖ／Ｙ
＊番号付けは、ＶＨ／ＶＬドメインについてはＩＭＧＴシステム、及び定常ドメインについてはＥＵ番号付けシステム
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す

【０１９８】

変異が論じられる文脈における「／」の使用は、代替的なアミノ酸を例示することであり、例えば、「Ｘ４４Ｒ／Ｅ／Ｄ／Ｋ」は、アミノ酸「Ｘ」の代替物として、Ｒ又はＥ又はＤ又はＫが４４位に含まれ得ることを示す。

【０１９９】

一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される：
ＶＨ　Ｘ４４Ｒ／Ｅ／Ｄ／Ｋ、Ｘ４９Ｃ、Ｘ１２０Ｋ
ＶＬ　Ｘ４４Ｒ／Ｅ／Ｄ／Ｋ、Ｘ４９Ｄ　Ｘ１２０Ｃ
ＣＨ１　Ｘ１６８Ａ／Ｇ、Ｘ１７０Ｇ／Ａ、Ｘ１４５Ｑ
ＣＫａｐｐａ／ＣＬａｍｂｄａ　Ｘ１１４Ａ、Ｘ１３３Ｔ、Ｘ１３５Ｙ／Ｗ、Ｘ１３７Ｋ／Ｒ／Ｈ、Ｘ１７６Ｗ／Ｖ／Ｙ
＊番号付けは、ＶＨ／ＶＬドメインについてはＩＭＧＴシステム、及び定常ドメインについてはＫａｂａｔ番号付けシステム
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す

【０２００】

一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される：
ＶＨ　Ｑ４４Ｘ、Ｇ４９Ｘ、Ｑ１２０Ｘ
ＶＬ　Ｑ４４Ｘ、Ａ４９Ｘ、Ｑ１２０Ｘ
ＣＨ１　Ｈ１６８Ｘ、Ｆ１７０Ｘ、Ｌ１４５Ｘ、
ＣＫａｐｐａ／ＣＬａｍｂｄａ　Ｓ／Ｔ１１４Ｘ、Ｖ１３３Ｘ、Ｌ１３５Ｘ、Ｎ／Ｓ１３７Ｘ、Ｓ１７６Ｘ
＊番号付けは、ＶＨ／ＶＬドメインについてはＩＭＧＴシステム、及び定常ドメインについてはＥＵ番号付けシステム
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す

【０２０１】

一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される：
ＶＨ　Ｑ４４Ｘ、Ｇ４９Ｘ、Ｑ１２０Ｘ
ＶＬ　Ｑ４４Ｘ、Ａ４９Ｘ、Ｑ１２０Ｘ
ＣＨ１　Ｈ１６８Ｘ、Ｆ１７０Ｘ、Ｌ１４５Ｘ
ＣＫａｐｐａ／ＣＬａｍｂｄａ　Ｓ／Ｔ１１４Ｘ、Ｖ１３３Ｘ、Ｌ１３５Ｘ、Ｎ／Ｓ１３７Ｘ、Ｓ１７６Ｘ
＊番号付けは、ＶＨ／ＶＬドメインについてはＩＭＧＴシステム、及び定常ドメインについてはＫａｂａｔ番号付けシステム
＊Ｘは、任意のアミノ酸を指す

【０２０２】
本発明の一実施形態では、追加の変異は、以下からなる群から選択される位置にある：（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｈ１６８、Ｆ１７０、及びＬ１４５（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｌ１３５、Ｓ１７６、Ｖ１３３、及びＮ１３７（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又はＣＬａｍｂｄａドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｌ１３５、Ｓ１７６、Ｖ１３３、及びＳ１３７（Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｑ４４、Ｑ１２０、及びＡ４９（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨドメインの以下の位置のうちの１つ以上：Ｑ４４、Ｇ４９、及びＱ１２０（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０２０３】
例えば、追加の変異は、以下からなる群から選択され得る：
（ａ）ＣＨ１ドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｈ１６８Ａ、Ｆ１７０Ｇ、及びＬ１４５Ｑ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｂ）ＣＫａｐｐａドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｌ１３５Ｙ、Ｓ１７６Ｗ、Ｖ１３３Ｔ、Ｓ１７６Ｖ、及びＮ１３７Ｋ（ＥＵ番号付けシステムによる）、並びに／又はＣＬａｍｂｄａドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｌ１３５Ｙ、Ｓ１７６Ｗ、Ｖ１３３Ｔ、Ｓ１７６Ｖ、及びＳ１３７Ｋ（Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｃ）ＶＬドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｑ４４Ｒ、Ｑ４４Ｅ、Ｑ１２０Ｃ、Ｑ４４Ｄ、及びＡ４９Ｄ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）、並びに／又は
（ｄ）ＶＨドメインの以下の変異のうちの１つ以上：Ｑ４４Ｅ、Ｑ４４Ｒ、Ｇ４９Ｃ、Ｑ４４Ｋ、及びＱ１２０Ｋ（ＩＭＧＴ番号付けシステムによる）。
【０２０４】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＨドメインの４４位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。
【０２０５】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＬドメインの４４位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖にある。
【０２０６】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＨドメインの４９位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。
【０２０７】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＬドメインの４９位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖にある。
【０２０８】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＨドメインの１２０位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。
【０２０９】
好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＶＬドメインの１２０位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖にある。
【０２１０】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１６８位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。

【０２１１】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１７０位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。

【０２１２】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＨ１ドメインの１４５位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ２」鎖にある。

【０２１３】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３３位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖にある。

【０２１４】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３５位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｌ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ１」鎖にある。

【０２１５】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１７６位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｌ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｈ１」鎖にある。

【０２１６】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３７位における追加の変異は、本明細書に記載される「Ｈ１」鎖及び／又は本明細書に記載される「Ｌ１」鎖にある。

【０２１７】

特定の実施形態では、追加の変異は以下のとおりである：

●ＶＨドメインの４４位（Ｑ４４Ｒ及び／又はＱ４４Ｅなど）にある、

●ＶＬドメインの４４位（Ｑ４４Ｒ及び／又はＱ４４Ｅなど）にある、

●ＣＨ１ドメインの１６８位及び１７０位（Ｈ１６８Ａ及びＦ１７０Ｇなど）にある、並びに

●ＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３７位、１３５位、及び１７６位（Ｎ１３７Ｋ又はＳ１３７Ｋ、Ｌ１３５Ｙ及びＳ１７６Ｗなど）にある。

【０２１８】

特に好ましい実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体において、追加の変異は以下のとおりである：

●「Ｈ１」鎖のＶＨドメインの４４位（Ｑ４４Ｒなど）にある、

●「Ｈ１」鎖のＶＬドメインの４４位（Ｑ４４Ｒなど）にある、

●「Ｈ２」鎖のＶＨドメインの４４位（Ｑ４４Ｅなど）にある、

●「Ｌ１」鎖のＶＬドメインの４４位（Ｑ４４Ｅなど）にある、

●「Ｈ１」鎖のＣＨ１ドメインの１６８位及び１７０位（Ｈ１６８Ａ及びＦ１７０Ｇなど）にある、

●「Ｈ１」鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３７位（Ｎ１３７Ｋ又はＳ１３７Ｋなど）にある、並びに

●「Ｌ１」鎖のＣＫａｐｐａ又はＣＬａｍｂｄａ（好ましくはＣＫａｐｐａ）ドメインの１３５位及び１７６位（Ｌ１３５Ｙ及びＳ１７６Ｗなど）にある。

【０２１９】

ポリペプチド結合標的

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、四価であり、２つの抗原の各々に二価で結合することが可能である。

【０２２０】

一実施形態では、二重特異性ポリペプチドは、２つのアームを有する抗体として配置された免疫グロブリンを含み、したがって、第１の抗原に対する２つの結合部位と、各々が第２の抗原に対する結合部位を提供するＦａｂ断片の２つの結合部位と、を含む。したがって、第１の抗原に対して２つの結合部位があり、第２の抗原に対して２つの結合部位がある。

【０２２１】

一実施形態では、抗原（第１の抗原及び／又は第２の抗原など）は、免疫調節因子である。

【０２２２】

「免疫調節因子」とは、免疫応答又は免疫系の機能を修飾することが可能である標的を意味する。一実施形態では、免疫調節因子は、チェックポイント分子である。「チェックポイント分子」とは、免疫系の調節因子を意味する。

【０２２３】

チェックポイント分子（ＣＤ４０など）が、刺激性チェックポイント分子であっても抑制性チェックポイント分子であってもよいことが、当業者には理解されるであろう。

【０２２４】

一実施形態では、抗原（第１の抗原及び／又は第２の抗原など）は、腫瘍細胞関連抗原（ＴＡＡ）である。

【０２２５】

したがって、腫瘍細胞関連抗原は、以下からなる群から選択され得る：

ａ）変異したがん遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の産物、

ｂ）過剰発現又は異常発現した細胞タンパク質、

ｃ）発がん性ウイルスによって産生された腫瘍抗原、

ｄ）がん胎児性抗原、

ｅ）変化した細胞表面糖脂質及び糖タンパク質、

ｆ）細胞型特異的分化抗原、

ｇ）低酸素誘導性抗原、

ｈ）ＭＨＣクラスＩによって提示される腫瘍ペプチド、

ｉ）上皮腫瘍抗原、

ｊ）血液学的腫瘍関連抗原、

ｋ）がん精巣抗原、並びに

ｌ）黒色腫抗原。

【０２２６】

一実施形態では、ＴＡＡは、ＥｐＣＡＭ、５Ｔ４、及び／又はＣＥＡＣＡＭ５である。

【０２２７】

バリアント

本明細書に記載のポリペプチド又はその結合ドメイン（ＥｐＣＡＭ又はＣＤ４０結合ドメインなど）は、ポリペプチド又は結合ドメインが標的への結合を保持している限り、本明細書に列挙されている特定のアミノ酸配列のうちのいずれかのバリアント又は断片を含み得る。一実施形態では、抗体のバリアント又は抗原結合断片は、本明細書に列挙されている配列のＣＤＲ配列を保持し得る。

【０２２８】

本明細書中に列挙されている重鎖又は軽鎖アミノ酸配列のうちのいずれか１つの断片は、当該アミノ酸配列からの少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも１８個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも５０個、少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なく

とも８０個、少なくとも９０個、又は少なくとも１００個の連続アミノ酸を含み得る。

【０２２９】

本明細書に列挙される重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列のうちのいずれか１つのバリアントは、当該配列の置換、欠失、又は付加バリアントであり得る。バリアントは、当該配列からの１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、最大１０個、最大２０個、最大３０個以上のアミノ酸置換及び／又は欠失を含み得る。「欠失」バリアントは、個々のアミノ酸の欠失、２つ、３つ、４つ、若しくは５つのアミノ酸などのアミノ酸の小群の欠失、又は特定のアミノ酸ドメイン若しくは他の特徴の欠失など、より大きなアミノ酸領域の欠失を含んでもよい。「置換」バリアントは、好ましくは、１つ以上のアミノ酸を同数のアミノ酸に置き換え、保存的なアミノ酸置換を行うことを伴う。例えば、アミノ酸は、類似の特性を有する代替的なアミノ酸、例えば、別の塩基性アミノ酸、別の酸性アミノ酸、別の中性アミノ酸、別の荷電アミノ酸、別の親水性アミノ酸、別の疎水性アミノ酸、別の極性アミノ酸、別の芳香族アミノ酸、又は別の脂肪族アミノ酸で置換されてもよい。好適な置換基を選択するために使用することのできる２０種の主なアミノ酸のいくつかの特性は、以下のとおりである。

【表１０】

Ala、A	脂肪族、疎水性、中性	Met、M	疎水性、中性
Cys、C	極性、疎水性、中性	Asn、N	極性、親水性、中性
Asp、D	極性、親水性、荷電(-)	Pro、P	疎水性、中性
Glu、E	極性、親水性、荷電(-)	Gln、Q	極性、親水性、中性
Phe、F	芳香族、疎水性、中性	Arg、R	極性、親水性、荷電(+)
Gly、G	脂肪族、中性	Ser、S	極性、親水性、中性
His，H	芳香族、極性、親水性、荷電(+)	Thr、T	極性、親水性、中性
Ile、I	脂肪族、疎水性、中性	Val、V	脂肪族、疎水性、中性
Lys、K	極性、親水性、荷電(+)	Trp、W	芳香族、疎水性、中性
Leu、L	脂肪族、疎水性、中性	Tyr、Y	芳香族、極性、疎水性

【０２３０】

本明細書におけるアミノ酸は、正式名、３文字表記、又は１文字表記によって称され得る。

【０２３１】

好ましい「誘導体」又は「バリアント」としては、天然に存在するアミノ酸の代わりに、配列内に現れるアミノ酸がその構造的類似体であるものが挙げられる。配列内で使用されるアミノ酸は、抗体の機能が著しく悪影響を受けない限り、誘導体化又は修飾、例えば標識されてもよい。

【０２３２】

上記の誘導体及びバリアントは、抗体の合成中に、若しくは産生後の修飾によって調製されてもよく、又は抗体が組換え型である場合は、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は核酸の酵素的切断及び／若しくは連結反応の既知の技術を使用して調製されてもよい。

【０２３３】

好ましくは、バリアントは、本明細書に開示される配列に示されるような配列と、６０％超、又は７０％超、例えば７５若しくは８０％、好ましくは８５％超、例えば９０若しくは９５％超のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を有する。アミノ酸同一性のこのレ

ベルは、関連した配列番号の配列の全長にわたって、又は全長ポリペプチドのサイズに応じて、２０、３０、５０、７５、１００、１５０、２００以上のアミノ酸にわたるなど、配列の一部にわたって見られ得る。

【０２３４】

アミノ酸配列との関連で、「配列同一性」は、ＣｌｕｓｔａｌＷ（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２（２２）：４６７３－８０；その開示は参照により本明細書に組み込まれる）を使用し、以下のパラメータを用いて評価した場合に、記載される値を有する配列を指す。

ペアワイズアラインメントパラメーター－方法：正確、マトリックス：ＰＡＭ、ギャップオープンペナルティ：１０．００、ギャップエクステンションペナルティ；０．１０；

複数のアラインメントパラメーター－マトリックス：ＰＡＭ、ギャップオープンペナルティ：１０．００、遅延のための同一性％：３０、エンドギャップのペナルティ：オン、ギャップ分離距離：０、ネガティブマトリックス：なし、ギャップエクステンションペナルティ：０．２０、残基特異的ギャップペナルティ：オン、親水性ギャップペナルティ：オン、親水性残基：ＧＰＳＮＤＱＥＫＲ。特定の残基における配列同一性は、単に誘導体化されている同一の残基を含むよう意図される。

【０２３５】

機能的特性

当業者はまた、本発明のポリペプチドが、その機能的特性及び効果に関連して定義され得ることを理解するであろう。

【０２３６】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、及び／又はアポトーシスを誘導することが可能である。

【０２３７】

一実施形態では、ポリペプチドは、以下を誘導することが可能である：

（ａ）Ｂ細胞の活性化、並びに／又は

（ｂ）樹状細胞の活性化、並びに／又は

（ｃ）細胞傷害性Ｔ細胞（すなわち、ＣＤ８＋Ｔ細胞）の活性化、並びに／又は

（ｄ）ヘルパーＴ細胞（すなわち、ＣＤ４＋Ｔ細胞）の活性化、並びに／又は

（ｅ）樹状細胞による腫瘍抗原の交差提示の改善、並びに／又は

（ｆ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の増殖、並びに／又は

（ｇ）ＡＤＣＣを介した、及び／若しくは腫瘍増殖及び生存シグナルの阻害を介した、直接的な腫瘍細胞の殺傷、並びに／又は

（ｈ）内皮細胞及び／若しくは間質細胞との相互作用を介した抗血管新生作用、並びに／又は

（ｉ）ナチュラルキラー細胞の活性化、並びに／又は

（ｊ）Ｔｒｅｇの枯渇、並びに／又は

（ｋ）エフェクターＴ細胞へのＴｒｅｇのリプログラミング、並びに／又は

（ｌ）腫瘍骨髄細胞集団の枯渇、並びに／又は

（ｍ）腫瘍骨髄細胞集団のリプログラミング、並びに／又は

（ｎ）抗原提示細胞による腫瘍破片の内在化、並びに／又は

（ｏ）抗原提示細胞による、腫瘍細胞外小胞（例えば、エクソソーム）の内在化、並びに／又は

（ｐ）腫瘍細胞への結合による腫瘍組織への局在化。

【０２３８】

ポリペプチドが上に列挙した機能的効果を誘導することが可能であるかどうかを決定するための方法は、当業者に既知であり、本出願の実施例にも例示されている。

【０２３９】

ポリペプチドは、Ｔ細胞標的を発現する細胞の活性を調節することができ、当該調節と

は、当該細胞の活性の増大又は減少である。細胞は、典型的にはＴ細胞である。抗体は、ＣＤ４＋若しくはＣＤ８＋エフェクター細胞の活性を増加させるか、又は制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の活性を減少させることができる。いずれの場合でも、抗体の正味の効果は、エフェクターＴ細胞の活性の増大であろう。

【０２４０】

エフェクターＴ細胞の活性の変化を決定するための方法は周知であり、例えば、対照の存在下でのＴ細胞ＩＬ－２産生若しくはＩＦＮ－γ産生及び／又はＴ細胞増殖のレベルと比較した、抗体の存在下でのＴ細胞のＩＬ－２若しくはＩＦＮ－γ産生のレベルの増加、又はＴ細胞増殖の増加についての測定が挙げられる。細胞増殖及び／又はＩＬ－２若しくはＩＦＮ－γ産生についてのアッセイは周知であり、アッセイは、実施例にも例示されている。エフェクターＴ細胞の活性の変化を決定する追加の方法は、Ｔ細胞による、例えば、ＣＤ２５、ＣＤ６９、ＩＣＯＳ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ１０７ａ、及び／若しくはグランザイムＢの発現の変化を測定すること、又は、例えば、ＣＦＳＥを使用することによって、若しくはＫｉ６７のレベルを測定することによって（両方とも、フローサイトメトリーベースの方法を使用して達成され得る）、Ｔ細胞の増殖の変化を測定すること、を含む。

【０２４１】

Ｔｒｅｇ細胞の活性の変化を決定するための方法は周知であり、例えば、ＴＧＦ－β及びＩＦＮ－γの産生を評価することによって、又はインビトロでＴｒｅｇ細胞の抑制能力を測定することによって（ＣＤ３／ＣＤ２８刺激ＣＤ４＋Ｔ細胞をＴｒｅｇ細胞と共培養し、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖をＣＦＳＥ若しくは他の類似の増殖色素を使用することによって評価する）、又はインビトロアッセイでＴｒｅｇ細胞の分化レベルを測定することによって（誘導性Ｔｒｅｇ（ｉＴｒｅｇ）細胞への極性化を促進する条件でＣＤ４＋Ｔ細胞を培養し、低ＣＤ１２７　ＦｏｘＰ３＋ｉＴｒｅｇ細胞の頻度を測定する）、Ｔｈ細胞へのＴｒｅｇ細胞のリプログラミングをインビトロアッセイで測定することを含む。抗体によって誘導されるＴｒｅｇ細胞の活性の変化を決定するための追加の方法には、Ｔｒｅｇ細胞の枯渇を決定するためのＡＤＣＣレポーターアッセイ又は他のＡＤＣＣレポーターアッセイ（Ｔｒｅｇ細胞をＮＫ細胞若しくはマクロファージと共培養し、ＬＤＨ放出若しくは様々な生存染色を使用してＴｒｅｇ細胞の枯渇を決定する）が含まれる。

【０２４２】

ＮＫ細胞の活性の変化を決定するための方法は周知であり、これには、例えば、フローサイトメトリーベースの方法によって、又はインビトロアッセイで（ＮＫ細胞の機能に対する抗体の効果がサイトカイン及び溶解酵素（例えば、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、又はパーフォリン）の放出によって測定され得る）、例えば、ＣＤ２５、ＣＤ１０７ａ、グランザイムＢ、又はＮＫＧ２Ｄの発現の変化を測定することが含まれる。

【０２４３】

一実施形態では、ポリペプチドは、エフェクターＴ細胞の活性の増加を誘導することが可能であり、任意選択的に、当該増加は、別個の分子としてＴ細胞に投与される免疫グロブリン分子とＦａｂ断片との組み合わせによって誘導されるエフェクターＴ細胞の活性の増加よりも少なくとも１．５倍、４．５倍、又は７倍高い。これは、例えば、ＩＬ－２又はＩＦＮ－γの産生を測定することによってＴ細胞活性化アッセイでインビトロで試験され得る。エフェクターＴ細胞の活性化は、腫瘍特異性Ｔ細胞応答がインビボで達成され得ることを意味するであろう。更に、マウスモデルなどのインビボモデルにおける抗腫瘍応答は、腫瘍に対する免疫応答が成功したことを意味するであろう。したがって、これは、二重特異性抗体が腫瘍免疫を誘導することが可能であることを示すであろう。

【０２４４】

一実施形態では、ポリペプチドは、Ｂ細胞又は樹状細胞などの抗原提示細胞の活性化の増加を誘導する。

【０２４５】

活性化の当該増加が、共刺激分子ＣＤ８０若しくはＣＤ８６の発現の増加、又はＩＬ－１２の産生の増加、又はＴ細胞へＭＨＣクラスＩ若しくはＩＩに抗原（例えば、腫瘍抗原

）提示する能力の増加（また、いわゆる交差提示により、二重特異性抗体によって誘導される（例えば、例示的な二重特異性ＣＤ４０－ＥＰＣＡＭ抗体によって誘導される）内在化によって取り込まれた抗原が、最終的にはＭＨＣクラスＩ分子に提示され、抗原提示細胞による当該抗原を認識するＴ細胞の強化された活性化を生成し得る）であり得ることは、当業者には理解されるであろう。

【０２４６】

一実施形態では、ポリペプチドは、Ｂ細胞又は樹状細胞などの抗原提示細胞による腫瘍破片又は腫瘍細胞外小胞の取り込みの増加を誘導する。

【０２４７】

当該取り込みの増加が、抗原提示細胞による腫瘍破片又は腫瘍細胞外小胞の共局在化又は内在化によって測定され得ることは、当業者には理解されるであろう。抗原提示細胞による腫瘍破片又は腫瘍細胞外小胞の取り込みが増加すると、その後、Ｔ細胞のレパートリーが広がり、したがって、より効果的なＴ細胞媒介性の腫瘍根絶がもたらされるであろう。腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の増殖を決定するための方法は周知であり、これには、例えば、ＭＨＣ－ペプチド多量体（例えば、四量体又は五量体）の使用が含まれる。そのような増殖は、特異的な腫瘍抗原を発現する腫瘍、又は腫瘍モデル抗原（例えば、オボアルブミン）でトランスフェクトされた腫瘍をマウスに接種することによって、あるいは、熱ショックを与えて壊死を誘導した同じ細胞をマウスに接種し、続いて、フローサイトメトリーベースの方法による様々なＭＨＣ－腫瘍（モデル）抗原ペプチド四量体又は五量体の使用による腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の増殖を測定することによって、測定され得る。

【０２４８】

一実施形態では、ポリペプチドは、１００×１０$^{-9}$Ｍ未満、又は５０×１０$^{-9}$Ｍ未満、又は２５×１０$^{-9}$Ｍ未満、好ましくは１０、９、８、７、又は６×１０$^{-9}$Ｍ未満、より好ましくは５、４、３、２、又は１×１０$^{-9}$Ｍ未満、最も好ましくは９×１０$^{-10}$Ｍ未満のK_Dで、抗原（第１の抗原及び／又は第２の抗原など）に結合する。

【０２４９】

例えば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、ＲＩＡ、及びフローサイトメトリー分析を含む、標的に対するリガンドの結合能力を評価するための標準アッセイが、当該技術分野で周知である。二重特異性抗体の結合速度（例えば、結合親和性）もまた、当該技術分野で既知の標準的なアッセイによって（表面プラズモン共鳴分析（ＳＰＲ）などによって）評価することができる。そのようなアッセイはまた、本出願の実施例内で実証される。

【０２５０】

「結合活性」及び「結合親和性」という用語は、ポリペプチド分子が標的に結合するか又は結合しない傾向を指すことが意図されている。結合親和性は、ポリペプチド及びその標的の解離定数（Ｋｄ）を決定することによって定量化され得る。より低いＫｄは、標的に対する親和性がより高いことを示す。同様に、ポリペプチドのその標的への結合の特異性は、ポリペプチド及び別の非標的分子に対する解離定数と比較して、その標的に対するポリペプチドの比較解離定数（Ｋｄ）の観点から定義され得る。

【０２５１】

この解離定数の値は、周知の方法によって直接決定することができ、複雑な混合物についてでさえ、例えば、Ｃａｃｅｃｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｂｙｔｅ　９：３４０－３６２，１９８４；その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの方法によって算出することができる。例えば、Ｗｏｎｇ＆Ｌｏｈｍａｎ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０，５４２８－５４３２，１９９３）に開示されるものなどの二重フィルターニトロセルロースフィルター結合アッセイを使用して、Ｋｄを確立することができる。例えば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、ＲＩＡ、及びフローサイトメトリー分析を含む、標的に対する抗体などのリガンドの結合能力を評価するための他の標準アッセイが、当該技術分野で既知である。抗体の結合速度（例えば、結合親和性）もまた、当該技術分野で既知の標準アッセイによって、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）システム分析などによって評価することができる。

【０２５２】
標的に対するポリペプチドの結合が、その標的の別の既知のリガンド、例えば別の抗体などによる標的の結合と比較される、競合結合アッセイを行ってもよい。５０％の阻害が生じる濃度は、ＫｉとしてＫｄである。理想的な条件下では、ＫｉはＫｄと等価である。Ｋｉ値は、Ｋｄ未満になることは決してないため、好都合なことに、Ｋｉの測定値を代入してＫｄの上限を求めることができる。
【０２５３】
結合親和性の代替的な尺度としては、ＥＣ５０又はＩＣ５０が挙げられる。この文脈において、ＥＣ５０は、ポリペプチドが一定量の標的に対するその最大結合の５０％を達成する濃度を示す。ＩＣ５０は、ポリペプチドが、一定量の標的に対する一定量の競合相手の最大結合の５０％を阻害する濃度を示す。両方の場合において、より低いレベルのＥＣ５０又はＩＣ５０は、標的に対する親和性がより高いことを示す。リガンドのその標的に対するＥＣ５０値及びＩＣ５０値は、両方とも、周知の方法、例えばＥＬＩＳＡによって決定することができる。ポリペプチドのＥＣ５０及びＩＣ５０を評価するための好適なアッセイは、実施例に記載される。
【０２５４】
本発明のポリペプチドは、好ましくは、その標的のうちの１つに、別の非標的分子に結合するその親和性よりも少なくとも２倍、１０倍、５０倍、１００倍以上である親和性で結合することが可能である。
【０２５５】
ポリヌクレオチド、ベクター、及び細胞
本発明はまた、本発明のポリペプチドの全て又は一部をコードするポリヌクレオチドに関する。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の任意のポリペプチド鎖をコードしてもよい。「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチドのいずれかを問わず、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチド、又はそれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子断片、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離ＤＮＡ、任意の配列の単離ＲＮＡ、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドは、単離された形態又は実質的に単離された形態で提供され得る。実質的に単離されたとは、何らかの周囲媒体からのポリペプチドの完全ではないが実質的な単離があり得ることを意味する。本ポリヌクレオチドは、それらの意図される用途を妨げない担体又は希釈剤と混合されても、実質的に単離されていると見なされ得る。
【０２５６】
選択されたポリペプチドを「コードする」核酸配列は、適切な制御配列の制御下におかれると、インビボで転写され（ＤＮＡの場合）、ポリペプチドに翻訳される（ｍＲＮＡの場合）核酸分子である。コード配列の境界は、５’（アミノ）末端における開始コドンと、３’（カルボキシ）末端における翻訳終止コドンとによって決定される。本明細書では、そのような核酸配列は、ウイルス、原核生物又は真核生物のｍＲＮＡに由来するｃＤＮＡ、ウイルス又は原核生物のＤＮＡ又はＲＮＡ由来のゲノム配列、及び更には合成ＤＮＡ配列を含み得るが、これらに限定されない。転写終結配列は、コード配列の３’側に位置していてもよい。
【０２５７】
したがって、本発明のポリペプチドは、それをコードし、発現することが可能であるポリヌクレオチドの形態から産生され得るか、又はその形態で送達され得る。
【０２５８】
本発明のポリヌクレオチドは、Ｇｒｅｅｎ＆Ｓａｍｂｒｏｏｋ（２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ；その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に例として記載されているように、当該技術分野で周知の方法

によって合成することができる。

【０２５９】

本発明の核酸分子は、挿入された配列に作動可能に連結している制御配列を含む発現カセットの形態で提供され得、したがってインビボで本発明のポリペプチドの発現を可能にする。これらの発現カセットは、同様に、典型的には、ベクター（例えば、プラスミド又は組換えウイルスベクター）内で提供される。かかる発現カセットは、宿主対象に直接投与され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが宿主対象に投与されてもよい。好ましくは、ポリヌクレオチドは、遺伝子ベクターを使用して調製及び／又は投与される。好適なベクターは、十分な量の遺伝情報を保有すること、及び本発明のポリペプチドの発現を可能にすることのできる、任意のベクターであり得る。

【０２６０】

したがって、本発明は、かかるポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。かかる発現ベクターは、分子生物学の技術分野で日常的に構築されており、例えば、プラスミドＤＮＡ及び適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー、及び他のエレメント、例えば、本発明のペプチドの発現を可能にするために必要であり得、かつ正しい配向に位置付けられた、ポリアデニル化シグナルなどの使用を伴う場合がある。他の好適なベクターは、当業者には明らかであろう（Ｇｒｅｅｎ＆Ｓａｍｂｒｏｏｋ、上記参照）。

【０２６１】

本発明は、本発明の二重特異性抗体又は構成ポリペプチドを発現するように修飾された細胞を含む。かかる細胞は、哺乳動物細胞若しくは昆虫細胞などの、一過性若しくは好ましくは安定な高等真核細胞株、酵母などの下等真核細胞、又は細菌細胞などの原核細胞を含む。本発明のポリペプチドをコードするベクター又は発現カセットの挿入によって修飾され得る細胞の特定の例としては、哺乳動物ＨＥＫ２９３Ｔ、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＮＳ０、及びＣＯＳ細胞が挙げられる。好ましくは、選択される細胞株は、安定であるだけでなく、ポリペプチドの成熟グリコシル化及び細胞表面発現も可能にするものである。

【０２６２】

本発明のそのような細胞株は、本発明のポリペプチドを産生するために一般的な方法を使用して培養されてもよいか、又は本発明の抗体を対象に送達するために治療的又は予防的に使用されてもよい。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、発現カセット、又はベクターは、エクスビボで対象由来の細胞に投与され、次いでその細胞を対象の身体に戻してもよい。

【０２６３】

更なる態様では、本発明は、本明細書に開示されるポリペプチド及び／又は二重特異性抗体のうちのいずれかを製造する方法を提供する。

【０２６４】

医薬製剤、治療用途、及び患者群

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、及び細胞などの、本発明の分子を含む組成物を提供する。例えば、本発明は、本発明の１つ以上のポリペプチドなどの本発明の１つ以上の分子と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。

【０２６５】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性である、任意及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤、並びに吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、非経口投与、例えば静脈内投与、筋肉内投与、又は皮下投与（例えば注射又は点滴による）に好適である。投与経路に応じて、ポリペプチドを不活性化又は変性させ得る酸及び他の自然条件の作用からポリペプチドを保護するための材料で、ポリペプチドをコーティングしてもよい。

【０２６６】

好ましい薬学的に許容される担体は、水性担体又は希釈剤を含む。本発明の組成物に用いられ得る好適な水性担体の例としては、水、緩衝水、及び生理食塩水が挙げられる。他

の担体の例としては、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、及びこれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散液の場合は必要な粒子径の維持、及び界面活性剤の使用により維持できる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。

【０２６７】

本発明の組成物はまた、薬学的に許容可能な抗酸化剤を含み得る。これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントを含有してもよい。微生物の存在の防止は、滅菌手順（上記を参照）、並びに様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどの包含の両方によって確実にされ得る。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に含めることが望ましい場合がある。加えて、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含めることによって、注射用剤形の長期吸収をもたらすことができる。

【０２６８】

治療用組成物は、典型的には、製造条件及び保存条件で無菌であり、かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、又は高い薬物濃度に好適な他の規則的な構造として製剤化され得る。

【０２６９】

無菌注射可能溶液は、必要に応じて上に挙げた成分のうちの１つ又は組み合わせを含む適切な溶媒に必要量の活性薬剤（例えば、ポリペプチド）を組み込み、続いて無菌精密濾過することによって調製することができる。一般に、分散液は、活性薬剤を、基本的な分散媒及び上に挙げたものから必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注射可能溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性薬剤及びその予め滅菌濾過された溶液から任意の追加の所望の成分の粉末を得る、高減圧乾燥及び冷凍乾燥（凍結乾燥）である。

【０２７０】

特に好ましい組成物は、全身投与用又は局所投与用に調合される。局所投与は、腫瘍の部位で、又は腫瘍流入領域リンパ節に行われてもよい。組成物は、好ましくは一定期間にわたって持続放出するように調合されてもよい。したがって、組成物は、持続放出を促進するマトリックス中に又はマトリックスの一部として提供されてもよい。好ましい持続放出マトリックスは、モンタニド又はγ－ポリグルタミン酸（ＰＧＡ）のナノ粒子を含み得る。本発明のポリペプチドの局所的放出は、任意選択的に持続期間にわたり、ＣＴＬＡ－４アンタゴニストの投与に関連した潜在的な自己免疫副作用を低減し得る。

【０２７１】

本発明の組成物は、追加の活性成分、並びに本発明のポリペプチドを含み得る。上記のように、本発明の組成物は、本発明の１つ以上のポリペプチドを含み得る。それらはまた、追加の治療剤又は予防剤を含み得る。

【０２７２】

本発明のポリペプチド又は他の組成物及び使用説明書を含むキットもまた、本発明の範囲内である。本キットは、上述の追加の治療剤又は予防剤などの１つ以上の追加の試薬を更に含んでもよい。

【０２７３】

本発明によるポリペプチドは、治療又は予防に使用することができる。治療用途では、ポリペプチド又は組成物は、すでに障害又は状態を患っている対象に、その病態又はその症状のうちの１つ以上を治癒、軽減、又は部分的に抑えるのに十分な量で投与される。そのような療法的治療は、疾患症状の重症度の減少、又は無症状期間の頻度若しくは持続期間の増加をもたらし得る。これを達成するのに適切な量は、「治療有効量」として定義される。予防用途では、ポリペプチド又は組成物は、障害又は病態の症状をまだ示していな

い対象に、症状の発症を防止するか、又は遅延させるのに十分な量で投与される。そのような量は、「予防有効量」と定義される。対象は、任意の好適な手段によって、疾患又は病態を発症するリスクがあるものと特定されていてもよい。

【０２７４】

特に、本発明のポリペプチドは、がんの治療又は予防に有用であり得る。したがって、本発明は、がんの治療又は予防に使用するための本発明のポリペプチドを提供する。本発明はまた、個体に本発明のポリペプチドを投与することを含む、がんを治療又は予防する方法を提供する。本発明はまた、がんの治療又は予防用の医薬品の製造における使用のための、本発明のポリペプチドを提供する。

【０２７５】

がんは、前立腺がん、乳がん、大腸がん、膵臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮頸がん、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、多発性骨髄腫、白血病、急性リンパ芽球性白血病、黒色腫、膀胱がん、胃がん、頭頸部がん、肝臓がん、皮膚がん、リンパ腫、又は膠芽腫であり得る。

【０２７６】

本発明のポリペプチド又は当該ポリペプチドを含む組成物は、当該技術分野で既知の種々の方法のうちの１つ以上を使用して、１つ以上の投与経路を介して投与され得る。当業者には理解されるであろうが、投与経路及び／又は方式は、所望の結果に応じて異なるであろう。全身投与又は局所投与が好ましい。局所投与は、腫瘍の部位又は腫瘍流入領域リンパ節へ行われてもよい。本発明のポリペプチド又は組成物に好ましい投与方式としては、例えば注射又は点滴による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、又は他の非経口投与方式が挙げられる。本明細書で使用される「非経口投与」という語句は、通常は注射による、経腸投与及び局所投与以外の投与方式を意味する。あるいは、本発明のポリペプチド又は組成物は、局所投与方式、表皮投与方式、又は粘膜投与方式などの非経腸（ｎｏｎ－ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ）投与方式を介して投与することができる。

【０２７７】

本発明のポリペプチドの好適な投与量は、熟練した医師によって決定され得る。本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成、及び投与方式に対して所望の治療応答を達成するのに有効である、患者に対して有害でない活性成分の量を得るように異なり得る。選択される投与量レベルは、用いられる特定のポリペプチドの活性、投与経路、投与時間、ポリペプチドの排泄速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物及び／又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態及び以前の病歴、並びに医薬技術分野で周知の同様の要因を含む、種々の薬物動態学的要因に依存するであろう。

【０２７８】

本発明のポリペプチド又は組成物の好適な用量は、例えば、治療される患者の体重の約０．１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。例えば、好適な用量は、１日当たり体重の約１μｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、又は１日当たり体重の約１０ｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇであり得る。

【０２７９】

投与計画は、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整してもよい。例えば、単回ボーラスを投与してもよいか、数回に分けた用量を経時的に投与してもよいか、又は治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に低減又は増加してもよい。投与の容易さ及び投与量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形で調合することが特に有利である。本明細書で使用される単位剤形は、治療される対象用の単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体と関連して所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含有する。

【０２８０】

ポリペプチド又は組成物は、単回用量又は複数回用量で投与してもよい。複数回用量は、同じか又は異なる経路を介して、同じか又は異なる位置に投与してもよい。あるいは、

ポリペプチド又は組成物は、上記のように徐放性製剤として投与することができ、その場合、より少ない頻度の投与が必要である。投与量及び頻度は、患者におけるポリペプチドの半減期、及び所望の治療期間に応じて異なり得る。投与量及び投与の頻度もまた、治療が予防的であるか又は治療的であるかに応じて異なり得る。予防的用途では、比較的低い投与量を比較的不定期な間隔で、長期間にわたって投与してもよい。治療的用途では、例えば患者が疾患の症状の部分的又は完全な改善を示すまで、比較的高い投与量を投与してもよい。

【０２８１】

２つ以上の薬剤の併用投与は、多数の異なる方法で達成され得る。一実施形態では、ポリペプチド及び他の薬剤を、単一の組成物中で一緒に投与してもよい。別の実施形態では、ポリペプチド及び他の薬剤を、併用療法の一部として別々の組成物中で投与してもよい。例えば、モジュレータは、他の薬剤の前、後、又は同時に投与してもよい。

【０２８２】

本発明のポリペプチド又は組成物はまた、第１及び第２の抗原を発現する細胞集団の活性化を増加させる方法において使用され得、方法は、当該細胞と本発明のポリペプチドとの間の相互作用を可能にするのに好適な条件下で、本発明のポリペプチド又は組成物を当該細胞集団に投与することを含む。細胞集団は、典型的には、第１の抗原を発現する少なくともいくつかの細胞と、第２の抗原を発現する少なくともいくつかの細胞とを含む。方法は、典型的にはエクスビボで実行される。

【０２８３】

加えて、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈から明らかにそうではない限り、複数の参照物を含む。したがって、例えば、「抗体（ａｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」への言及は、「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」を含み、「抗原（ａｎ　ａｎｔｉｇｅｎ）」への言及は、２つ以上のそのような抗原を含み、「対象（ａ　ｓｕｂｊｅｃｔ）」への言及は、２つ以上のそのような対象を含む、などである。

【０２８４】

本明細書で引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、上記又は下記にかかわらず、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２８５】

本明細書における明らかに以前に公開された文書のリスト又は考察は、必ずしもその文書が最先端技術の一部であるか、あるいは共通の一般知識であることを認めるものとして解釈されるべきではない。

【０２８６】

本発明を以下の実施例によって更に説明するが、これは更なる限定として解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用される全ての図及び全ての参考文献、特許及び公開された特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【０２８７】

本発明の特定の態様を具体化する好ましい非限定的な実施例を、以下の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【０２８８】

【図１】単一変異体ｂｓＡｂバリアントの二重ＥＬＩＳＡ。パネルＡ～Ｄでは、Ｓ１１４Ａ変異を有するペプチドのインシリコで予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を低減するように評価された変異体が示され、パネルＥ～Ｈでは、Ｔ１８７Ｅ変異を有するペプチドのインシリコで予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を低減するように評価された変異体が示されている。参照として、野生型ｂｓＡｂ　ＡＣ＿０５２９３を含めた。

【図２】定常軽鎖にＳ１１４Ａ変異及び／又はＣＨ１定常重鎖にＴ１８７Ｅ変異を有するｂｓＡｂと比較した、ペプチドの予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合が低減した二重変異体ｂｓＡｂバリアントの二重ＥＬＩＳＡ。参照として、ＷＴ　ｂｓＡｂ、ＡＣ＿０５２９３

を含めた。
【図３】異なる二重変異体ｂｓＡｂバリアントの融解温度（Ｔｍ１）及び凝集温度（Ｔａｇｇ）。参照として、ＷＴ　ｂｓＡｂ、ＡＣ＿０５２９３を含めた。
【図４】インキュベーション前と比較した、４０℃で１、２、及び４週間インキュベーションした後の凝集（％ＨＭＷ）。ＳＥＣ－ＨＰＬＣを使用して測定された値。
【図５】凍結／融解安定性評価。ＨＭＷの割合（％）の変化として測定される凝集を、１回及び３回の凍結／融解後に調べた。
【図６】全てのバリアントについての剪断応力安定性評価。Ａ２８０測定を行った後、ＭｉｘＭａｔｅで２０００ｒｐｍで３０分間インキュベートし、その後、３０００ｘｇで１０分間遠心分離した後、Ａ２８０を再測定した。
【図７】５０％のタンパク質沈殿物を得るために必要な、％ＰＥＧとして測定したコロイド安定性。全てのバリアントは、高いコロイド安定性を示すＰＥＧ濃度＞８～９％を必要とした。
【図８】二重標的ＥＬＩＳＡによって決定される、ＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂの抗原結合。親のｂｓＡｂ　ＡＣ＿０５３３２（Ａ）、ＡＣ＿０５３３０（Ｂ）、ＡＣ＿５３０２（Ｃ）、及びそれらのバリアントの、５Ｔ４及びＣＤ４０への同時結合。
【図９】フローサイトメトリーを使用して決定した、ＡＣ＿０５３３２（Ａ）、ＡＣ＿０５３３０（Ｂ）、ＡＣ＿５３０２（Ｃ）、及びそれらのバリアントによる、ＣＨＯ細胞（ＣＨＯ－５Ｔ４）及びＣＨＯ　ｗｔ細胞上に発現された５Ｔ４への結合。
【図１０】フローサイトメトリーを使用して決定した、ＡＣ＿０５３３２（Ａ）、ＡＣ＿０５３３０（Ｂ）、ＡＣ＿５３０２（Ｃ）、及びそれらのバリアントによる、Ｂ１６細胞（Ｂ１６－ＣＤ４０）及びＢ１６ｗｔ細胞上に発現されたＣＤ４０への結合。
【図１１】これは、ＲＵＢＹ（商標）形式で参照される二重特異性抗体構築物の例示的な組成を示す。この図の二重特異性抗体は、以下の３種類のポリペプチド鎖からなる：（１）ポリペプチドリンカーを介してＦａｂ軽鎖に融合されたＩｇＧ重鎖（白色）。（２）ＩｇＧ軽鎖（レンガ模様）、及び（３）Ｆａｂ重鎖（黒色）。変異は、重鎖と軽鎖との間の界面に導入される。
【図１２】ＣＤ４０×ＴＡＡ　ｂｓＡｂは、腫瘍破片の抗原提示細胞への局在化を媒介する。ＣＤ４０＋細胞を有するＣＥＡ＋腫瘍破片クラスタリングの数を、生細胞イメージングソフトウェアを使用して８時間の培養後に定量化した。グラフは、４つの（ＣＥＡ）のうちの１つの代表的な実験における重複ウェルの平均（＋ＳＤ）を示す。
【図１３】ヒト大腸がん腫瘍由来の解離細胞を、以下について分析した：（左）それらのＣＥＡ発現（総生存細胞に対するゲーティング）、（中央）ＣＤ４０レポーターアッセイにおけるＣＤ４０×ＣＥＡ　Ｎｅｏ－Ｘ－Ｐｒｉｍｅ　ｂｓＡｂへの架橋を提供する能力、並びに（右）ＣＤ４０×ＣＥＡ　Ｎｅｏ－Ｘ－Ｐｒｉｍｅ　ｂｓＡｂ又はｉｓｏｔｙｐｅｘＣＤ４０　ｂｓＡｂを使用した、腫瘍浸潤免疫細胞（生存ＣＤ４５＋ＣＤ３－ＣＤ５６－細胞に対するゲーティング）の刺激後のＣＤ８３の上方調節（３つの代表的な実験のうちの１つからのデータ）。
【図１４】ＣＤ４０×ＣＥＡ　ｂｓＡｂによるＣＤ４０及びＣＥＡの同時結合は、インビトロでの扁桃がんＡＰＣの活性化を媒介する。扁桃がん生検由来のヒトＣＤ４５＋ＨＬＡ－ＤＲ＋　ＣＤ３－細胞を、ＣＤ４０×ＣＥＡ　ｂｓＡｂ、ＣＤ４０　ｍＡｂ、又はアイソタイプ対照の存在下で、ヒトＣＥＡでトランスフェクトしたＵＶ照射ＣＨＯ細胞と共培養した。１３時間の培養後、細胞を回収し、ＣＤ１９＋ＣＤ２０＋Ｂ細胞、ＣＤ１４＋マクロファージ、ＣＤ１ｃ＋　ｃＤＣ２及びＸＣＲ１＋ｃＤＣ１のフローサイトメトリーを使用して、ＣＤ８６＋ＣＤ４０＋細胞の頻度を調べた。
【図１５】ＭＣ３８－ＣＥＡＣＡＭ５　２腫瘍の増殖及び生存。ＭＣ３８－ＣＥＡＣＡＭ５　２腫瘍を接種したｈＣＤ４０ｔｇマウスに、接種後７日目、１０日目、及び１３日目に、示された治療を投与した。腫瘍を頻繁に測定した。グラフは、処置群のうちのいずれかの最初のマウスが倫理的限界を超える腫瘍体積に達するまでの各群の平均腫瘍体積（＋ＳＤ）、及び各処置群の生存マウスの割合（％）を示す。

【図１６】ヒト胃がん腫瘍由来の解離細胞を、以下について分析した：（左）それらのＣＥＡ発現（総生存細胞に対するゲーティング）、（中央）ＣＤ４０レポーターアッセイにおけるＣＤ４０×ＣＥＡ　Ｎｅｏ－Ｘ－Ｐｒｉｍｅ　ｂｓＡｂ（ｆｆＡＣ＿０５３３７）への架橋を提供する能力、並びに（右、１ｎＭ　ＣＤ４０×ＣＥＡ）ＣＤ４０×ＣＥＡ　Ｎｅｏ－Ｘ－Ｐｒｉｍｅ　ｂｓＡｂ又はｉｓｏｔｙｐｅｘＣＤ４０　ｂｓＡｂを使用した、腫瘍浸潤免疫細胞（生存ＣＤ４５＋ＣＤ３－ＣＤ５６－細胞に対するゲーティング）の刺激後のＣＤ８３の上方調節（４つの代表的な実験のうちの１つからのデータ）。

【図１７】可溶性ＣＥＡの存在下及び不在下で、異なるＣＥＡ受容体密度で腫瘍細胞と共培養した場合の、ＣＤ４０レポーター細胞に対する二重特異性抗体ｆｆＡＣ＿０５３３７の効果。ＭＫＮ４５、ＣＥＡ高発現細胞（Ａ）、ＬＳ１７４Ｔ、ＣＥＡ中発現細胞（Ｂ）、ＨＴ２９及びＬＯＶＯ、ＣＥＡ低発現細胞（Ｃ～Ｄ）。応答を、バックグラウンドに対する誘導倍率として計算した。

【図１８】可溶性ＣＥＡの存在下又は不在下で、ＣＥＡ発現ＣＨＯ細胞及び滴定した抗体と共培養したＣＤ４０レポーター細胞に対する二重特異性抗体ｆｆＡＣ＿０５３３７の効果。応答を、バックグラウンドに対する誘導倍率として計算した。

【実施例】

【０２８９】

実施例１－インシリコで予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を低減する変異の特定。単一変異体に関する研究。

目的及び背景

この研究の目的は、製造可能性又は標的結合に悪影響を及ぼすことなく、二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）におけるコアペプチドの予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を除去することができる変異（定常軽鎖にＳ１１４Ａ変異及び／又はＣＨ１定常重鎖ドメインにＴ１８７Ｅ変異を有する－いわゆる本明細書に記載される「一次」変異）を特定し、評価することであった。

【０２９０】

材料及び方法

コアペプチド予測

定常軽鎖における変異Ｓ１１４Ａ及び定常重鎖における変異Ｔ１８７Ｅを含む、選択されたペプチドのコアペプチドを、ＮｅｔＭＨＣＩＩｐａｎ　３．４ツールを使用して予測した。ＡｂＥｐｉＡｎａｌｙｚｅｒツール（ＥＩＲ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって定義された世界平均集団の２０の最も一般的な対立遺伝子を、デフォルトのソフトウェア設定で予測に使用した。

【０２９１】

ＭＣＨ　ＩＩ結合が低減する可能性がある変異体バリアントの設計

特定されたコアペプチドに基づいて、Ｓ１１４Ａ及びＴ１８７Ｅ変異をカバーするために、膨大なセットの変異体ペプチドを設計した。Ｔ１８７Ｅ変異を包含するコアペプチドの接触残基１、４、６、及び９、並びにＳ１１４Ａ変異を包含するコアペプチドの１、４、及び６位に、２０個全てのアミノ酸を導入した（Ｓ１１４は、コアペプチドの９位にあるため、変えることができなかった）。

【０２９２】

インシリコペプチド－ＭＨＣクラスＩＩ結合予測ツール

インシリコ予測は、アミノ酸配列を、ＡｂＥｐｉＡｎａｌｙｚｅｒツールに提供することによって行った。簡潔に述べると、提供された配列の各１５ｍｅｒペプチドについて、ランダムに選択された大規模なセットの１５ｍｅｒに対する予測された親和性と比較することによって、パーセンタイルランクを生成する。異なる対立遺伝子は、高い又は低い結合親和性への偏りを示すため、親和性よりもランク閾値が好ましい。ＩＥＤＢによって推奨されるように、＜１０のパーセンタイルランクを有するペプチドを、結合予測に含めた。ＡｂＥｐｉＡｎａｌｙｚｅｒは、ＮｅｔＭＨＣＩＩ３．１アルゴリズムを使用して、最初に大規模なパネルのヒトＭＨＣクラスＩＩ対立遺伝子への各１５ｍｅｒペプチドの結合

を予測することによって、抗体及び配列修飾タンパク質の潜在的な免疫原性を分析し、その後、位置特異的リスクスコアを計算する。スコアは、定義された集団内の所与の位置と重複するＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、及びＨＬＡ－ＤＱ結合サブペプチドの頻度を反映する。位置特異的リスクスコアを、各配列にわたって合計する。位置特異的リスクスコアのカットオフ値を、０．１に設定する（すなわち、＜０．１の位置特異的リスクスコアが、全て０に設定される）。

【０２９３】

抗体の分析の場合、プログラムは、ｂｌａｓｔｐを使用して、重鎖及び軽鎖Ｖ遺伝子のデータベースから生殖系列遺伝子を特定し、アライメントする。相補性決定領域（ＣＤＲ）は、それぞれ重鎖及び軽鎖の多重アラインメントに基づいて、開発された軽鎖及び重鎖隠れマルコフモデルを使用することによって特定される。配列修飾タンパク質については、野生型配列は、ユーザによって別々に提供される。生殖系列タンパク質又は野生型タンパク質のＨＬＡ結合特性を差し引くことによって、潜在的なＴ細胞ネオエピトープが特定される。

【０２９４】

ＨＬＡ対立遺伝子の世界平均集団を使用した。ここで、北米の集団の割合は、５２．７％、ヨーロッパ人は２５．３％、北東アジア人は９．２％、東南アジア人は５．９％、中南米人は１．７％、オセアニア人は１．３％、西アジア人は１．３％、サハラ以南のアフリカ人は１．０％、南アジア人は０．７％、北アフリカ人は０．６％、オーストラリア人は０．１％である。結果は、位置特異的リスクスコアとして、並びに対立遺伝子結合の特定及び高頻度（すなわち、無差別）ネオエピトープの存在についてのヒートプロットとして提示される。

【０２９５】

アミノ酸配列

単一の変異体を、タンパク質骨格としてＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂ　ＡＣ＿０５２９３を使用して生成した。潜在的な脱免疫化変異に加えて、この抗体は、一連のＲＵＢＹ（商標）特異的変異を有する（表１）。

【表１１】

表１．AC_05293 における RUBY（商標）特異的変異

RUBY（商標）ID	可変ドメインにおける RUBY（商標）変異*	定常ドメインにおける RUBY（商標）変異**
AC_05293	鎖 H1 の VH 及び VL における Q44R 鎖 L1 の VL における Q44E 鎖 H2 の VH における Q44E	鎖 H1 の CH1 における H168A+F170G 鎖 H2 の CH1 における T187E 鎖 H1 の CKappa における S114A+N137K 鎖 L1 の CKappa における L135Y+S176W

*IMGT 番号付けシステムによる

**EU 又は Kabat 番号付けシステムによる

【０２９６】

構造レビュー

抗体のＣＨ１及びＣκの三次元構造は、ＰｙＭＯＬ（バージョン１．８．２．０）及びＲＣＳＢタンパク質データバンクからダウンロードした抗体構造５Ｉ１８及び３ＺＨＫを

使用して行った。

【０２９７】

遺伝子合成及びクローニング

特定された目的の脱免疫化変異を組み込んだ遺伝子断片を、Ｔｗｉｓｔ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから入手し、標準的なＩＩＳ型クローニングを使用して、ｂｓＡｂ ＡＣ＿０５２９３の追加の部分をコードする遺伝子断片とともにＡｌｌｉｇａｔｏｒのｐＣＤＮＡ３．４発現ベクターにクローニングした。

【０２９８】

タンパク質の産生及び精製

抗体を、製造元の説明書に従って、一過性Ｅｘｐｉ２９３（Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）培養を使用して発現させた。上清の精製を、Ｐｒｅｄｉｃｔｏｒ ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ ５０μｌ ９６ウェルプレート（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で行った。細胞を、ｂｓＡｂを構成する３つの共発現ポリペプチド鎖の各々を別々にコードする３つの異なるベクターでトランスフェクトした。

【０２９９】

二重ＥＬＩＳＡ

プレートを、ＰＢＳ中の０．５μｇ／ｍＬのＣＤ４０で、４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０（ＰＢＳＴ）で洗浄した後、プレートを、ＰＢＳ／２％ ＢＳＡで少なくとも３０分間ブロッキングしてから、再び洗浄した。次いで、ＰＢＳ／０．５％ ＢＳＡで段階希釈した試料を添加し、室温で少なくとも１時間結合させた。洗浄後、プレートを、０．５μｇ／ｍＬのビオチン化ＥｐＣＡＭで、室温で少なくとも１時間インキュベートした。ＣＤ４０及びＥｐＣＡＭとの二重複合体化ｂｓＡｂを、ＨＲＰ標識ストレプトアビジンで検出した。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｐｉｃｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔを基質として使用し、Ｆｌｕｏｓｔａｒ Ｏｐｔｉｍａを使用して発光シグナルを測定した。

【０３００】

結果及び結論

コアペプチドの特定

インシリコ予測を使用して、ＭＨＣ ＩＩ結合の増加を伴うペプチドにつながり得る変異を特定することが可能であった。これらは、付加されたＦａｂの軽鎖におけるＳ１１４Ａ及び付加されたＦａｂの重鎖におけるＴ１８７Ｅの変異を包含するペプチドであった。更に、インシリコ分析では、予測されたＭＨＣ ＩＩペプチド上のアミノ酸のうち、コアアミノ酸である可能性が高い（すなわち、ＭＨＣ ＩＩ複合体又はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）のいずれかとの相互作用に関与している）ものを特定することができ、これから、ＭＨＣクラスＩＩ複合体と相互作用する可能性が高い残基を特定することができる（コアペプチドの１、４、６、及び９位）。表２において、ＭＨＣクラスＩＩ複合体と接触すると予測されたコアアミノ酸は、Ｘでマークされている。

【表１２】

表２．RUBY 変異 S114A 及び T187E のコアペプチド配列

RUBY の変異	配列タイプ	配列及びコアアミノ酸
T187E	配列 A*	AVLQSSGL**X**SL**X**S**X**V**E****X**PSSSLGTQTYICNV (配列番号 204)
	配列 B‡	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV(配列番号 76)
S114A	配列 A	TFGAGTKLE**X**KR**X**V**X**APAVFIFPPSDEQL (配列番号 205)
	配列 B	TFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL(配列番号 206)

*配列 A の配列は、RUBY 由来の配列である。下線は、RUBY における最適な鎖対合に必要な変異である。X は、MHC II タンパク質と相互作用すると予測されたコアアミノ酸を示し、免疫原性リスクを低減するために変異させることができる。

‡配列 B は、野生型(WT)参照配列である

配列 A 及び配列 B の配列は、CKappa ドメイン及び VL ドメインの両方を含む－配列 B

【化３０】

TFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL (配列番号 206)

を参照して、CKappaドメインを下線で示し、VLを太字で示す。

【０３０１】

脱免疫化ＲＵＢＹバリアントの特定

予測されたコアアミノ酸を使用して、より低い予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を有する潜在的な変異体を、インシリコＭＨＣクラスＩＩペプチド結合分析を使用して評価した。結果は、付加されたＦａｂの重鎖における付加されたＦａｂの軽鎖におけるＳ１１４Ａ変異及び付加されたＦａｂの重鎖におけるＴ１８７Ｅの予測されたリスクスコアが０又は０に近いいくつかの変異を明らかにした。

【０３０２】

ＲＵＢＹの免疫原性を低減させる可能性のある特定された各変異の詳細なレビューを行って、好ましくない製造可能性特性を有するアミノ酸又は部位を導入する変異、並びに三次元構造におけるそれらの位置に基づいて機能的で安定したタンパク質を生成する可能性が非常に低い変異を除去した。更なる評価のために選択された残りの脱免疫化変異の完全なリストは、表３に見出すことができる。

【表１３】

表３．タンパク質の産生及び評価のために選択された配列番号及び変異。

	配列番号	変異
CKappa 軽鎖上の S114A*によって引き起こされる予測された MHCII 結合を低減する変異	4109	VL の I126A**
	4110	VL の I126G**
	4111	VL の I126H**
	4112	VL の I126N**
	4113	VL の I126P**
	4114	VL の I126Q**
	4115	VL の I126S**
	4116	VL の I126T**
	4117	CKappa の T109P*
	4118	CKappa の A111R*
	4119	CKappa の A111T*
	4120	CKappa の A111V*
	4121	CKappa の A111W*
CH1 上の T187E*によって引き起こされる、予測された MHCII 結合を低減する変異	4124	CKappa の Y180A*
	4125	CKappa の Y180G*
	4126	CKappa の Y180I*
	4127	CKappa の Y180N*
	4128	CKappa の Y180S*
	4129	CKappa の Y180T*
	4130	CKappa の Y180V*
	4131	CKappa の Y180W*
	4132	CKappa の S183N*
	4133	CKappa の S183T*
	4134	CKappa の V188G*

*EU 又は Kabat 番号付けシステムによる

**IMGT 番号付けシステムによる

【０３０３】

単一部位変異体の評価

クローニング及び産生

表３に列挙されている追加の変異のうちの１つを有するＲＵＢＹバリアントを操作し、高スループット９６ウェル形式で産生した（ＨＴ産生）。変異体バリアントの一過性培養からの生産性は、概して良好であり、野生型ｂｓＡｂと同等のレベルであった（データは示さず）。

【０３０４】

二重ＥＬＩＳＡ

両方の標的（ＣＤ４０及びＥｐＣＡＭ）への同時結合を、二重ＥＬＩＳＡセットアップを使用して評価した。図１からわかるように、評価した変異体の大多数は、野生型ｂｓＡｂと同等のレベルで両方の標的への結合を保持していた。二重ＥＬＩＳＡの結果は、両方の標的に対する単一ＥＬＩＳＡによって更に確認された（データは示さず）。

【０３０５】

全体として、製造可能性又は標的結合に悪影響を及ぼすことなく、変異Ｓ１１４Ａ又はＴ１８７Ｅを有するＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂ由来ペプチドのインシリコで予測された免疫原性リスクが低減した多様なセットの単一アミノ酸変異が特定され得ると結論付けることができる。

【０３０６】

実施例２－インシリコで予測されＭＨＣクラスＩＩ結合を低減する変異の組み合わせの評価－二重変異体に関する研究。

目的及び背景

本研究の目的は、インシリコで予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合を低減する変異の組み合わせを評価し、抗原結合、安定性、又は開発可能性に悪影響を及ぼすことなく、ＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂにおけるコアペプチドの予測されたＭＨＣクラスＩＩ結合（定常軽鎖ドメインにＳ１１４Ａ変異を有し、かつ／又はＣＨ１定常重鎖ドメインにＴ１８７Ｅ変異を有する）を低減することができる変異対を特定することであった。

【０３０７】

材料及び方法

構造レビュー

抗体のＣＨ１及びＣκの三次元構造は、ＰｙＭＯＬ（バージョン１．８．２．０）及びＲＣＳＢタンパク質データバンクからダウンロードした抗体構造５Ｉ１８及び３ＺＨＫを使用して行った。

【０３０８】

アミノ酸配列

二重変異体を、タンパク質骨格としてＡＣ＿０５２９３　ｂｓＡｂを使用して生成した。潜在的な脱免疫化変異に加えて、この抗体は、一連のＲＵＢＹ（商標）特異的変異を有する（表４）。表５に列挙されたセットＡ及びセットＢの変異の２０個全ての可能な二重変異体の組み合わせを生成した。

【表１４】

表４．AC_05293 における RUBY（商標）特異的変異

RUBY（商標）ID	可変ドメインにおける RUBY（商標）変異*	定常ドメインにおける RUBY（商標）変異**
AC_05293	鎖 H1 の VH 及び VL における Q44R 鎖 L1 の VL における Q44E 鎖 H2 の VH における Q44E	鎖 H1 の CH1 における H168A+F170G 鎖 H2 の CH1 における T187E 鎖 H1 の CKappa における S114A+N137K 鎖 L1 の CKappa における L135Y+S176W

*IMGT 番号付けシステムによる

**EU 又は Kabat 番号付けシステムによる

【０３０９】

遺伝子合成及びクローニング

特定された目的の脱免疫化変異を組み込んだ遺伝子断片を、Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから入手し、標準的なＩＩＳ型クローニングを使用して、ｂｓＡｂ　ＡＣ＿０５２９３の追加の部分をコードする遺伝子断片とともにＡｌｌｉｇａｔｏｒのｐＣＤＮＡ３．４発現ベクターにクローニングした。

【０３１０】

タンパク質の産生及び精製

抗体を、製造元の説明書に従って、異なる体積（高スループット１．２ｍＬ又は３０ｍＬ）で、一過性Ｅｘｐｉ２９３（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）培養を使用して発現させた。高スループット発現からの上清について、ＮＧＣシステム（ＢｉｏＲａｄ）又はＰｒｅｄｉｃｔｏｒ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ　５０μｌ　９６ウェルプレート（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、３０ｍＬ培養からの上清の精製をプロテインＡ上で行った。細胞を、ｂｓＡｂを構成する３つの共発現ポリペプチド鎖の各々を別々にコードする３つの異なるベクターでトランスフェクトした。

【０３１１】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣ

凝集は、周囲温度及び０．３５ｍｌ／分の流量で、ＴＳＫゲルＳｕｐｅｒ　ＳＷ　ｍＡＢ　ＨＴＰ　４μｍ、４．６×１５０ｍｍカラム（ＴＯＳＯＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）及び移動相として１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、３００ｍＭのＮａＣｌを使用して、１２６０　Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　ＩＩシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）のＳＥ－ＨＰＬＣで測定した。

【０３１２】

ＬａｂＣＨＩＰ

全ての試料の分析は、製造元の説明に従って、当社のルーチンガイドラインＤＯＣＩＤ－３７１８３７７４０－１５に従って、ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で行った。簡潔に述べると、２μＬの各タンパク質試料（還元又は非還元）を９０℃で５分間変性させ、遠心分離し、マイクロ流体チップに充填した。

【０３１３】

単一ＥＬＩＳＡ

プレートを、０．５μｇ／ｍＬのＣＤ４０又はＥｐＣＡＭのいずれかで、ＰＢＳ中に４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０（ＰＢＳＴ）で洗浄した後、プレートをＰＢＳ／２％　ＢＳＡで少なくとも３０分間ブロッキングしてから、再び洗浄した。次いで、ＰＢＳ／０．５％　ＢＳＡで段階希釈した試料を添加し、室温で少なくとも１時間結合させた。洗浄後、プレートを、二次抗カッパ抗体と室温で少なくとも１時間インキュベートした。洗浄後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｐｉｃｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔを基質として使用し、Ｆｌｕｏｓｔａｒ　Ｏｐｔｉｍａを使用して発光シグナルを測定した。

【０３１４】

二重ＥＬＩＳＡ

プレートを、ＰＢＳ中の０．５μｇ／ｍＬのＣＤ４０で、４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０（ＰＢＳＴ）で洗浄した後、プレートを、ＰＢＳ／２％　ＢＳＡで少なくとも３０分間ブロッキングしてから、再び洗浄した。次いで、ＰＢＳ／０．５％　ＢＳＡで段階希釈した試料を添加し、室温で少なくとも１時間結合させた。洗浄後、プレートを、０．５μｇ／ｍＬのビオチン化ＥｐＣＡＭで、室温で少なくとも１時間インキュベートした。ＣＤ４０及びＥｐＣＡＭとの二重複合体化ｂｓＡｂを、ＨＲＰ標識ストレプトアビジンで検出した。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｐｉｃｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔを基質として使用し、Ｆｌｕｏｓｔａｒ　Ｏｐｔｉｍａを使用して発光シグナルを測定した。

【０３１５】

Ｏｃｔｅｔ

動態測定は、Ｏｃｔｅｔ　ＲＥＤ９６プラットフォーム（ＦｏｒｔｅＢＩｏ）を使用して行った。ビオチン化抗原を、０．２５μｇ／ｍＬのＣＤ４０又は０．５μｇ／ｍＬのＥｐＣＡＭの抗原濃度でストレプトアビジンセンサー（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）にカップリングした。抗体を、１０ｎＭのＣＤ４０又は２５ｎＭのＥｐＣＡＭの開始濃度で、１×Ｋｉｎｅｔｉｃ緩衝液（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）中で１／２段階希釈し、抗原結合センサーへの結合について分析した。会合を、３００秒間追跡し、続いて、１×Ｋｉｎｅｔｉｃ緩衝液中で３００秒間解離した。センサーチップは、１０ｍＭグリシン、ｐＨ１．７を使用して再生した。生成されたデータを、平行な緩衝液ブランクを差し引いて参照し、ベースラインをｙ軸に揃え、解離に対するアラインメントによるステップ間相関を行い、データを、データ分析ソフトウェアのＳａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙフィルタリングによって平滑化した（ｖ．９．０．０．１４）。フィッティング精度の測定として、Ｘ２の１：１ラングミュア結合モデルを用いて処理データをフィッティングした。

【０３１６】

熱安定性

融解温度（Ｔｍ１）及び凝集温度（Ｔａｇｇ）をＵＮＣｌｅシステム（ＵＮｃｈａｉｎｅｄ　ｌａｂｓ）で測定した。固有蛍光を、２０℃から９５℃まで０．４℃／分の速度で直線的に温度を上げながら測定した。デフォルト設定を使用して、ＵＮｃｌｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェアバージョン２．０を使用してデータ分析を行った。

【０３１７】

安定性

最適化されていない緩衝液（ＰＢＳ）中の試料を、２～８℃及び４０℃で１週間、２週間、及び４週間インキュベートするか、又は３回（２４時間、４８時間、及び７２時間）の凍結融解に供した。目視検査を行い、ＳＥ－ＨＰＬＣ、ＬａｂＣｈｉｐ、及び二重ＥＬＩＳＡを用いてタンパク質分解を測定した。

【０３１８】

剪断応力安定性

３連の試料を、９６ウェルプレートシェーカーＭｉｘＭａｔｅ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）で、２０００ｒｐｍで３０分間激しく撹拌する形で剪断応力に供した。タンパク質沈殿物を、３０００ｇで１０分間遠心分離することによって除去し、２８０ｎｍでの吸光度を、ＢｉｇＬｕｎａｔｉｃを使用して測定した。

【０３１９】

コロイド安定性

試料を、４％～３６％の範囲の異なるＰＥＧ濃度を有するＰＢＳ／ＰＥＧ溶液と混合し、９６ウェルフィルタープレートに２連で添加し、室温で一晩インキュベートした。１２０００ｇで１５分間遠心分離することによって得られた濾液を回収し、２８０ｎｍでの吸光度を（タンパク質の損失を決定するために）、ＢｉｇＬｕｎａｔｉｃを使用して測定し、対照と比較した。

【０３２０】

結果及び結論

新規の脱免疫化ＲＵＢＹバリアントに組み合わせる変異の選択

単一部位変異体の産生及びＥＬＩＳＡ評価から得られた非常に有望な結果に基づいて、これらの部位を取り巻く三次元構造を検討した後、各リスク部位について有望な変異のセットを選択した。疎水性、電荷、及びサイズなどの生物物理学的特性、並びに周囲のアミノ酸の側鎖との有益／有害な相互作用の可能性を考慮し、選択されたセットの変異体を表５に列挙する。

【表１５】

表５．タンパク質の産生及び評価のために選択された配列番号及び変異。

		ID 番号	変異
セット A	CKappa 軽鎖上の S114A* によって引き起こされる予測された MHCII 結合を低減する変異	4109	I126A**
		4110	I126G**
		4115	I126S**
		4117	T109P*
		4120	A111V*
セット B	CH1 上の T187E*によって引き起こされる、予測された MHCII 結合を低減する変異	4126	Y180I*
		4131	Y180W*
		4133	S183T*
		4134	V188G*

*EU 又は Kabat 番号付けシステムによる

**IMGT 番号付けシステムによる

【０３２１】

製造可能性

一過性培養からＢｓＡｂ二重変異体を作製した。３０ｍＬ培養でＥｘｐｉ２９３の発現を行った。ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ精製後にＢｉｇＬｕｎａｔｉｃによって決定されたＡ２８０測定値を使用して、発現収率を計算した。タンパク質のサイズ、凝集、及び断片化を確認するために、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析を行った。加えて、ＬａｂＣＨＩＰ（還元及び非還元条件）を行って、凝集及び断片化を更に評価した。２０のバリアントのうちの１６は、１００ｍｇ／Ｌを超える収率（表６）及び９８％を超える純度を有した。全体として、野生型ｂｓＡｂと同等の良好な収率及び純度が得られた。

【表１６】

表６．発現収率、及び二重 bsAb 変異体についての SEC-HPLC データ。

BsAb バリアント	収量 (mg/L)	HMWS* (%)	メインピーク 面積(%)	LMWS** (%)
AM_4109-4126	68	2	98	0.1
AM_4109-4131	121	2	98	0.2
AM_4109-4133	148	1	99	0.1
AM_4109-4134	123	2	98	0.2
AM_4110-4126	118	2	98	0.2
AM_4110-4131	136	2	97	0.2
AM_4110-4133	125	2	98	0.1
AM_4110-4134	93	3	97	0.2
AM_4115-4126	73	5	95	0.2
AM_4115-4131	79	5	95	0.2
AM_4115-4133	128	2	98	0.1
AM_4115-4134	110	3	97	0.1
AM_4117-4126	160	2	98	0.1
AM_4117-4131	152	2	98	0.1
AM_4117-4133	155	1	99	0.1
AM_4117-4134	155	2	98	0.1
AM_4120-4126	147	1	99	0.1
AM_4120-4131	141	1	99	0.1
AM_4120-4133	153	1	99	0.1
AM_4120-4134	120	2	98	0.1
wt bsAb (AC_05293)	159	1	99	0.1

*高分子量種

**低分子量種

【０３２２】

二重ＥＬＩＳＡ

単一及び二重ＥＬＩＳＡを行って、異なる二重変異体バリアントの標的への結合を評価した。単一ＥＬＩＳＡデータは、全てのバリアントについて、それらの単一の標的（ＣＤ４０又はＥｐＣＡＭ）への良好な結合を示した（データは示さず）。結合の減少を示したバリアントＡＭ＿４１１５～４１２６及びＡＭ＿４１１５～４１３１（図２）を除いて、二重ＥＬＩＳＡで同様の傾向が観察された。

【０３２３】

Ｏｃｔｅｔ

全てのバリアントの結合親和性を、Ｏｃｔｅｔ（Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用

して決定した。ビオチン化抗原（ＣＤ４０又はＥｐＣＡＭ）をストレプトアビジンバイオセンサー上に固定化し、溶液中のバリアント及び野生型ｂｓＡｂへの結合を測定した。全てのバリアント及びＣＤ４０への野生型ｂｓＡｂの結合について、同様のＫＤが観察された。Ｉ１２６Ｓ変異（ＩＤ番号４１１５）を有する全ての変異体を除いて、ＥｐＣＡＭに結合した場合、わずかに高いＫＤを示す同様の傾向を示した（表７）。Ｉ１２６Ｓ変異体に対するＥｐＣＡＭ親和性の低減は、ＥＬＩＳＡで得られた結果と一致している（図２）。

【表１７】

表７．Octet による結合親和性測定。

	CD40			EpCAM		
BsAb バリアント	KD(M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD(M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
AM_4109-4126	1.2E-09	4.8E+05	6.0E-04	4.3E-09	1.8E+05	7.7E-04
AM_4109-4131	8.9E-10	8.0E+05	7.2E-04	4.4E-09	1.8E+05	8.1E-04
AM_4109-4133	7.3E-10	1.4E+06	1.0E-03	4.6E-09	2.0E+05	9.2E-04
AM_4109-4134	8.3E-10	1.1E+06	9.2E-04	4.7E-09	2.1E+05	9.8E-04
AM_4110-4126	1.5E-09	3.5E+05	5.1E-04	5.1E-09	1.7E+05	9.0E-04
AM_4110-4131	1.2E-09	4.5E+05	5.6E-04	4.7E-09	2.0E+05	9.5E-04
AM_4110-4133	1.1E-09	6.8E+05	7.5E-04	4.9E-09	1.9E+05	9.6E-04
AM_4110-4134	8.8E-10	8.6E+05	7.5E-04	5.3E-09	2.0E+05	1.1E-03
AM_4115-4126	1.1E-09	7.4E+05	8.5E-04	6.9E-09	1.7E+05	1.1E-03
AM_4115-4131	9.7E-10	9.2E+05	8.9E-04	7.2E-09	1.8E+05	1.3E-03
AM_4115-4133	1.0E-09	1.1E+06	1.1E-03	7.0E-09	1.8E+05	1.3E-03
AM_4115-4134	1.1E-09	9.3E+05	1.0E-03	6.9E-09	1.9E+05	1.3E-03
AM_4117-4126	1.2E-09	4.0E+05	4.8E-04	4.6E-09	2.2E+05	1.0E-03
AM_4117-4131	1.0E-09	6.3E+05	6.6E-04	4.5E-09	2.6E+05	1.2E-03
AM_4117-4133	9.3E-10	7.5E+05	7.0E-04	4.6E-09	2.6E+05	1.2E-03
AM_4117-4134	9.7E-10	7.4E+05	7.2E-04	5.2E-09	2.3E+05	1.2E-03
AM_4120-4126	8.6E-10	1.2E+06	1.0E-03	5.6E-09	2.3E+05	1.3E-03
AM_4120-4131	1.1E-09	9.2E+05	9.7E-04	5.3E-09	2.8E+05	1.5E-03
AM_4120-4133	9.0E-10	1.2E+06	1.1E-03	5.7E-09	2.4E+05	1.4E-03
AM_4120-4134	9.1E-10	1.2E+06	1.1E-03	5.8E-09	2.5E+05	1.4E-03
wt bsAb (AC_05293)	9.3E-10	1.1E+06	1.0E-03	4.8E-09	2.3E+05	1.2E-03

【０３２４】

安定性

バリアントの安定性を評価するために、融解温度（Ｔｍ）、剪断応力、コロイド安定性、及び異なる温度での保管安定性を評価した。

【０３２５】
熱安定性
バリアントの融解（Ｔｍ１）及び凝集温度（Ｔａｇｇ）を決定するために、ＵＮｃｌｅ機器（ＵＮｃｈａｉｎｅｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して分析を行った。変異Ｉ１２６Ａ（４１０９）、Ｉ１２６Ｇ（４１１０）、及びＩ１２６Ｓ（４１１５）を有するバリアントは、ｗｔ　ｂｓＡｂと比較して、Ｔｍ１をわずかに低下させたが（６５℃未満）、Ｔ１０９Ｐ（４１１７）及びＡ１１１Ｖ（４１２０）バリアントは、６５℃未満のＴｍ１を有した（図３）。一方、凝集温度は、全てのｂｓＡｂ二重変異体について非常に類似しており、ＷＴ　ｂｓＡｂと同等（すなわち、約７５℃±１～２℃）であった。
【０３２６】
高温及び凍結／融解安定性
タンパク質を４０℃で最大４週間インキュベートすることによって、高温での安定性を行った。４週間のインキュベーション後、全ての試料についてＬａｂＣＨＩＰ及び二重ＥＬＩＳＡ分析を行い、１週目、２週目、及び４週目に、試料についてＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析を行った。タンパク質を－８０℃でインキュベートし、２４時間、４８時間、及び７２時間後に、３７℃に設定された水浴中で融解することによって、凍結融解安定性を評価した。ＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析は、２４時間及び７２時間後に融解させた試料のみに対して行った。加えて、全ての試料を、３つの時点の各々で、任意の粒子について目視検査した。４週間のインキュベーション後でさえ、４０℃での保管後の全てのバリアントについて、最小限の凝集（ＨＭＷの＜３％の変化）が観察され、全ての二重変異体について非常に高い温度安定性を示した（図４）。ＷＴ　ｂｓＡｂと比較して、３回の凍結／融解後のわずかな凝集が、Ｉ１２６Ａ（４１０９）及びＩ１２６Ｇ（４１１０）について観察された。驚くべきことに、Ｉ１２６Ｓ（４１１５）、Ｔ１０９Ｐ（４１１７）、及びＡ１１１Ｖ（４１２０）を有する全ての変異体は、ＷＴ　ｂｓＡｂ（図５）と比較して、改善された凍結融解を示した。これは、変異が、潜在的な予測されたＭＨＣＩＩ結合の減少をもたらすだけでなく、安定性も改善することを示す。
【０３２７】
剪断応力
剪断応力による分解に耐える全てのバリアントの能力の評価は、Ａｌｌｉｇａｔｏｒの自社開発の剪断応力アッセイを使用して行った。アッセイは、所与の振盪速度及び時間での撹拌に基づく。撹拌前後のＡ２８０の変化を計算することによって、タンパク質損失の量を決定する。撹拌前後のタンパク質濃度間の差が小さかったため、全てのバリアントは、高度に剪断応力安定であることが示された（図６）。全体として、全ての構築物について、撹拌によるタンパク質損失は、１０％未満であった。
【０３２８】
コロイド安定性
バリアントを、ＰＥＧ沈殿アッセイを使用して、コロイド安定性について更に評価した。タンパク質溶液への異なる濃度のＰＥＧの添加は、排除体積効果の結果として沈殿をもたらす。長鎖ポリマーであるＰＥＧは、同様の分子量のタンパク質よりも溶液中でより多くの空間を占めるため、タンパク質の溶解度を低下させ、タンパク質の沈殿をもたらす。アッセイは、試料中のタンパク質量の５０％を沈殿させるのに必要なＰＥＧの濃度として測定されるコロイド安定性の相対測定値を提供する。ＰＥＧ濃度が高いほど、コロイド安定性が高くなる。値は、高いコロイド安定性を有すると考えられ、５０％のタンパク質沈殿物を得るには８～９％のＰＥＧが必要であることが知られている対照と比較される。全ての二重変異体バリアントは、ＷＴ　ｂｓＡｂと同等のコロイド安定性を示し、対照よりも性能が良好であった（図７）。
【０３２９】
全体として、試験した二重バリアントのうちのいくつかは、一過性培養において概して良好な結合、安定性、及び製造可能性を示した。定常軽鎖における変異Ｉ１２６Ｓ、Ｔ１０９Ｐ、Ａ１１１Ｖ、及び定常重鎖ドメインＣＨ１における変異Ｓ１８３Ｔ及びＶ１８８

Ｇは、安定性に関して特に有益であり、定常軽鎖における変異Ｔ１０９Ｐ、Ａ１１１Ｖ、及び定常重鎖ドメインＣＨ１における変異Ｓ１８３Ｔ及びＶ１８８Ｇの組み合わせは、全体的に良好な標的結合、高い熱安定性、コロイド安定性、及び概して高い応力安定性（高温、凍結／融解、及び剪断応力などの応力を含む）をもたらした。

【０３３０】

実施例３－ＭＨＣ関連ペプチドプロテオミクス（ＭＡＰＰ）アッセイを使用したＭＨＣクラスＩＩ結合ペプチドの特定

目的

本研究の目的は、抗原提示細胞によって自然にプロセシングされ、ＭＨＣクラスＩＩに提示される、鎖Ｈ２のＣＨ１における変異Ｓ１８３Ｔ及び鎖Ｈ１のＣＫａｐｐａにおける変異Ｔ１０９Ｐの最適化の有無で、ＲＵＢＹ（商標）二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）に由来する非自己ペプチドを特定することである。ＭＨＣクラスＩＩに提示されるそのような非自己ペプチドは、免疫原性応答及び望ましくない抗薬物抗体の誘導を誘発する可能性を有する。したがって、二重特異性抗体などのタンパク質薬物中のそのようなペプチドの数の減少は有益であり、臨床環境におけるより良好な安全性プロファイルにつながる可能性がある。

【０３３１】

材料及び方法

表８に、アッセイに含まれる２つのＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂ、及び含まれる一連の最適化変異を記載する。表８に列挙されている変異に加えて、両方のＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂは、変異、鎖Ｈ１の可変重（ＶＨ）ドメイン及び可変軽（ＶＬ）ドメインにおけるＱ４４Ｒ、並びに鎖Ｌ１のＶＬドメインにおけるＱ４４Ｅ及び鎖Ｈ２のＶＨにおけるＱ４４Ｅ、を有する。しかしながら、可変ドメインの変異を包含する任意のペプチドは、その特定の可変ドメインの特異的アミノ酸配列の影響を受ける可能性が高く、ＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂ形式の固有の特徴ではないため、ｂｓＡｂの定常ドメインに組み込まれたＲＵＢＹ（商標）特異的変異のみがこの評価で考慮される。

【表１８】

表８．MAPPアッセイで評価されたRUBY（商標）bsAbの定常ドメインにおける変異の要約

RUBY（商標）ID	定常ドメインにおけるRUBY（商標）変異	追加の最適化変異
AC_05293	鎖H1のCH1におけるH168A+F170G 鎖H2のCH1におけるT187E 鎖H1のCKappaにおけるS114A+N137K 鎖L1のCKappaにおけるL135Y+S176W	-
Multi46		鎖H2のCH1におけるS183T 鎖H1のCKappaにおけるT109P

【０３３２】

簡潔には、単球由来樹状細胞（ＭｏＤＣ）は、１０人の健康なドナー（表８で利用可能なＨＬＡタイピング）のコホートに由来し、試験試料とインキュベートした。次いで、ＭｏＤＣを溶解させ、ＨＬＡ－ＤＲ／ペプチド複合体を免疫捕捉し、ペプチドを溶出し、質量分析（ＭＳ）によって配列決定した。ＭＳデータの分析は、個々のドナーに固有であり、複数のドナーにわたって共通のペプチドを特定した。特定されたペプチドを更に分析して、最終データセットから自己ペプチド配列を除外した。自己ペプチド配列は、胸腺選択又は末梢Ｔ細胞寛容性のいずれかに起因して、抗薬物抗体（ＡＤＡ）応答を誘導することができるＴ細胞エピトープが含まれている可能性は低いと考えられる。

【表１９】

表９．MAPPアッセイに含まれるドナーで特定されたHLAハプロタイプ。

ドナー番号	ハプロタイプ									
	DRB1	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQA1	DQB1	DQB1
1	04:05	07:01			01:03		02:01	03:03	02:02	03:02
2	01:01	04:01			01:03		01:01	03:03	03:01	05:01
3	07:01	15:02			01:03	01:02	01:03	02:01	02:02	06:01
4	03:01	13:02	01:01	03:01			01:02			
5	04:01	11:01	02:02		01:03		03:03	05:05	03:01	
6	11:01		02:02				05:05		03:01	
7	04:07	08:01			01:03		03:03	04:01	03:01	04:02
8	03:01	04:01	01:01		01:03		03:01	05:01	02:01	03:02
9	09:01	13:01	02:02		01:03		01:03	03:02	03:03	06:03
10	03:01	11:04	02:02				05:01	05:05	02:01	03:01

【０３３３】

加えて、特定された全ての非自己ペプチドのインシリコ分析は、ｉＴｏｐｅ－ＡＩアルゴリズム（Ａｂｚｅｎａ　Ｌｔｄ）を使用して行われ、４６の最も一般的なＭＨＣクラスＩＩ対立遺伝子への結合が予測された。「位置リスクスコア」が計算され、各アロタイプへの予測された結合の合計を表す。

【０３３４】

結果及び結論

表１０及び表１１に、ＡＣ＿０５２９３及びＭｕｌｔｉ４６についてのＭＡＰＰアッセイ及びインシリコ予測からの結果を要約する。一般に、ＲＵＢＹ（商標）特異的変異によって生成された特定されたペプチドの数は低く、そのようなペプチドを提示するドナーの頻度は３０％以下であった。ＡＣ＿０５２９３の場合、Ｈ１鎖のＣＨ１における変異Ｈ１６８Ａ若しくはＨ１７０Ｇ、又はＬ１鎖のＣＫａｐｐａにおける変異Ｌ１３５Ｙを包含するペプチドは、いずれのドナーにおいても特定されなかった。鎖Ｈ１のＣＫａｐｐａにおける変異Ｓ１１４Ａ及びＮ１３７Ｌ、Ｈ２のＣＨ１におけるＴ１８７Ｅ、並びにＬ１のＣＫａｐｐａにおけるＳ１７６Ｗを含む様々な数のペプチドが、１～３人のドナーで特定され、これらのペプチドの総位置リスクスコアは、４～８１の範囲であった（総ｂｓＡｂ位置リスクスコア＝１２２）。Ｍｕｌｔｉ４６の分析では新しいペプチドクラスターは特定されなかったが、鎖Ｈ１のＣＫａｐｐａにおける最適化変異Ｔ１０９Ｐ及び鎖Ｈ２のＣＨ１におけるＳ１８３Ｔの導入により、特定されたペプチドの数及び総位置リスクスコアの両方が減少した。最適化変異Ｔ１０９Ｐの導入後、ＡＣ＿０５２９３の分析において、２人のドナーで特定されたこの変異をカバーする２つのペプチドと比較して、Ｈ１のＣＫａｐｐａにおけるＲＵＢＹ（商標）特異的変異Ｓ１１４Ａをカバーするペプチドは、１０人のドナーのいずれにおいても特定されなかった。最適化変異Ｓ１８３Ｔの導入は、鎖Ｈ２のＣＨ１における変異Ｔ１８７Ｅをカバーする提示されたペプチドの数を減少させなかったが、そのようなペプチドを提示するドナーの頻度は、３から２に減少し、これらのペプチドの総位置リスクスコアは１２から８に減少した。全体で、Ｈ１鎖のＣＫａｐｐａ及びＨ２鎖のＣＨ１への２つの最適化変異の導入によって、ｂｓＡｂ位置リスクスコアの合計が、１２２から３７に劇的に減少した。

【表２０－１】

表１０．MAPP及びAC_05293のインシリコ分析からの結果の要約

鎖	変異	ペプチド配列	ペプチドを提示するドナー(複数可)	頻度(%)	総位置リスクスコア
H1	H168A (CH1)	-	-	-	
	F170G (CH1)	-	-	-	
	S114A (CKappa)	TKLEIKRTVAAPAVFI (配列番号 207)	2, 4	20	81
		TKLEIKRTVAAPAVFIFPP (配列番号 208)	4		
	N137L (CKappa)	SGTASVVCLLKNFYPREA (配列番号 209)	10	10	4
		GTASVVCLLKNFYPR (配列番号 210)	10		
		TASVVCLLKNFYPR (配列番号 211)	10		
H2	T187E (CH1)	SSGLYSLSSVVEVPS (配列番号 212)	2, 4, 9	30	12
		SSGLYSLSSVVEVPSS (配列番号 213)	2, 4, 9		
		SGLYSLSSVVEVPS (配列番号 214)	2, 4, 9		
		SGLYSLSSVVEVPSS (配列番号 215)	2, 4		
L1	L135Y (CKappa)	-	-	-	
	S176W (CKappa)	EQDSKDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 216)	2	20	25
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 217)	2		
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 218)	2		
		QDSKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 219)	2		

【表２０－２】

		DSKDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 220)	2		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 221)	2, 3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 222)	3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKADY (配列番号 223)	3		
		SKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 224)	2		
		SKDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 225)	3		
		KDSTYSLWSTLTL (配列番号 226)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 227)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 228)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 229)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSKADY (配列番号 230)	3		
		DSTYSLWSTLTLSK (配列番号 231)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 232)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 233)	3		

【表２１－１】

表１１．MAPP及びMulti46のインシリコ分析からの結果の要約

鎖	変異（最適化変異を太字で示す）	ペプチド配列	ペプチドを提示するドナー(複数可)	頻度(%)	総位置リスクスコア
H1	H168A (CH1)	-	-	-	
	F170G (CH1)	-	-	-	
	T109P + S114A (CKappa)	-	-	-	
	N137L (CKappa)	SGTASVVCLLKNFYPR (配列番号 234)	10	20	4
		SGTASVVCLLKNFYPRE (配列番号 235)	10		
		SGTASVVCLLKNFYPREA (配列番号 236)	10		
		SGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKV (配列番号 237)	3		
		GTASVVCLLKNFYPR (配列番号 238)	10		
		TASVVCLLKNFYPR (配列番号 239)	10		
H2	**S183T** + T187E (CH1)	SSGLYSLSSVVEVPS (配列番号 240)	2, 4	20	8
		SSGLYSLSSVVEVPSS (配列番号 241)	2, 4		
		SSGLYSLSSVVEVPSSS (配列番号 242)	4		
		SGLYSLSSVVEVPS (配列番号 243)	2, 4		
L1	L135Y (CKappa)	-	-	-	
	S176W (CKappa)	EQDSKDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 244)	2	20	25
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 245)	2		
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 246)	2		
		DSKDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 247)	2		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 248)	2, 3		

【表２１－２】

		DSKDSTYSLWSTLTLSKAS (配列番号 249)	3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKADY (配列番号 250)	3		
		SKDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 251)	2		
		SKDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 252)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSK (配列番号 253)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 254)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 255)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSKADY (配列番号 256)	3		
		DSTYSLWSTLTLSK (配列番号 257)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKA (配列番号 258)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKAD (配列番号 259)	3		
		TYSLWSTLTLSKA (配列番号 260)	3		

【０３３５】

全体として、Ｈ１鎖のＣＫａｐｐａにおける変異Ｔ１０９Ｐ及びＨ２鎖のＣＨ１における変異Ｓ１８３Ｔの最適化の有無で、２つのＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂで行われたＭＡＰＰ及びインシリコ予測は、これらの変異の導入により、提示されたペプチドの総数、これらのペプチドを提示するドナーの頻度、並びに提示されたペプチドの予測されたリスクスコアが減少したことを明確に実証する。したがって、そのような最適化変異をＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂに付加することは、免疫原性応答の誘導のリスクを低減する可能性を有する。

【０３３６】

実施例４－ＲＵＢＹ（商標）二重特異性抗体の精製プロセスにおいて共精製されるＦａｂ断片のレベルを低減するための変異戦略

背景及び目的

ＲＵＢＹ（商標）二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）形式の複雑な設計は、いずれの正しいサイズの副生成物の形成も可能にしないが、鎖２（Ｌ１）及び鎖３（Ｈ２）の誤った対合によるＦａｂ断片の形成が起こり得る。そのような可溶性Ｆａｂ断片が、ＩＧＨＶ３生殖系列遺伝子ファミリーに由来する重鎖可変（ＶＨ）ドメインを有する場合、それらは、ＶＨに位置するプロテインＡ結合部位を天然に有し、この部位は、そのようなＦａｂ断片の望ましくない共精製を可能にする。このプロテインＡ結合部位は、フレームワーク領域１、３及びＶＨのＣＤＲＨ２の保存された部分であることが特定されている（Ｂａｃｈ，Ｌｅｗｉｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１５）。ＲＵＢＹ（商標）の製造可能性を更に改善するために、これらの望ましくないＦａｂ生成物がプロテインＡに結合する能力を有さず、それによって、正しいサイズのＲＵＢＹ（商標）生成物と共精製されるその能力が阻害されるように分子を操作することが望ましいであろう。

【０３３７】

この試験の目的は、ＩＧＨＶ３起源のＶＨを有するＨ２鎖に見出されるプロテインＡ結合部位を破壊する可能性のある一連の変異（ｎ＝３）（表１２を参照）を評価することであった。一連の変異を、そのようなＩＧＨＶ３起源のＶＨをそのＨ２鎖内に有する３つの異なるＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂに導入し、製造可能性及び抗原結合に関して評価した。

【０３３８】

材料及び方法

ＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂの産生及び精製

表１２に列挙されている一連のＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂを、３つの親ｂｓＡｂ　ＡＣ＿０５３３２、ＡＣ＿０５３３０、及びＡＣ＿０５３０２とともに発現させた。この研究に含まれる全てのＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂはまた、表１３に列挙されている一連の形式特異的変異も有する。製造元のプロトコルに従って、一過性Ｅｘｐｉ２９３　ＨＥＫ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞を使用して、合計１２種類のｂｓＡｂのセットを、３０ｍＬ又は６０ｍＬ培養で発現させた。製造元のプロトコルに従って、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ、１ｍＬ、カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、ＮＧＣ１０（ＢｉｏＲａｄ）システムで、産生されたＲＵＢＹ　ｂｓＡｂの精製を行った。

【表２２】

表１２．産生及び評価された親 RUBY（商標）bsAb 及び変異型 RUBY（商標）bsAb のリスト。

親 RUBY（商標）	H2 鎖変異*	新規 RUBY ID	特異性
AC_05332	T65E	AC_05370	5T4xCD40
AC_05332	T65A	AC_05371	5T4xCD40
AC_05332	T65I	AC_05372	5T4xCD40
AC_05330	T65E	AC_05373	CD40x5T4
AC_05330	T65A	AC_05374	CD40x5T4
AC_05330	T65I	AC_05375	CD40x5T4
AC_05302	T65E	AC_05376	CD40x5T4
AC_05302	T65A	AC_05377	CD40x5T4
AC_05302	T65I	AC_05378	CD40x5T4

*IGMT 番号付けによる

【表２３】

表１３．評価した一連の bsAb に含まれる RUBY（商標）特異的変異

可変ドメインにおける RUBY（商標）変異*	定常ドメインにおける RUBY（商標）変異**
鎖 H1 の VH 及び VL における Q44R 鎖 L1 の VL における Q44E 鎖 H2 の VH における Q44E	鎖 H1 の CH1 における H168A+F170G 鎖 H2 の CH1 における T187E 鎖 H1 の CKappa における S114A+N137K 鎖 L1 の CKappa における L135Y+S176W

*IMGT 番号付けシステムによる

**EU 又は Kabat 番号付けシステムによる

【０３３９】

製造可能性の評価

プロテインＡ精製後、Ｌｕｎａｔｉｃ（ＵＮｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ）によって決定されたＡ２８０測定値を使用して、発現収率を計算した。可溶性Ｆａｂ断片などの低分子量（ＭＷ）夾雑物の凝集及び存在を、周囲温度及び０．３５ｍｌ／ｍｉｎ^{6}の流量で、ＴＳＫゲルＳｕｐｅｒ　ＳＷ　ｍＡＢ　ＨＴＰ　４μｍ、４．６×１５０ｍｍカラム（ＴＯ

ＳＯＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）及び移動相として１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、３００ｍＭのＮａＣｌを用いて、１２６０　Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　ＩＩシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）のＳＥ－ＨＰＬＣで測定した。製造元の説明書に従って、ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ　Ｔｏｕｃｈ電気泳動システムを使用してタンパク質品質を評価した。

【０３４０】

二重標的ＥＬＩＳＡ及びフローサイトメトリーを使用した抗原結合の評価

二重標的ＥＬＩＳＡによって抗原結合を評価した。簡潔には、ＥＬＩＳＡプレートで、ＰＢＳ中の０．５μｇ／ｍｌの関連する抗原を、４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０（ＰＢＳＴ）で洗浄した後、プレートを、ＰＢＳＴ／２％ＢＳＡで少なくとも３０分間ブロッキングしてから、再び洗浄した。次いで、ＰＢＳＴ／０．５％　ＢＳＡで段階希釈した試料を添加し、室温で少なくとも１時間結合させた。洗浄後、プレートを、０．５μｇ／ｍＬのビオチン化された第２の抗原で、室温で少なくとも１時間インキュベートした。二重複合体化ｂｓＡｂを、ＨＲＰ標識ストレプトアビジンで検出した。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｐｉｃｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔを基質として使用し、Ｆｌｕｏｓｔａｒ　Ｏｐｔｉｍａを使用して発光シグナルを測定した。親ＲＵＢＹ対と変異ＲＵＢＹ対との間の結合を比較した。

【０３４１】

細胞上で発現されたそれぞれの標的への結合を、フローサイトメトリーを使用して評価した。簡潔には、５Ｔ４を発現するように修飾されたＣＨＯ細胞、ＣＤ４０を発現するように修飾されたＢ１６細胞、並びに野生型ＣＨＯ及びＢ１６細胞株を、滴定濃度のＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂでインキュベートした。抗体の結合を、蛍光色素コンジュゲート抗ヒトＩｇＧを使用して検出し、フローサイトメトリーを使用して分析した。

【０３４２】

結果及び結論

収率が１４～１８１ｍｇ／Ｌの範囲の様々なレベルで産生された１２種類のＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂ（表１４）。ＡＣ＿０５３７５（Ｔ６５Ｉ）及びＡＣ＿０５３７６（Ｔ６５Ｅ）を除いて、両方とも親バリアントよりも有意に低く産生されたが、親ｂｓＡｂと変異型ｂｓＡｂとの間にはわずかな差しか観察できなかった。全てのバリアントＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂには、プロテインＡ精製後のそれらの親ｂｓＡｂと比較して、有意に少ない量のＦａｂ断片などの低分子量種が含まれていた。親ｂｓＡｂと変異ｂｓＡｂとの間には、凝集レベル（ＨＭＷ種）のわずかな差異しか観察できなかった。

【表２４】

表１４．12種類のRUBY（商標）bsAbの製造可能性データの概要。

BsAb ID	収率(mg/L)	単量体画分(%)	LMWS* (%)	HMWS* (%)
AC_05332	173	81.8	13.1	5.1
AC_05370	181	92.8	0.5	6.7
AC_05371	144	92.4	0.7	7
AC_05372	124	89.2	2.4	8.4
AC_05330	68	85	14.5	0.5
AC_05373	77	99.1	0	0.9
AC_05374	69	98.9	0	1.1
AC_05375	14	95.9	0	4.1
AC_05302	169	71.1	26.5	2.4
AC_05376	23	94.6	0.2	5.2
AC_05377	106	95	1.4	3.6
AC_05378	109	95.8	0.3	3.9

*LMWS＝低分子量種；HMWS＝高分子量種

【０３４３】

次に、タンパク質品質及び共精製Ｆａｂ断片のレベルを、ＬａｂＣｈｉｐ分析を使用して評価した。表１５に見られるように、Ｔ６５Ｅ、Ｔ６５Ａ、又はＴ６５Ｉ変異のうちのいずれかの導入は、タンパク質精製後の共精製Ｆａｂ断片のレベルを劇的に低下させた。プロテインＡ部位破壊変異の導入によって誘導されたインタクトなＲＵＢＹ（商標）ｂｓＡｂのレベルの変化（メインピークレベル、Ｆａｂ断片の変化に対する補正）は、ＡＣ＿０５３３２への変異Ｔ６５Ａ及びＴ６５Ｉを除いて概して小さく、産生されたｂｓＡｂの品質に劇的な影響を与えた。

【表２５】

表１５．インタクトなRUBY（商標）bsAb及び共精製される可溶性Fab断片のレベルを要約するLabChipデータ。

タンパク質ID	メインピーク (約250kDa、%)	Fab断片 (約50kDa、%)
AC_05332	80.1	11.6
AC_05370	92.1	0
AC_05371	62.6	0.2
AC_05372	11.8	0.2
AC_05330	86.1	14.0
AC_05373	92.5	0
AC_05374	88.3	0
AC_05375	98.9	1.2
AC_05302	71.4	27.1
AC_05376	95.0	0
AC_05377	98.6	1.4
AC_05378	97.8	0.6

【０３４４】

図８に、二重標的ＥＬＩＳＡ分析の結果を要約する。ＡＣ＿０５３３２の両方の標的抗原（５Ｔ４及びＣＤ４０）への同時結合は、３つ全ての評価された変異の導入によって低減したが、Ｔ６５Ｉ（ＡＣ＿０５３７２）よりもＴ６５Ｅ（ＡＣ＿０５３７０）及びＴ６５Ａ（ＡＣ＿０５３７１）の方が程度がはるかに低かった。親ＡＣ＿０５３３２とその変異したバリアントとの間に見られるこれらの差異は、部分的には、特にＴ６５Ａ及びＴ６５Ｅ変異体に見られるタンパク質品質の低減に起因し得る（表１５を参照されたい）。ＡＣ＿０５３７４及びＡＣ＿０５３７４で導入された変異は、これらのｂｓＡｂが両方の標的抗原に同時に結合する能力を消失させたが、ＡＣ＿０５３３０の抗原結合能力は、変異Ｔ６５Ｅ（ＡＣ＿０５３７３）の導入によって影響を受けていないようであった。ＡＣ＿０５３０２は、Ｔ６５Ａ（ＡＣ＿０５３７７）及びＴ６５Ｉ（ＡＣ＿０５３７８）の変異の導入後も抗原結合を保持していたが、Ｔ６５Ｅ（ＡＣ＿０５３７６）の変異の導入後は抗原結合を保持していなかった。

【０３４５】

２つの標的を発現する細胞に結合するプロテインＡ部位破壊変異の導入による標的結合に対する影響を更に評価するために、フローサイトメトリーを使用して評価した（ＡＣ＿０５３７１及びＡＣ＿０５３７２は、最適以下のタンパク質品質のため除外した）。図９に見られるように、５Ｔ４を発現するＣＨＯ細胞への結合は、予測され得るように、ＡＣ＿０５３３２のＣＤ４０結合ドメインにおける変異の導入の影響を受けない。ＡＣ＿０５３３０、ＡＣ＿０５３０２及びそれらの変異体バージョンの細胞上の５Ｔ４への結合は、上記の二重ＥＬＩＳＡの結果と相関する。ただし、このアッセイでは、ＡＣ＿０５３０２の全てのバリアントが５Ｔ４結合を保持している。一方、このアッセイにおいても、ＡＣ＿０５３３０変異体は、Ｔ６５Ｅ変異のみと結合する抗原を保持しているようである。５Ｔ４を発現しないＣＨＯｗｔ細胞への結合は、調べた変異のいずれかを導入しても影響を

受けない。

【０３４６】

図１０に見られるように、ＡＣ＿０５３３２及びそのＴ６５Ｅバリアントについての
ＣＤ４０発現Ｂ１６細胞への結合は、ＥＬＩＳＡの結果とよく相関しており、Ｔ６５Ｅ変異
によって導入された標的結合はわずかに減少する。予想通り、これらのＲＵＢＹ（商標）
ｂｓＡｂのＣＤ４０結合ドメインに変異は導入されていないため、全てのＡＣ＿０５３３
０及びその変異体バリアントは、Ｂ１６細胞に対して同様の結合を示す。ＡＣ＿０５３７
６（ＡＣ＿０５３０２のＴ６５Ｅ変異体）によるＣＤ４０結合の予期せぬ欠如とは別に、
ＡＣ＿０５３０２及びそのＴ６５Ｉ及びＴ６５Ａ変異体バージョンもまた、これらのｂｓ
Ａｂの５Ｔ４結合ドメインにおけるプロテインＡ部位破壊変異の導入によって影響を受け
ない。ＣＤ４０を発現しないｗｔＢ１６細胞への結合は、評価したＲＵＢＹ　ｂｓＡｂの
いずれについても検出されない。

【０３４７】

重要なことに、３つ全ての変異（ＲＵＢＹ（商標）Ｈ２鎖のＶＨにおけるＴ６５Ｅ、Ｔ
６５Ａ、及びＴ６５Ｉ）は、本研究で評価した３つ全てのｂｓＡｂにおける共精製Ｆａｂ
断片の量を劇的に減少させると結論付けることができ、これらの変異が、実際にこれらの
分子のＶＨのプロテインＡ結合部位を破壊することが確認された。一般に、生産性、凝集
体の量、及びタンパク質の品質への影響は、Ｔ６５Ａ及びＴ６５Ｉがタンパク質の品質に
有意な影響を及ぼすＡＣ＿０５３３２を除いて、限られている。二重標的ＥＬＩＳＡ及び
ＦＡＣＳによる細胞結合の両方を使用して評価されるように、標的結合に対する影響は、
ＡＣ＿０５３３２、ＡＣ＿０５３３０、及びＡＣ＿０５３０２に導入された異なる変異間
で異なるが、３つ全てのｂｓＡｂについて、共精製Ｆａｂ断片の量を有意に減少させなが
ら、標的結合に対してほとんど又は全く影響を及ぼさない少なくとも１つの変異が特定さ
れ得る。

【０３４８】

全体として、これらの研究は、評価したプロテインＡ部位破壊変異が、ＲＵＢＹ　ｂｓ
Ａｂの精製ステップにおける共精製Ｆａｂ断片の量を効率的に減少させることを実証する
。この評価はまた、生産性、タンパク質の質、又は標的結合に著しい影響を与えることな
く、そのような変異を導入することが可能であることを実証する。

【０３４９】

実施例５

表１６に示されているように、治療有効性のアッセイにおける最適化ＲＵＢＹ（商標）
変異を試験するために、ＣＤ４０×ＣＥＡＣＡＭ５二重特異性抗体を開発した。

【表２６】

表１６．治療有効性のアッセイにおいて評価されたRUBY（商標）ffAC_05337の変異の概要

RUBY（商標）ID	定常ドメインにおけるRUBY（商標）変異	追加の最適化変異
AC_05337	鎖H1のCH1におけるH168A+F170G 鎖H2のCH1におけるT187E 鎖H1のCLambdaにおけるT114A+S137K 鎖L1のCKappaにおけるL135Y+S176W	-
ffAC_05337		鎖H2のCH1におけるS183T

【０３５０】

材料及び方法

ＭＢ４９　ＣＥＡ過剰発現細胞を、製造元の説明書に従って、蛍光色素ＰＫＨ２６（Ｓ
ｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で標識した。標識したＭＢ４９－ＣＥＡ細胞を、４５℃で１
０分間熱ショックして壊死を誘発し、続いて、３７℃で一晩インキュベートした。次いで
、熱ショック細胞を遠心分離し、壊死性腫瘍細胞株破片を含む上清を回収した。Ｒａｊｉ

細胞を、核色素Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で標識し、壊死破片及び滴定抗体（ｆｆＡＣ＿０５３３７又は１１３２）で培養した。Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５生細胞イメージャー（ＢｉｏＴｅｋ）を使用して画像を捕捉し、Ｈｏｅｃｈｓｔ染色Ｒａｊｉ細胞と共局在化したＰＫＨ２６染色腫瘍破片の数をＧｅｎ５ソフトウェア（ＢｉｏＴｅｋ）を使用して定量化した。

【０３５１】

結果

Ｒａｊｉ細胞とともにＣＥＡをトランスフェクトしたＭＢ４９腫瘍細胞株からの壊死破片のクラスターの用量依存的な増加は、ｆｆＡＣ＿０５３３７　ｂｓＡｂ標的化ＣＤ４０×ＣＥＡを添加したときに見られたが、単一特異性ＣＤ４０　Ａｂ　１１３２では見られなかった（図１２に示されている）。

【０３５２】

実施例６－原発性ヒト大腸がん患者から得られた細胞を使用した機能アッセイ

大腸がん患者由来の解離された初代細胞は、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＬ）から購入した。解凍直後に、ＮｕｃｌｅｏＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）ＮＣ－２００（商標）（Ｃｈｅｍｏｍｅｔｅｃ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を使用してＤＴＣをカウントし、２０，０００個の生存細胞を各ウェルにピペッティングした。がん細胞を使用して、ＣＤ４０バイオアッセイで機能を評価し、又はあるいは、原発がん細胞が同じ腫瘍試料において免疫細胞を活性化する能力を分析した。２００，０００個の生存細胞を、Ｎｕｎｃ　ＵｐＣｅｌｌ　９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，１７４８９７）にピペッティングした。次に、ＡＴＯＲ－４０６６又は対照をウェルに添加した。プレートを、３７℃、５％のＣＯ２インキュベーターで４８時間インキュベートした。次に、細胞を回収し、フローサイトメトリーによって分析した。

【表２７】

表１７－活性化染色のためのFACSパネル（22本のチューブを染色した）

CD40	APC	555591	BD Pharmingen
CD86	PE	555658	BD Pharmingen
CD45	V450	560367	BD Horizon
CD14	PerCP-Cy5.5	562692	BD Pharmingen
CD83	PE-Cy7	561132	BD Pharmingen
CD3	FITC	555332	BD Pharmingen
CD56	FITC	562794	BD Pharmingen

【０３５３】

結果

まず、患者由来の腫瘍におけるＣＥＡ密度は、架橋を提供し、レポーター細胞アッセイを使用してＣＤ４０刺激を誘導するのに十分であることが実証された。これらの結果は、患者由来のがん細胞が、細胞株と同様の架橋及びＣＤ４０活性化を誘導することができることを実証した（図１３）。第二に、患者由来の結腸腫瘍からの解離細胞を培養すると、ＣＤ４０×ＣＥＡ　ｂｓＡｂ（ｆｆＡＣ＿０５３３７）が腫瘍浸潤免疫細胞を活性化することができることが実証された（図１３）。

【０３５４】

実施例７

材料及び方法

ヒト試料

Ｌｕｎｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌでの扁桃がん試料のコレクションは、Ｓｗｅｄｉｓｈ Ｅｔｈｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ａｕｔｈｏｒｉｔｙ倫理審査機関（参照番号２０１７／５８０）によって承認され、参加患者は書面によるインフォームドコンセントを与えられた。

【０３５５】

細胞分離及び共培養

扁桃がん生検を、０．１ｍｇ／ｍＬのゲンタマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で小さな断片に切断した。組織断片を、コラゲナーゼＩＶ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（２．０ｍｇ／ｍＬ）及びＤＮａｓｅ Ｉ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）（２００Ｋ単位／ｍＬ）で、３７℃で２０分間酵素消化した。細胞を７０μｍの細胞ストレーナー（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して濾過し、ＦＡＣＳＡｒｉａ ＩＩｕ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用した細胞選別用に、ＣＤ３－ＰｅｒＣＰＣｙ５．５、ＶＳ６２０－ＰＥＣＦ５９４、ＣＤ４５－ＡＰＣＨ７、及びＨＬＡ－ＤＲ－ＢＶ７１１で染色した。生存可能な10^4個のＣＤ４５＋ ＨＬＡ－ＤＲ＋ ＣＤ３－細胞を、１ウェル当たり6×10^4個のＵＶ照射ＣＨＯ－ＣＥＡ細胞が予め播種された９６ウェル平底プレート（Ｎｕｎｃ ＵｐＣｅｌｌ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に直接選別した。１９ｎＭのＣＤ４０×ＣＥＡ ｂｓＡｂ、ＣＤ４０ ｍＡｂ、又はアイソタイプ対照を、１３時間、共培養物に加え、その後、上清を回収し、細胞を洗浄し、ＣｈｒｏｍＰｕｒｅマウスＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）との非特異的結合に対して、室温で１５分間ブロッキングした。細胞を、直ちに蛍光色素結合抗体（補足表１）で染色し、ＦＡＣＳＡｒｉａ ＩＩｕ機器（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、フローサイトメトリーで分析した。サイトカイン分析は、Ｂｉｏ－ＰｌｅｘＲ ２００システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂ）でＢｉｏ－Ｐｌｅｘ Ｐｒｏヒトサイトカイン１７プレックスアッセイを使用して行った。

【表２８】

表１８－フローサイトメトリーに使用した抗体。

抗原	フルオロフォア	クローン	会社
ヒト細胞			
CD45	APCH7	2D1	BD Biosciences
HLA-DR	BV711	G46-6	BD Biosciences
CD11c	BV510	B-ly6	BD Biosciences
XCR1	PE	S15046E	BioLegend
CD1C	BV786	L161	BioLegend
CD14	FITC	TUK4	Invitrogen
CCR2	APC	K036C2	BioLegend
CD123	AF700	6H6	BioLegend
CD19	PerCP Cy5.5	HIB19	BD Biosciences
CD20	PerCP Cy5.5	2H7	BD Biosciences
CD86	BV605	IT2.2	BioLegend
CD40	PE-Cy7	5C3	BD Biosciences
CCR7	BV421	2-L1-A	BD Biosciences

【０３５６】

結果

図１４に示されるように、ＣＤ４０×ＣＥＡ　ｂｓＡｂ（ｆｆＡＣ＿０５３３７）によるＣＤ４０及びＣＥＡの同時結合は、インビトロで扁桃がんＡＰＣの活性化を媒介する。

【０３５７】

実施例８：ＣＤ４０－ＣＥＡＣＡＭ５二重特異性抗体ｆｆＡＣ＿０５３３７の抗腫瘍効果

背景技術及び目的

ｆｆＡＣ＿０５３３７は、ＲＵＢＹ（商標）形式のＣＤ４０－ＣＥＡ二重特異性抗体である。抗体は、Ｆｃｇ受容体結合をサイレンシングするようにＬＡＬＡ変異されている。

【０３５８】

この試験の目的は、ＭＣ３８－ＣＥＡＣＡＭ５　２と呼ばれるＣＥＡＣＡＭ５でトランスフェクトされたマウス腫瘍細胞株を接種したヒトＣＤ４０トランスジェニック（ｈＣＤ４０ｔｇ）マウスにおけるｆｆＡＣ＿０５３３７及びＣＤ４０　ｍＡｂの抗腫瘍効果を評価することであった。

【０３５９】

材料及び方法

９週齢の雌ｈＣＤ４０ｔｇマウスに、右側脇腹に1×10^{6}個のＭＣ３８－ＣＥＡＣＡＭ５　２細胞（Ｋｅｒａｆａｓｔから得た）を皮下接種した。接種後７日目、１０日目、及び１３日目に、マウスに、１００μｇの野生型ＣＤ４０単一特異性抗体１１３２、又は１６７μｇのＣＤ４０－ＣＥＡＣＡＭ５　ｂｓＡｂ　ｆｆＡＣ＿０５３３７を腹腔内投与した。ビヒクル処置マウスの群も含まれた。腫瘍の幅（ｗ）、長さ（ｌ）、及び高さ（ｈ）をキャリパーで、頻繁に測定し、腫瘍体積を以下の式を使用して計算した：（幅／２×長さ／２×高さ／２×π×（４／３））。

【０３６０】
結果及び結論
データは、ＣＤ４０ ｍＡｂ １１３２ではなくＣＤ４０－ＣＥＡＣＡＭ５ ｂｓＡｂ ｆｆＡＣ＿０５３３７による処置が、ビヒクル処置マウスと比較してＭＣ３８－ＣＥＡＣＡＭ５腫瘍体積を減少させることを示した（図１５）。更に、１１３２ではなくｆｆＡＣ＿０５３３７による処置は、ビヒクル処置マウスと比較して、改善された生存をもたらした（図１５）。
【０３６１】
実施例９－原発性ヒト胃がん患者から得られた細胞を使用した機能アッセイ
胃がん患者由来の解離された初代細胞は、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＬ）から購入した。解凍直後に、ＮｕｃｌｅｏＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）ＮＣ－２００（商標）（Ｃｈｅｍｏｍｅｔｅｃ，Ｄｅｎｍａｒｋ）を使用してＤＴＣをカウントし、２０，０００個の生存細胞を各ウェルにピペッティングした。がん細胞を使用して、ＣＤ４０バイオアッセイで機能を評価し、又はあるいは、原発がん細胞が同じ腫瘍試料において免疫細胞を活性化する能力を分析した。２００，０００個の生存細胞を、Ｎｕｎｃ ＵｐＣｅｌｌ ９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，１７４８９７）にピペッティングした。次に、ＣＤ４０×ＣＥＡ ｂｓＡｂ（ｆｆＡＣ＿０５３３７）又は対照をウェルに添加した。プレートを、３７℃、５％のＣＯ２インキュベーターで４８時間インキュベートした。次に、細胞を回収し、フローサイトメトリーによって分析した。
【表２９】
表１９－活性化染色のためのFACSパネル

CD40	APC	555591	BD Pharmingen
CD86	PE	555658	BD Pharmingen
CD45	V450	560367	BD Horizon
CD14	PerCP-Cy5.5	562692	BD Pharmingen
CD83	PE-Cy7	561132	BD Pharmingen
CD3	FITC	555332	BD Pharmingen
CD56	FITC	562794	BD Pharmingen

【０３６２】
結果
まず、患者由来の腫瘍におけるＣＥＡ密度は、架橋を提供し、レポーター細胞アッセイを使用してＣＤ４０刺激を誘導するのに十分であることが実証された。これらの結果は、患者由来のがん細胞が、細胞株と同様の架橋及びＣＤ４０活性化を誘導することができることを実証した（図３２）。第二に、患者由来の胃腫瘍からの解離細胞を培養すると、ＣＤ４０×ＣＥＡ ｂｓＡｂ（ｆｆＡＣ＿０５３３７）が腫瘍浸潤免疫細胞を活性化することができることが実証された（図１６）。
【０３６３】
実施例１０－ＣＤ４０レポーターアッセイを使用した可溶性ＣＥＡの存在下でのＣＤ４０アゴニスト機能の評価。
目的及び背景
この研究の目的は、ＣＤ４０レポーターアッセイを使用して、ＣＥＡ発現細胞及び生理学的に関連する可溶性ＣＥＡ濃度の存在下で、二重特異性抗体ｆｆＡＣ＿０５３３７のＣＤ４０アゴニスト機能を評価することであった。ＣＤ４０架橋は、ＣＤ４０レポーター細胞上に発現されるＣＤ４０と、ＣＨＯ細胞若しくはＣＥＡ発現ヒト腫瘍細胞上に発現され

るＣＥＡとの同時結合によって媒介される。加えて、高レベルの可溶性ＣＥＡは、がん患者において全身的に検出され得るため、アゴニスト機能を、生理学的に関連する濃度の可溶性ＣＥＡの存在下で評価した。

【０３６４】

材料及び方法

ｆｆＡＣ＿０５３３７のアゴニスト機能は、ＣＤ４０レポーターアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ，ＣＤ４０バイオアッセイキット　ＣＳ　ＪＡ２１５５）を使用して評価した。製造元のプロトコルに従ってアッセイを行った。簡潔には、ＣＤ４０レポーター細胞及び滴定濃度のｆｆＡＣ＿０５３３７を、１０％のＦＣＳを含むＲＰＭＩに希釈し、アッセイプレートに添加した後、ＣＥＡをトランスフェクトしたＣＨＯ、ＣＨＯ　ｗｔ、又はＣＥＡ発現ヒト腫瘍細胞を添加した。加えて、アッセイを、０．５、１、５、２５、又は５０μｇ／ｍｌの可溶性ＣＥＡの存在下で行った。アッセイプレートを、３７℃で６時間インキュベートした後、Ｂｉｏ－ＧｌｏＴＭルシフェラーゼアッセイ検出溶液を添加して、ＢＭＧＥＬＩＳＡプレートリーダーで分析した。

【０３６５】

結果及び結論

これらの結果は、二重特異性抗体ｆｆＡＣ＿０５３３７がＣＥＡの存在下でＣＤ４０の活性化を誘導し、その効力及び有効性が培養物中の可溶性ＣＥＡの存在によって影響されないことを示す（図１７及び１８）。２５μｇ／ｍｌ及び５０μｇ／ｍｌの可溶性ＣＥＡの存在下では、ｆｆＡＣ＿０５３３７の有効性のわずかな減少が観察され得る（図１８）。

【０３６６】

本発明に関連する追加の配列

ＡＣ＿０５２９３

Ｈ１鎖（配列番号２６１）

ＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＳＷＶＲＲＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＧＳＹＧＧＧＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＶＮＦＧＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴ
ＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳ
ＧＡＬＴＳＧＶＡＴＧＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣ
ＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶ
ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤ
ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ
ＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫ
ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ
ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ
ＬＳＬＳＰＧＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＬＶＭＴＱＳＰＳＳＬＴＶＴＡＧＥＫ
ＶＴＭＳＣＫＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＲＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＷＡＳ
ＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＶＱＡＥＤＬＡＶＹＹＣＱＮＤＹ
ＳＹＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＡＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶ
ＶＣＬＬＫＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴ
ＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧ
ＥＣ

Ｈ２鎖（配列番号２６２）

ＥＶＱＬＬＥＱＳＧＡＥＬＶＲＰＧＴＳＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＡＦＴＮＹＷＬＧＷＶＫＥ
ＲＰＧＨＧＬＥＷＩＧＤＩＦＰＧＳＧＮＩＨＹＮＥＫＦＫＧＫＡＴＬＴＡＤＫＳＳＳＴＡ
ＹＭＱＬＳＳＬＴＦＥＤＳＡＶＹＦＣＡＲＬＲＮＷＤＥＰＭＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ
ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ
ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＥＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ
ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣ

Ｌ１鎖（配列番号２６３）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬＮＷＹＱＥＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＧＲＮＰＰＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＹＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＷＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
Ｍｕｌｔｉ４６
Ｈ１鎖（配列番号２６４）
ＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＳＷＶＲＲＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＧＳＹＧＧＧＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＶＮＦＧＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴ
ＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳ
ＧＡＬＴＳＧＶＡＴＧＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣ
ＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶ
ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤ
ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ
ＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫ
ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ
ＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ
ＬＳＬＳＰＧＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲ
ＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬＮＷＹＱＲＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶ
ＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＳＨＧＰＬＬＴ
ＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＰＶＡＡＰＡＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＫ
ＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳ
ＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
Ｈ２鎖（配列番号２６５）
ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＧＴＦＧＹＹＡＩＨＷＶＲＥＡ
ＰＧＱＧＬＥＷＭＧＧＩＧＳＩＦＧＴＡＮＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＥＳＴＳＴＡＹ
ＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＷＳＳＤＨＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳ
ＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮ
ＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＴＳＶＶＥＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩ
ＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣ
Ｌ１鎖（配列番号２６６）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬＮＷＹＱＥＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＧＲＮＰＰＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＹＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＷＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
ＡＣ＿０５３３２
Ｈ１鎖（配列番号２６７）
ＥＶＱＬＬＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＳＷＶＲＲＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＳＧＳＧＧＳＴＹＹ
ＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＹ
ＧＧＹＹＳＡＷＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＡＴＧＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥ
ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧ

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPA
VFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLKNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L１鎖（配列番号２６８）
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKP
GKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGYLHTFGQ
GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLWSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H２鎖（配列番号２６９）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVREA
PGKGLEWVSGIGSYGGGTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYV
NFGMDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
AC＿０５３３０
H１鎖（配列番号２７０）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRRA
PGKGLEWLSYISGGSSYIFY
ADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRAEDTAVYYCARIL
RGGSGMDLWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVATGPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQS

G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y G Y L H T F G Q G T K L E I K R T V A A P A V F
I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L
K 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
L１鎖（配列番号２７１）
Q S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C T G S S S N I G A G Y N V Y W Y Q E
L P G T A P K L L I Y G N I N R P S G V
P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D K S I S G L
V F G G G T K L T V L 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 Y 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 W
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
H２鎖（配列番号２７２）
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 S Y A M S W V R E A
P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y 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 Y Y
G G Y Y S A W 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 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 E 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
A C＿０５３０２
H１鎖（配列番号２７３）
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 S Y A M S W V R R A
P G K G L E W V S G I G S Y G G G T Y 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 Y V
N F G 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 D Y F P E P V T V S W N S
G A L T S G V A T G 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 A A 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 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 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 K G G G G S G G G G S G G G
G S 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 S I S S Y L N W Y Q R K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V
P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y G Y L H T F G Q G T K L E I K R T V A A P A V F I F
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L K 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
L１鎖（配列番号２７４）
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 S I S S Y L N W Y Q E K P

GKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQ
GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLWSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H２鎖（配列番号２７５）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVREA
PGKGLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYY
GGYYSAWMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSC
ｆｆＡＣ＿０５３３７
H１鎖（配列番号２７６）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYMGWVRRA
PGKGLEWVSSIGSGSYSTSY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYP
SVPFPLHLDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVATGPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG
SGGGGSQSVLTQPPSASGTP
GQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYWYQRLPGTAPKLLIYGNI
NRPSGVPDRFSGSKSGTSAS
LAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLGQP
KAAPAVTLFPPSSEELQANK
ATLVCLIKDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
NKYAAWSYLSLTPEQWKSHR
SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
L１鎖（配列番号２７７）
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKP
GKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGNPHTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLWSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H２鎖（配列番号２７８）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVREA

P G K G L E W L S Y I S G G S S Y I F 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 I L
R G G S G M D L 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 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 T S V V E 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
A C＿０５３３７（ｆｆＡＣ＿０５３３７の親）
H１鎖（配列番号２７９）
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 S S Y M G W V R R A
P G K G L E W V S S I G S G S Y S 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 R Y P
S V P F P L H L 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 D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V A T G 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 A A 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 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 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 K G G G G S G G G G
S G G G G S Q S V L T Q P P S A S G T P
G Q R V T I S C T G S S S N I G A G Y N V Y W Y Q R L P G T A P K L L I Y G N I
N R P S G V P D R F S G S K S G T S A S
L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D K S I S G L V F G G G T K L T V L G Q P
K A A P A V T L F P P S S E E L Q A N K
A T L V C L I K 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 W 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
L１鎖（配列番号２８０）
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 S I S S Y L N W Y Q E K P
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A G N 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 Y 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 W 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
H２鎖（配列番号２８１）
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 T Y G M H W V R E A
P G K G L E W L S Y I S G G S S Y I F Y
A D S V R G R F T I S R D N S E N A L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R I L
R G G S G M D L 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 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 E 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
1 1 3 2

重鎖（配列番号２８２）

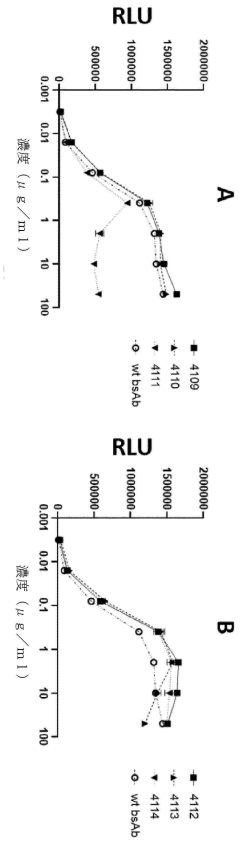
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA
PGKGLEWVSGIGSYGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

軽鎖（配列番号２８３）

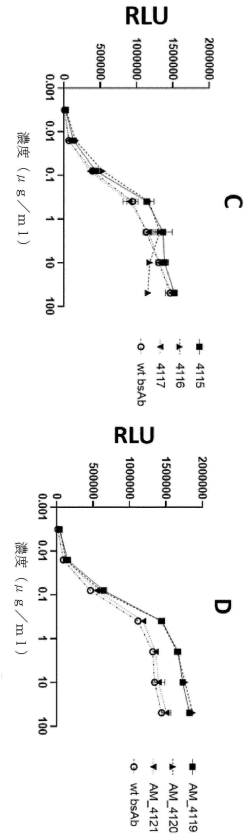
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP
GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

【図面】

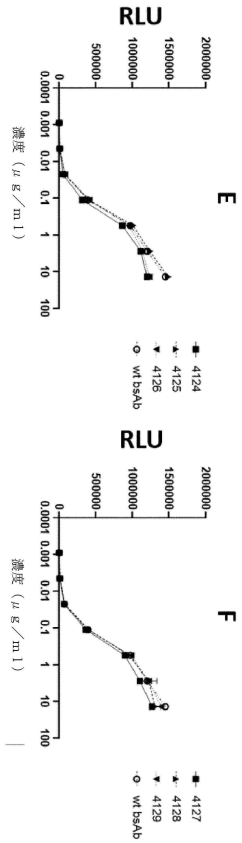
【図１－１】



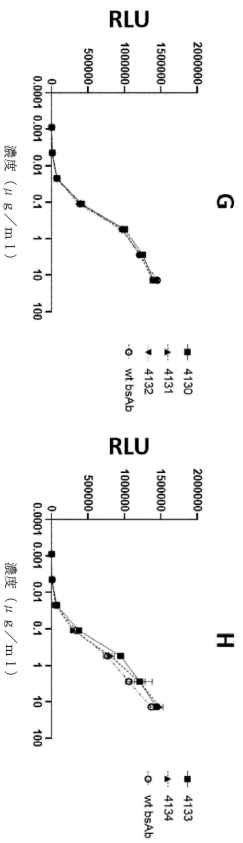
【図１－２】



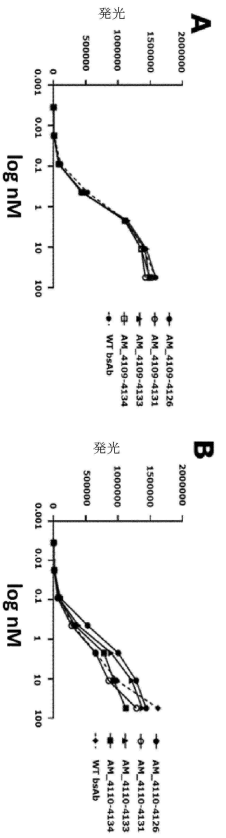
【図１－３】



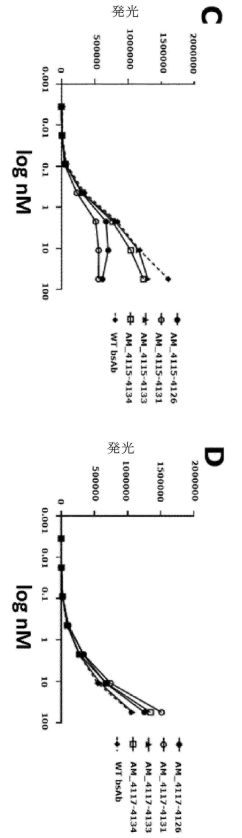
【図１－４】



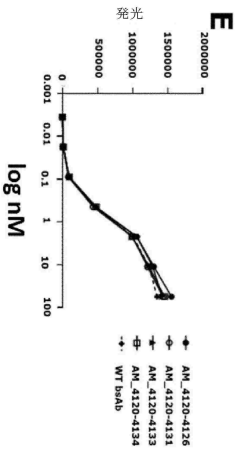
【図２－１】



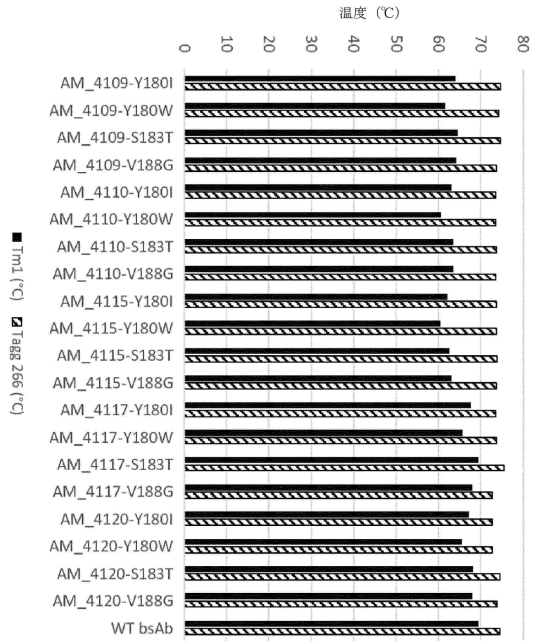
【図２－２】



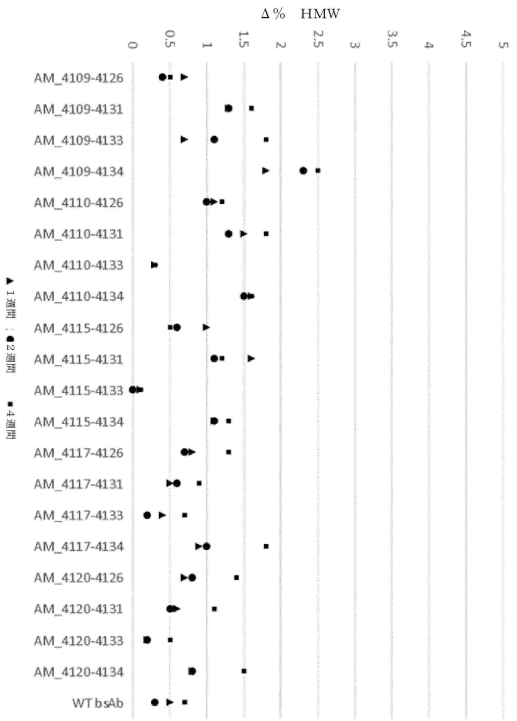
【図２－３】


E
発光
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
log nM
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb

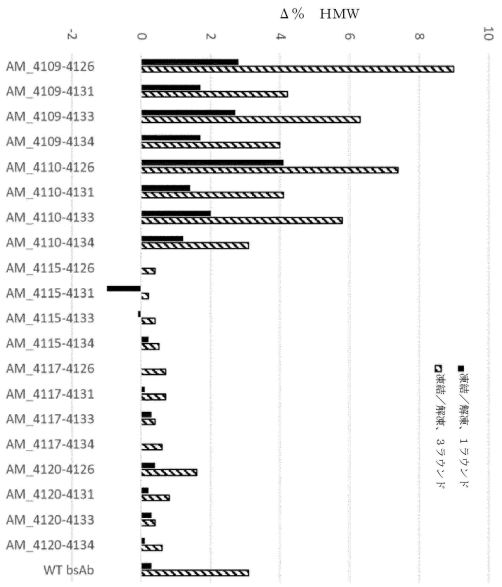
【図３】


温度（℃）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
AM_4109-Y180I
AM_4109-Y180W
AM_4109-S183T
AM_4109-V188G
AM_4110-Y180I
AM_4110-Y180W
AM_4110-S183T
AM_4110-V188G
AM_4115-Y180I
AM_4115-Y180W
AM_4115-S183T
AM_4115-V188G
AM_4117-Y180I
AM_4117-Y180W
AM_4117-S183T
AM_4117-V188G
AM_4120-Y180I
AM_4120-Y180W
AM_4120-S183T
AM_4120-V188G
WT bsAb
■ Tm1 (℃)
Tagg 266 (℃)

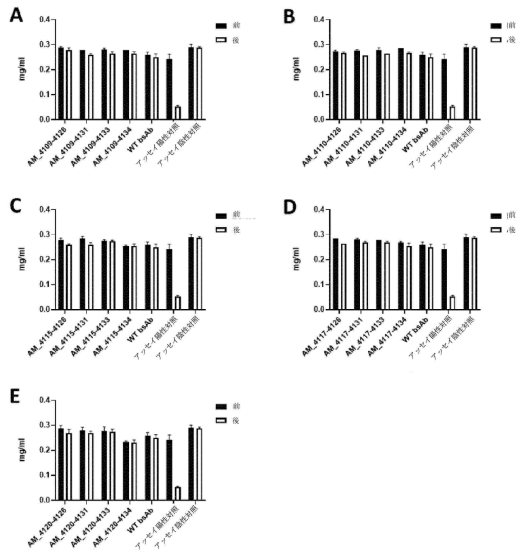
【図４】


Δ％ HMW
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
AM_4109-4134
AM_4110-4126
AM_4110-4131
AM_4110-4133
AM_4110-4134
AM_4115-4126
AM_4115-4131
AM_4115-4133
AM_4115-4134
AM_4117-4126
AM_4117-4131
AM_4117-4133
AM_4117-4134
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb
▲ 1 週間、●2 週間、■4 週間

【図５】


Δ％ HMW
-2
0
2
4
6
8
10
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
AM_4109-4134
AM_4110-4126
AM_4110-4131
AM_4110-4133
AM_4110-4134
AM_4115-4126
AM_4115-4131
AM_4115-4133
AM_4115-4134
AM_4117-4126
AM_4117-4131
AM_4117-4133
AM_4117-4134
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb
■凍結／解凍、1 ラウンド
凍結／解凍、3 ラウンド

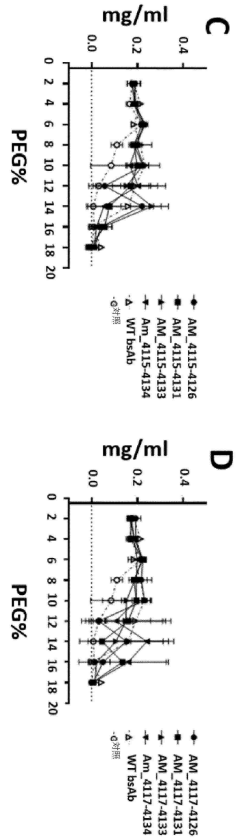
【図６】



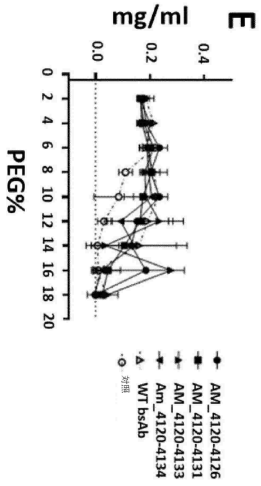
【図７－１】



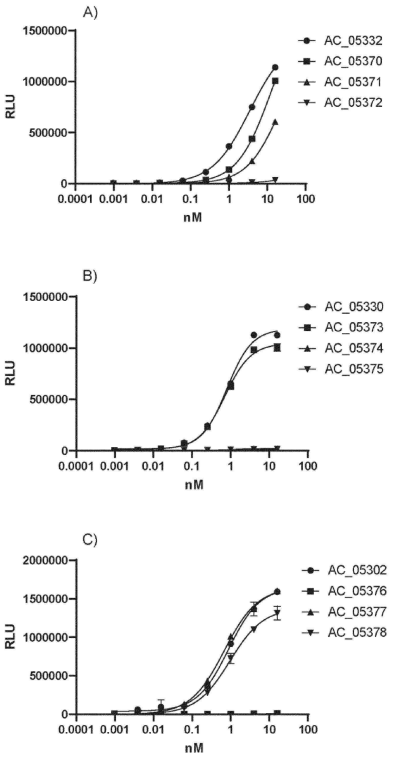
【図７－２】



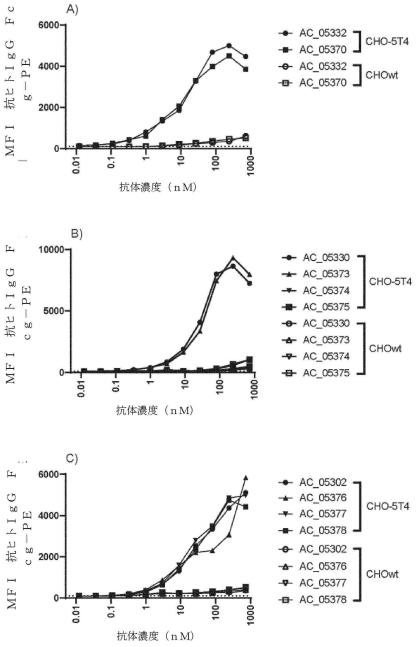
【図７－３】



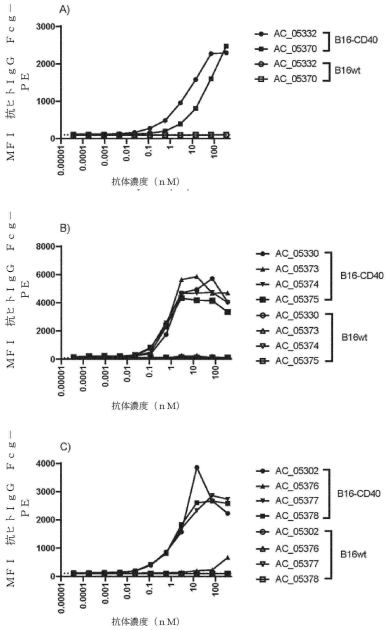
【図８】


A)
RLU
nM
AC_05332
AC_05370
AC_05371
AC_05372
B)
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
C)
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378

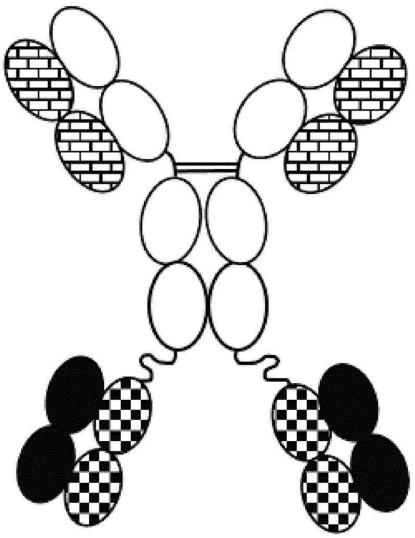
【図９】


A)
B)
C)
MFI 抗ヒトIgG Fcg−PE
抗体濃度（nM）
AC_05332
AC_05370
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
CHO-5T4
CHOwt

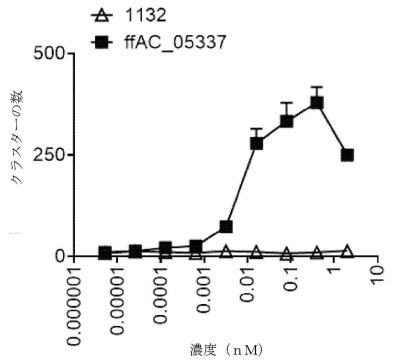
【図１０】


A)
B)
C)
MFI 抗ヒトIgG Fcg−PE
抗体濃度（nM）
AC_05332
AC_05370
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
B16-CD40
B16wt

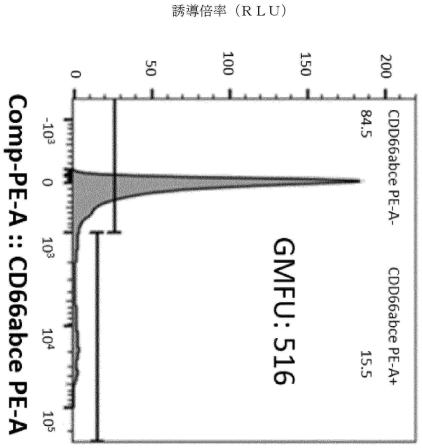
【図１１】



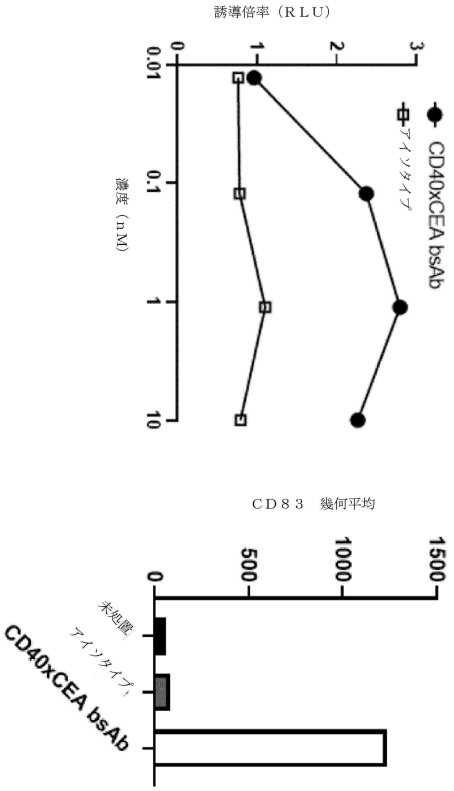
【図１２】



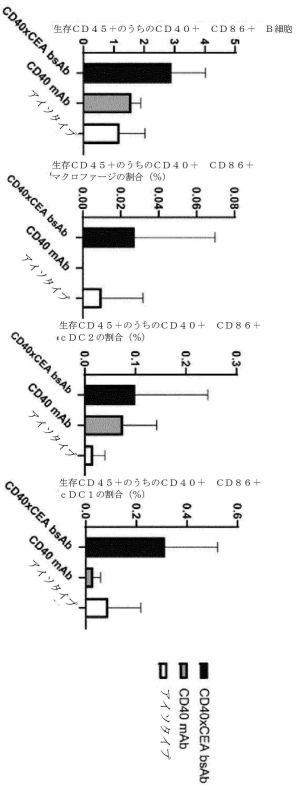
【図１３－１】



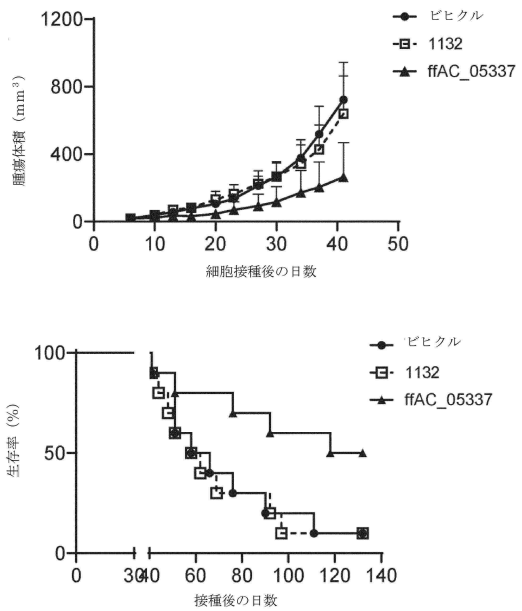
【図１３－２】



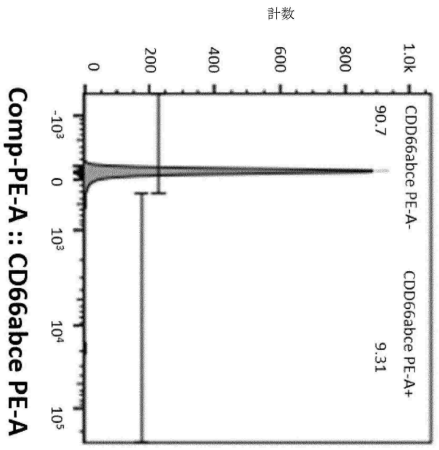
【図１４】



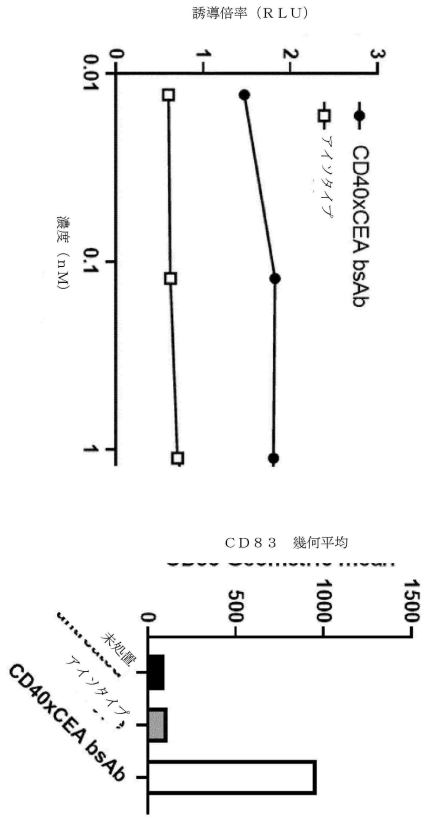
【図１５】



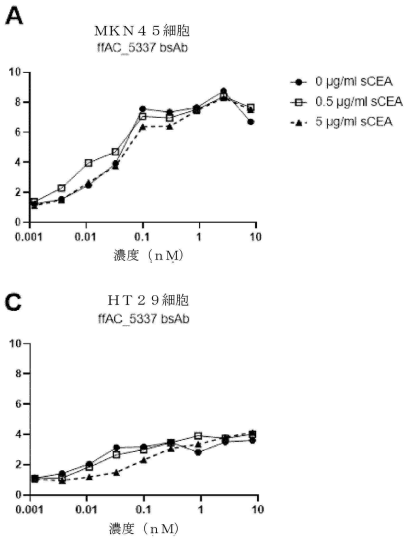
【図１６－１】



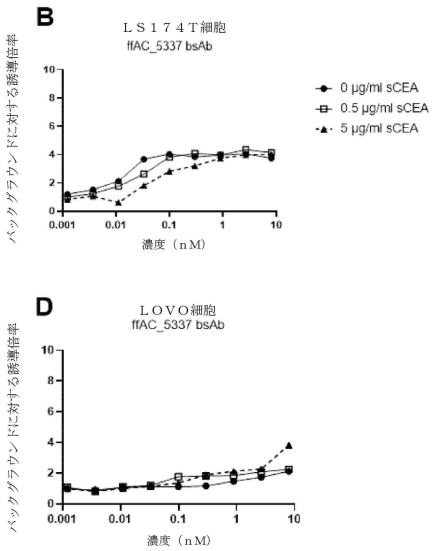
【図１６－２】



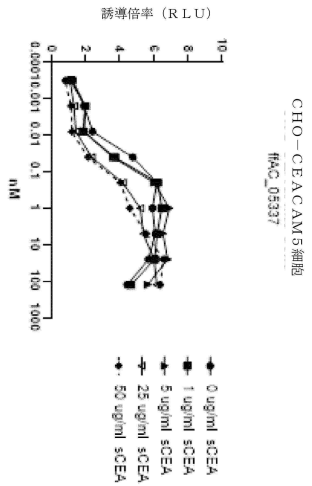
【図１７－１】



【図１７－２】



【図１８】



【配列表】

<u>２０２４５４２１４２０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/080860

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/080860

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

1-28, 47, 48(completely); 59-66(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/30 A61P35/00 C07K16/24 C07K16/32
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/127354 A2 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB [SE]) 25 June 2020 (2020-06-25) cited in the application page 2, line 29 - page 4, line 14 page 15, lines 14-24 page 69, paragraph 5 - page 70, paragraph 3 page 154, lines 5-10 claims 23,24,49 page 104, line 7 - page 108, line 33 page 166, lines 12-26	1-28,47, 48,59-66
A	WO 2016/172485 A2 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 27 October 2016 (2016-10-27) paragraphs [0007] - [0053], [0179] - [0184]; table 1	1-17,47, 48,59-66

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 March 2023	17/05/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Page, Michael

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080860

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/067404 A2 (ADIMAB LLC [US]) 8 April 2021 (2021-04-08) paragraphs [0008], [0009]; claims 1,32	1-28,47, 48,59-66
A	CA 3 163 023 A1 (BIOMUNEX PHARMACEUTICALS [FR]; INST CURIE [FR] ET AL.) 15 July 2021 (2021-07-15) paragraph [0001]; table 1	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/080860

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020127354 A2	25-06-2020	CN 113474368 A	01-10-2021
		EP 3898680 A2	27-10-2021
		US 2022056148 A1	24-02-2022
		WO 2020127354 A2	25-06-2020
WO 2016172485 A2	27-10-2016	AU 2016252773 A1	12-10-2017
		AU 2022224860 A1	29-09-2022
		CA 2980189 A1	27-10-2016
		CN 107787332 A	09-03-2018
		CN 116063543 A	05-05-2023
		EP 3286227 A2	28-02-2018
		HK 1250722 A1	11-01-2019
		IL 285366 A	30-09-2021
		JP 6952605 B2	20-10-2021
		JP 7228545 B2	24-02-2023
		JP 2018516546 A	28-06-2018
		JP 2020184996 A	19-11-2020
		JP 2023002538 A	10-01-2023
		KR 20170140331 A	20-12-2017
		US 2018177873 A1	28-06-2018
		US 2022409725 A1	29-12-2022
		WO 2016172485 A2	27-10-2016
WO 2021067404 A2	08-04-2021	AU 2020357944 A1	31-03-2022
		BR 112022005995 A2	21-06-2022
		CA 3152460 A1	08-04-2021
		CN 114846027 A	02-08-2022
		EP 4021939 A2	06-07-2022
		IL 291728 A	01-05-2022
		JP 2022550172 A	30-11-2022
		KR 20220107163 A	02-08-2022
		WO 2021067404 A2	08-04-2021
CA 3163023 A1	15-07-2021	AU 2021206543 A1	21-07-2022
		BR 112022013633 A2	13-09-2022
		CA 3163023 A1	15-07-2021
		EP 4087871 A1	16-11-2022
		IL 294302 A	01-08-2022
		JP 2023510806 A	15-03-2023
		KR 20220147583 A	03-11-2022
		WO 2021140190 A1	15-07-2021
		ZA 202207656 B	29-03-2023

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2022/080860

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-28, 47, 48(completely); 59-66(partially)

Antibodies comprising modifications M1 and M2 as defined in the non-unity reasoning

---

2. claims: 29-38, 49, 50(completely); 59-66(partially)

Antibodies comprising modification M3 as defined in the non-unity reasoning

---

3. claims: 39-42(completely); 45, 46, 54-66(partially)

Antibodies comprising modifications M1 and M3 as defined in the non-unity reasoning

---

4. claims: 43, 44, 51-53(completely); 45, 46, 54-66(partially)

Antibodies comprising modifications M1, M2 and M3 as defined in the non-unity reasoning

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	

(32)優先日　令和4年9月2日(2022.9.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

ィレッジ・アリゲーター・バイオサイエンス・アーベー
(72)発明者　バルナバス・ネシガ
スウェーデン・２２３・８１・ルンド・シュレヴェーゲン・２・メディコン・ヴィレッジ・アリゲーター・バイオサイエンス・アーベー
(72)発明者　マティアス・レヴィン
スウェーデン・２２３・８１・ルンド・シュレヴェーゲン・２・メディコン・ヴィレッジ・アリゲーター・バイオサイエンス・アーベー
(72)発明者　アンナ・サール
スウェーデン・２２３・８１・ルンド・シュレヴェーゲン・２・メディコン・ヴィレッジ・アリゲーター・バイオサイエンス・アーベー

Ｆターム（参考）　4B064　AG27 CA10 CA19 CC15 CC24 DA01
4C084　AA02 CA53 NA14 ZB26
4C085　AA13 AA14 BB11 DD62 EE01
4H045　AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA45