(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7661245号
(P7661245)

(45)発行日　令和7年4月14日(2025.4.14)

(24)登録日　令和7年4月4日(2025.4.4)

(51)国際特許分類			FI		
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46	ZNA
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	C07K	16/30	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	

請求項の数　20　（全72頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-571687(P2021-571687)
(86)(22)出願日　令和2年6月5日(2020.6.5)
(65)公表番号　特表2022-535061(P2022-535061A)
(43)公表日　令和4年8月4日(2022.8.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/036464
(87)国際公開番号　WO2020/247852
(87)国際公開日　令和2年12月10日(2020.12.10)
審査請求日　令和5年5月30日(2023.5.30)
(31)優先権主張番号　62/858,509
(32)優先日　令和1年6月7日(2019.6.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/858,630
(32)優先日　令和1年6月7日(2019.6.7)
最終頁に続く

(73)特許権者　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１３２０，サウザンド オークス，ワン アムジエン センター ドライブ
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ガッティベンカタクリシュナ，パバン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、メール・ストップ・２８－５－エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　二重特異性結合構築物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

式ＶＨ１－Ｌ１－ＶＨ２－Ｌ２－ＶＬ１－Ｌ３－ＶＬ２を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を含む二重特異性結合構築物であって、ＶＨ１及びＶＨ２は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、ＶＬ１及びＶＬ２は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３はリンカーであり、Ｌ１は少なくとも２５個のアミノ酸であり、Ｌ２は少なくとも２５個のアミノ酸であり、Ｌ３は少なくとも２５個のアミノ酸であり、並びに前記二重特異性結合構築物が免疫エフェクター細胞及び標的細胞と結合することができ、

前記免疫エフェクター細胞は、ヒトＴ細胞受容体（ＴＣＲ）－ＣＤ３複合体の一部であるエフェクター細胞タンパク質を発現するＴ細胞であり、

前記標的細胞は癌細胞であり、標的がＭｓｌｎ又はＤｌｌ３である、

二重特異性結合構築物。

【請求項２】

ＶＬ２の次に半減期延長部分を更に含む、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。

【請求項３】

前記半減期延長部分が、追加のリンカー（Ｌ４）及びヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、又はＩｇＧ４抗体由来の単鎖免疫グロブリンＦｃ領域（ｓｃＦｃ）を含む、請求項２に記載の二重特異性結合構築物。

【請求項４】

前記ｓｃＦｃポリペプチド鎖が、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）の結合性を阻害する１つ以

上の改変、及び／又は半減期を延長する１つ以上の改変を含む、請求項３に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項５】
前記ＶＨ１、ＶＨ２、ＶＬ１、及びＶＬ２の全てが異なる配列を有する、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項６】
前記ＶＨ２配列が配列番号５０を含み、前記ＶＬ２配列が配列番号５１を含み、前記ＶＨ１配列が配列番号４４を含み、前記ＶＬ１配列が配列番号４５を含むか、又は前記ＶＨ１配列が配列番号４８を含み、前記ＶＬ１配列が配列番号４９を含む、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項７】
Ｌ１、Ｌ２及びＬ３が異なる長さである、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項８】
Ｌ１、Ｌ２及びＬ３が同一の長さである、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項９】
Ｌ１及びＬ２が同一の長さである、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１０】
Ｌ１及びＬ３が同一の長さである、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１１】
Ｌ２及びＬ３が同一の長さである、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１２】
前記二重特異性結合構築物が、ＶＨ１－Ｌ１－ＶＬ１－Ｌ２－ＶＨ２－Ｌ３－ＶＬ２の式を有する二重特異性結合構築物と比較して向上した安定性を示す、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１３】
前記二重特異性抗体が、ＶＨ１－Ｌ１－ＶＬ１－Ｌ２－ＶＨ２－Ｌ３－ＶＬ２の式を有する二重特異性結合構築物と比較して向上したインビトロ発現を示す、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１４】
前記エフェクター細胞タンパク質がＣＤ３ε鎖である、請求項１に記載の二重特異性結合構築物。
【請求項１５】
請求項１～１４に記載の二重特異性結合構築物をコードする核酸。
【請求項１６】
請求項１５に記載の核酸を含むベクター。
【請求項１７】
請求項１６に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項１８】
（１）前記二重特異性結合構築物を発現するような条件下で、宿主細胞を培養することと、（２）細胞集団又は培養液上清から前記二重特異性結合構築物を回収することとを含み、前記宿主細胞は、請求項１～９のいずれか一項に記載の二重特異性結合構築物をコードする１つ以上の核酸を含む、請求項１に記載の二重特異性結合構築物の製造方法。
【請求項１９】
治療上有効な量の請求項１～１４のいずれか一項に記載の二重特異性結合構築物を含む、癌患者を治療するための薬学的組成物。
【請求項２０】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の二重特異性結合構築物を含む、薬学的組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮特許出願第６２／８５８，５０９号明細書（２０１９年６月７日出願）及び米国仮特許出願第６２／８５８，６３０号明細書（２０１９年６月７日出願）に対する優先権を主張するものである。上記で特定した出願のそれぞれは、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表の参照

本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出された配列表を包含し、その配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０２０年６月４日に作成された前記ＡＳＣＩＩのコピーは、名称がＡ－２３５５－ＷＯ－ＰＣＴ＿ＳＬ．ｔｘｔであり、サイズが１７４，１０９バイトである。

【０００３】

本発明は、タンパク質工学の分野に属する。

【背景技術】

【０００４】

二重特異性結合構築物は、近年、将来性のある治療法であることが明らかとなってきている。例えば、二重特異性Ｔ細胞誘導（ＢｉＴＥ（登録商標））構成でのＣＤ３及びＣＤ１９の両方を標的とする二重特異性構築物は、低用量でめざましい効果を示している。Ｂａｒｇｏｕ ｅｔ ａｌ．（２００８），Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２１：９７４－９７８。このＢｉＴＥ（登録商標）構成は、２つのｓｃＦｖ’からなり、そのうちの一方がＣＤ３を標的とし、その一方が腫瘍抗原であるＣＤ１９を標的とするものであり、それらは可動性リンカーで結合されている。この独自の設計により、二重特異性構築物が活性化Ｔ細胞を標的細胞に接近させ、結果として標的細胞を細胞溶解的に殺傷することができる。例えば、国際公開第９９／５４４４０Ａ１号パンフレット（米国特許第７，１１２，３２４Ｂ１号明細書）、及び国際公開第２００５／０４０２２０号パンフレット（米国特許出願公開第２０１３／０２２４２０５Ａ１号明細書）を参照されたい。後に、ＣＤ３εの鎖のＮ末端で文脈に依存しないエピトープに結合する二重特異性構築物が開発されている（国際公開第２００８／１１９５６７号パンフレット；米国特許出願公開第２０１６／０１５２７０７Ａ１号明細書を参照されたい）。

【０００５】

バイオ医薬品産業では、多くの患者に供給するという商業的な要求に応じるために、典型的に分子を大規模な方式で生産し、分子が大量生産及び大量精製に適さないという危険性を軽減するために、多数の属性について評価することができる。これらの複雑な組換えポリペプチドを効率的に発現させることは、現在進行中の課題であり得る。更に、一度発現したとしても、ポリペプチドは多くの場合医薬品組成物として所望されるほど安定的ではない。従って、治療的な有効性だけでなく、好ましい薬物動態学的特性を有し、効率的な生産性と向上した安定性とをもたらす構成を有する二重特異性治療のための技術が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【文献】国際公開第９９／５４４４０Ａ１号パンフレット（米国特許第７，１１２，３２４Ｂ１号明細書）

【文献】国際公開第２００５／０４０２２０号パンフレット（米国特許出願公開第２０１３／０２２４２０５Ａ１号明細書）

【文献】国際公開第２００８／１１９５６７号パンフレット；米国特許出願公開第２０１６／０１５２７０７Ａ１号明細書

【非特許文献】

【０００７】

【文献】Ｂａｒｇｏｕ ｅｔ ａｌ．（２００８），Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２１：９７４－９

７８
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
二重特異性抗体のいくつかの新規の構成が本明細書に記載される。一実施形態では、本発明は、式ＶＨ１－Ｌ１－ＶＨ２－Ｌ２－ＶＬ１－Ｌ３－ＶＬ２を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を含む二重特異性結合構築物であって、ＶＨ１及びＶＨ２は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、ＶＬ１及びＶＬ２は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３はリンカーであり、Ｌ１は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ２は少なくとも１５個のアミノ酸であり、Ｌ３は少なくとも１０個のアミノ酸であり、並びに二重特異性結合構築物が免疫エフェクター細胞及び標的細胞と結合することができる、二重特異性結合構築物を提供する。
【０００９】
別の実施形態では、本発明は、式ＶＨ１－Ｌ１－ＶＨ２－Ｌ２－ＶＬ１－Ｌ３－ＶＬ２を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を含む二重特異性結合構築物であって、ＶＨ１及びＶＨ２は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、ＶＬ１及びＶＬ２は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３はリンカーであり、Ｌ１は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ２は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ３は少なくとも１０個のアミノ酸であり、並びにＬ１、Ｌ２及びＬ３の全体のアミノ酸が少なくとも３５個のアミノ酸であり、並びに二重特異性結合構築物が免疫エフェクター細胞及び標的細胞と結合することができる、二重特異性結合構築物を提供する。
【００１０】
別の実施形態では、本発明は、式ＶＨ１－Ｌ１－ＶＨ２－Ｌ２－ＶＬ１－Ｌ３－ＶＬ２－Ｆｃを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド鎖を含む二重特異性結合構築物であって、ＶＨ１及びＶＨ２は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、ＶＬ１及びＶＬ２は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、Ｆｃは抗体Ｆｃ領域（例えば、ｓｃＦｃ）を含み、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３及びＬ４はリンカーであり、Ｌ１は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ２は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ３は少なくとも１０個のアミノ酸であり、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３の全体のアミノ酸が少なくとも３５個のアミノ酸であり、並びに二重特異性結合構築物が免疫エフェクター細胞及び標的細胞と結合することができる、二重特異性結合構築物を提供する。
【００１１】
更なる実施形態では、本発明は、本明細書に記載の二重特異性結合構築物をコードする核酸、及びこれらの核酸を含むベクターを提供する。更に、本発明は、本明細書に記載のベクターを含む宿主細胞を提供する。
【００１２】
更に他の実施形態では、本発明は、（１）二重特異性結合構築物を発現する条件下で宿主細胞を培養することと、（２）細胞集団又は細胞培養液上清から結合構築物を回収することとを含み、宿主細胞は、本明細書に記載の任意の二重特異性結合構築物をコードする１つ以上の核酸を含む、本明細書に記載の二重特異性結合構築物の製造方法を提供する。
【００１３】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な量の本明細書に記載の二重特異性結合構築物を患者に投与することを含む、癌患者を治療する方法を提供する。
【００１４】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な量の本明細書に記載の二重特異性結合構築物を患者に投与することを含む、感染症疾患を有する患者を治療する方法を提供する。
【００１５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な量の本明細書に記載の二重特異性結合構築物を患者に投与することを含む、自己免疫状態、炎症状態、又は線維性状態の患者を治療する方法を提供する。

【００１６】
別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の二重特異性結合構築物を含む薬学的組成物を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】ＨＨＬＬ構成の例示的な実施形態の代表的な図である。
【図２】ＨＬＨＬの標準型ＢｉＴＥ構成、及びリンカー長が異なるＨＨＬＬ構成の様々な実施形態を含む、様々な分子構成の代表的な図である。
【図３】代表的な実施形態のリンカー長を有するＨＨＬＬ構成と比較した、ＨＬＨＬ　ＢｉＴＥ構成及びリンカー長の代表的な図である。
【図４Ａ】図４Ａは、ニュートラルな配向のＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｂは、Ｙ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｃは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｄは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させ、Ｘ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。これらのモデルは、リンカー長が互いにどのように関係するのか、及び分子がその構造を適切に形成することができる方法を図示するものである。
【図４Ｂ】図４Ａは、ニュートラルな配向のＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｂは、Ｙ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｃは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｄは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させ、Ｘ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。これらのモデルは、リンカー長が互いにどのように関係するのか、及び分子がその構造を適切に形成することができる方法を図示するものである。
【図４Ｃ】図４Ａは、ニュートラルな配向のＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｂは、Ｙ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｃは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｄは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させ、Ｘ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。これらのモデルは、リンカー長が互いにどのように関係するのか、及び分子がその構造を適切に形成することができる方法を図示するものである。
【図４Ｄ】図４Ａは、ニュートラルな配向のＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｂは、Ｙ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｃは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。図４Ｄは、Ｙ軸を中心に１８０°回転させ、Ｘ軸を中心に９０°回転させたＨＨＬＬ構成の代表的な分子モデルを示す。これらのモデルは、リンカー長が互いにどのように関係するのか、及び分子がその構造を適切に形成することができる方法を図示するものである。
【図５Ａ】異なる野生型（「ＷＴ」）（ＨＬＨＬ）構築物の精製クロマトグラム及びゲルの結果の代表例である。
【図５Ｂ】異なる野生型（「ＷＴ」）（ＨＬＨＬ）構築物の精製クロマトグラム及びゲルの結果の代表例である。
【図６Ａ】異なるＨＨＬＬ構築物の精製クロマトグラム及びゲルの結果の代表例である。
【図６Ｂ】異なるＨＨＬＬ構築物の精製クロマトグラム及びゲルの結果の代表例である。
【図７】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の発現の代表的結果である。
【図８】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の化学的安定性の代表的結果である。
【図９Ａ】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の熱安定性の代表的結果である。
【図９Ｂ】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の熱安定性の代表的結果である。
【図１０】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の４０℃における促進安定性試験の代表的結果である。分子モデリングに基づき、「３３２」構築物を陰性対照となるように設計した。
【図１１－１】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物のクリッピング試験の代表的結果である。
【図１１－２】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物のクリッピング試験の代表的結果で

ある。
【図１２】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の結合試験の代表的結果である。
【図１３】ＷＴと比較した様々なＨＨＬＬ構築物の標的細胞の殺傷及び効力の代表的結果である。
【図１４】－２０℃の安定性アッセイにおいて、０週、２週、４週、及び８週目で野生型（ＷＴ）と比較した様々なＨＨＬＬ構築物の代表的結果である。
【図１５】凍結融解アッセイにおいて野生型（ＷＴ）と比較した様々なＨＨＬＬ構築物の代表的結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
二重特異性結合構築物の新規の構成が本明細書に記載される。この構築物は、２つの免疫グロブリン可変重鎖（ＶＨ）領域、２つの免疫グロブリン可変軽鎖（ＶＬ）領域、及び任意選択によりＦｃ領域（例えば、ｓｃＦＣ）からなる単鎖ポリペプチドを含み、次の順序で配置される：ＶＨ－リンカー－ＶＨ－リンカー－ＶＬ－リンカー－ＶＬ（「ＨＨＬＬ」）、又はＶＨ－リンカー－ＶＨ－リンカー－ＶＬ－リンカー－ＶＬ－リンカー－ｓｃＦｃ。この二重特異性結合構築物のＨＨＬＬ構成により、例えばＨＬＨＬ構成と比較して、免疫エフェクター細胞及び標的細胞の所望の標的に結合するという意図した機能を維持したままで、向上した安定性と向上したインビトロでの発現との両方がもたらされる。従って、本ＨＨＬＬ構成によって、より効率的に生成することが可能であり、且つより良好な安定性を有する二重特異性分子が提供される。この特性は、薬学的組成物に求められているものである。
【００１９】
前述の概要及び以下の詳細な説明はどちらも例示的且つ説明的なものにすぎず、請求項に記載される発明を限定するものではないことを理解されたい。本出願では、単数形の使用は、特に断りのない限り複数形を含む。本出願では、「又は」の使用は、特に断りのない限り「及び／又は」を意味する。更に、「含んでいる」という用語の使用は、「含む」及び「含まれる」などの他の形態と同様に限定的なものではない。また、「要素」又は「成分」などの用語は、特に断りのない限り、１つのユニットを含む要素及び成分、並びに２つ以上のサブユニットを含む要素及び成分の両方を包含する。また、「部分」という用語の使用は、部分の一部又は部分全体を含むことができる。
【００２０】
本明細書では、別段の定義がない限り、本発明と関連して使用される科学用語及び専門用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。更に、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。一般に、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、並びに本明細書に記載されるタンパク質及び核酸の化学特性及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法及び技術は、当該技術分野でよく知られ、且つ一般に使用されているものである。本発明の方法及び技法は、様々な一般的な参考文献及びより具体的な参考文献に記載されるように、当該技術分野においてよく知られた従来法に従って一般に実施される。
【００２１】
ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、標準的な１文字又は３文字の略語を使用して示される。特に断りのない限り、ポリペプチド配列は、その左側にアミノ末端を、その右側にカルボキシ末端を有し、及び一本鎖核酸配列及び二本鎖核酸配列の上鎖は、その左側に５’末端を、その右側に３’末端を有する。ポリペプチドの特定の部位は、アミノ酸１～５０などのアミノ酸残基番号によって、又はアスパラギンからプロリンなどの部位における実際の残基によって指定することができる。特定のポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、参照配列とどのように異なるかを明らかにすることによって説明することもできる。
【００２２】

定義
分子（この場合、分子とは、例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、二重特異性結合構築物、又は抗体である）に関する「単離された」という用語は、その起源又は派生源によって、（１）その天然状態ではそれに付随する天然に会合する成分と会合しない、（２）同じ種由来の他の分子を実質的に含まない、（３）異なる種からの細胞によって発現する、又は（４）天然に存在しない分子である。従って、化学的に合成されるか、又はそれが天然に生じる細胞とは異なる細胞系において発現する分子は、その天然に会合する成分から「単離されて」いることになる。分子はまた、当該技術分野でよく知られた精製技術を使用して単離することによって、天然に会合した成分を実質的に含まないようにしてもよい。分子の純度又は均質性は、当該技術分野でよく知られた多くの手段によって評価してもよい。例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用し、当該技術分野でよく知られた技術を用いてゲルを染色し、ポリペプチドを可視化することによって、ポリペプチド試料の純度を評価してもよい。特定の目的のために、ＨＰＬＣ又は当該技術分野でよく知られた他の精製手段を使用することにより、より高い分解能が提供され得る。

【００２３】
「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」という用語は、全体にわたって互換的に用いられ、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチド類似体を用いて生成されたＤＮＡ又はＲＮＡの類似体（例えば、ペプチド核酸及び天然に存在しないヌクレオチド類似体）、及びこれらのハイブリッドを含む。核酸は一本鎖であってもよく、又は二本鎖であってもよい。一実施形態では、本発明の核酸分子は、本発明の結合構築物若しくはフラグメント、誘導体、ムテイン、又はこれらの変異体をコードする連続的なオープンリーディングフレームを含む。

【００２４】
「ベクター」とは核酸のことであり、これに連結された別の核酸を細胞に導入するのに用いることができる。ベクターの一種である「プラスミド」とは、直線状又は環状の二本鎖ＤＮＡ分子を指し、これに追加の核酸セグメントを連結することができる。別の種類のベクターにはウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）があり、追加のＤＮＡセグメントをウイルスゲノムに導入することができる。特定のベクターでは、導入された宿主細胞中で自己複製が可能である（例えば、細菌複製起点を含む細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）では、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。「発現ベクター」とは、選択したポリヌクレオチドの発現を誘導することができるベクターの種類のことである。

【００２５】
調節配列がヌクレオチド配列の発現に影響を与える（例えば、発現のレベル、タイミング、又は位置）場合、ヌクレオチド配列は調節配列に「作動可能に連結」されている。「調節配列」とは、作動可能に連結された核酸の発現に影響を与える（例えば、発現のレベル、タイミング、又は位置）核酸のことである。調節配列は、例えば、調節を受ける核酸に対して直接的に、又は１つ以上の他の分子（例えば、調節配列及び／若しくは核酸に結合するポリペプチド）の作用を通じて効果を及ぼすことができる。調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が挙げられる。

【００２６】
「宿主細胞」とは、核酸、例えば本発明の核酸を発現させるために用いることができる細胞のことである。宿主細胞は、原核生物、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）であってもよく、又は真核生物、例えば単細胞真核生物（例えば、酵母菌若しくは他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコ若しくはトマトの植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、若しくは昆虫細胞）、又はハイブリドーマであってもよい。典型的には、宿主細胞とは、ポリペプチドをコードする核酸によって

形質転換又は形質移入することができ、続いてこの宿主細胞に核酸を発現させることが可能な培養細胞のことである。「組換え宿主細胞」という語句は、発現する核酸によって形質転換又は形質移入された宿主細胞を表すのに用いることができる。宿主細胞はまた、核酸を含むが、核酸と作動可能に連結されているような調節配列が宿主細胞に導入されなければ、所望のレベルで核酸を発現しない細胞であってもよい。宿主細胞という用語は、特定の対象の細胞だけでなく、このような細胞の後代又は潜在的な後代細胞も指すということが理解されよう。例えば、変異又は環境の影響によって後の世代に特定の修飾が生じる可能性があるため、このような後代は事実上親細胞と同一ではない可能性があるが、それでもなお本明細書で使用するような用語の範囲内に含まれる。

【００２７】

「単鎖可変フラグメント」（「ｓｃＦｖ」）とは、ＶＬ領域とＶＨ領域とがリンカー（例えば、アミノ酸残基の合成配列）を介して連結され、連続的なタンパク鎖を形成する融合タンパク質のことであり、リンカーは、タンパク鎖がそれ自体で再び折り畳まれ、一価抗原結合部位を形成することを可能にするのに十分な長さを持つ（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－２６（１９８８）及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－８３（１９８８）を参照されたい）。他の追加の部分（例えば、Ｆｃ領域）と関連する場合、ｓｃＦｖは、例えば、ＶＨ－リンカー－ＶＬ、又はＶＬ－リンカー－ＶＨに配置される。

【００２８】

「ＣＤＲ」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域（「最小認識単位」又は「超可変領域」とも呼ばれる）を指し、本発明の二重特異性結合構築物は、重鎖及び／又は軽鎖ＣＤＲを含む。このＣＤＲにより、結合構築物が特定の目的の抗原に特異的に結合することが可能となる。３つの重鎖可変領域ＣＤＲ（ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３）と、３つの軽鎖可変領域ＣＤＲ（ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３）とが存在する。２つの鎖のそれぞれのＣＤＲは、典型的にはフレームワーク領域によって整列され、標的タンパク質上の特定のエピトープ又はドメインと特異的に結合する構造を形成する。Ｎ末端からＣ末端までの天然に存在する軽鎖及び重鎖可変領域のいずれもが、典型的には次のこれらの要素の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４に従う。こうしたドメインのそれぞれの位置を占めるアミノ酸に対して番号を割り当てるための番号付けシステムが考案されている。この番号付けシステムは、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（１９８７ ａｎｄ １９９１，ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）又はＣｈｏｔｈｉａ ＆ Ｌｅｓｋ，１９８７，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７８－８８３に定義されている。所与の抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）及びフレームワーク領域（ＦＲ）は、このシステムを使用して同定することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸に関する他の番号付けシステムとしては、ＩＭＧＴ（登録商標）（ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ；Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：１８５－２０３；２００５）及びＡＨｏ（Ｈｏｎｅｇｇｅｒ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９（３）：６５７－６７０；２００１）が挙げられる。１つ以上のＣＤＲを共有結合的又は非共有結合的に分子に組み込んで、これを結合構築物としてもよい。

【００２９】

本発明による結合構築物の「結合ドメイン」は、例えば、上記で言及した群のＣＤＲを含んでもよい。好ましくは、それらのＣＤＲは、本発明の二重特異性結合構築物によって構成される抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び抗体重鎖可変領域（ＶＨ）のフレームワーク内に含まれる。或いは、本明細書で使用される用語では、「Ｌ」及び「Ｈ」可変領域（例えば、「ＨＨＬＬ」）である。

【００３０】

「ヒト抗体」という用語には、例えば、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１）（前掲）

によって記載されているものを含む、当該技術分野で公知のヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に実質的に対応する、可変領域及び定常領域又はドメインなどの抗体領域を有する抗体が含まれる。本明細書で言及されるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的変異導入により導入される変異、又はインビボでの体細胞変異により導入される変異）を、例えばＣＤＲ、特にＣＤＲ３に含んでもよい。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基に置き換えられた少なくとも１、２、３、４、５つ又はそれ以上の位置を有し得る。本明細書で使用する場合、ヒト抗体の定義は、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ（登録商標）が挙げられるがこれに限定されない、例えばファージディスプレイ技術又はトランスジェニックマウス技術などの当該技術分野において公知の技術又はシステムを使用することによって誘導することができるような、非人為的且つ／又は遺伝子組換えされた抗体のヒト配列のみを含む完全ヒト抗体をも想定するものである。本発明の文脈では、ヒト抗体由来の可変領域を、想定される二重特異性結合構築物構成に使用することができる。

【００３１】

ヒト化抗体は、１つ以上のアミノ酸置換、欠失、及び／又は付加による非ヒト種由来の抗体の配列とは異なる配列を有する。そのため、ヒト化抗体は、ヒト対象に投与した場合に、非ヒト種抗体と比較して免疫応答を誘導する可能性が低くなるか、及び／又はそれほど重篤でない免疫応答を誘導する。一実施形態では、非ヒト種抗体のフレームワーク並びに重鎖及び／又は軽鎖の定常ドメイン内の特定のアミノ酸を変異させて、ヒト化抗体を生成する。別の実施形態では、ヒト抗体由来の定常ドメインを非ヒト種の可変ドメインに融合させる。別の実施形態では、ヒト対象に投与したときに非ヒト抗体の免疫原性を減少させる可能性が高くなるように非ヒト抗体の１つ以上のＣＤＲ配列内の１つ以上のアミノ酸残基を変更するが、この変更されたアミノ酸残基はいずれも、その抗原に対する抗体又は結合構築物の抗体特異的な結合性に対して重要なものではないか、又はアミノ酸配列に対して行われた変化が保存的変化であり、これによって抗原に対するヒト化抗体の結合性が、抗原に対する非ヒト抗体の結合性よりも大幅に劣化することがないようにする。ヒト化抗体を作製する方法の例は、米国特許第６，０５４，２９７号明細書、同第５，８８６，１５２号明細書、及び同第５，８７７，２９３号明細書に見出すことができる。本発明の文脈では、ヒト化抗体由来の可変領域を、想定される二重特異性結合構築物構成に使用することができる。

【００３２】

「キメラ抗体」という用語は、１つの抗体に由来する１つ以上の領域と、１つ以上の他の抗体に由来する１つ以上の領域とを含む抗体を指す。一実施形態では、ＣＤＲの１つ以上がヒト抗体由来のものである。別の実施形態では、ＣＤＲの全てがヒト抗体由来のものである。別の実施形態では、２つ以上のヒト抗体に由来するＣＤＲを混合して、キメラ抗体に組み合わせる。例えば、キメラ抗体は、第１のヒト抗体の軽鎖に由来するＣＤＲ１と、第２のヒト抗体の軽鎖に由来するＣＤＲ２及びＣＤＲ３と、第３の抗体由来の重鎖に由来するＣＤＲとを含んでもよい。更に、フレームワーク領域は、同一の抗体、ヒト抗体などの１つ以上の異なる抗体、又はヒト化抗体のうちの１つに由来するものであってよい。キメラ抗体の一例では、重鎖及び／又は軽鎖の一部は、特定の種からの抗体、又は特定の抗体クラス若しくは抗体サブクラスに属する抗体と同一か、相同的か、又はこれらに由来するものである一方、鎖の残部は、別の種からの抗体、又は別の抗体クラス若しくは抗体サブクラスに属する抗体と同一か、相同的か、又はこれらに由来するものである。また、所望の生物学的活性を示すそのような抗体のフラグメントも含まれる。本発明の文脈では、キメラ抗体由来の可変領域を、想定される二重特異性結合構築物構成に使用することができる。

【００３３】

本発明は、ＨＨＬＬ構成からなる二重特異性結合構築物を提供するものである。最も一般的には、本明細書で記載されるような二重特異性結合構築物は、共に連結されると２つ

の異なる抗原に結合することが可能な異なるアミノ酸配列を有するいくつかのポリペプチド鎖を含む。任意選択により、ＨＨＬＬ分子は半減期延長部分を更に含む。いくつかの実施形態では、半減期延長部分はＦｃポリペプチド鎖である。いくつかの実施形態では、半減期延長部分は単鎖Ｆｃである。更に他の実施形態では、半減期延長部分はヘテロＦｃである。更に他の実施形態では、半減期延長部分はヒトアルブミンである。

【００３４】

リンカー

免疫グロブリン可変領域間にはペプチドリンカーが存在しており、このペプチドリンカーは、同一のリンカーであっても、又は異なった長さの異なるリンカーであってもよい。二重特異性結合構築物の構造においてリンカーは重要な役割を果たす可能性があり、本明細書に記載される本発明は、適切なリンカー配列だけでなく、更に本発明の二重特異性結合構築物におけるそれぞれの位置に適切なリンカー長を提供するものである。リンカーが短すぎる場合、単鎖ポリペプチド上の適切な可変領域が相互作用して抗原結合部位を形成するのに十分な柔軟性を得ることができない。リンカーが適切な長さである場合、可変領域が同一のポリペプチド鎖上の別の可変領域と相互作用して抗原結合部位を形成することが可能となる。特定の実施形態では、ＨＨＬＬ構成は、ドメイン内（Ｈ１、Ｌ１内）及びドメイン間（Ｈ１とＬ１との間）の両方でジスルフィド結合を含む。特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物の適切な発現及び立体構造を達成するために、様々な免疫グロブリン領域間に特定のリンカーを使用する（例えば、本明細書の図１を参照されたい）。例示的なリンカーを本明細書の表１に示す。特定の実施形態では、リンカー長を増大させると、タンパク質のクリッピングの増加という望ましくない特性をもたらす可能性がある。従って、適切なポリペプチド構造及び活性を可能としながら、クリッピングの増加をもたらすことのないように、リンカー長の間で適切なバランスをとることが望ましい。

【００３５】

「リンカー」とは、本明細書で意味するところでは、２つのポリペプチドを連結するペプチドのことである。特定の実施形態では、リンカーは、二重特異性結合構築物の文脈において、２つの免疫グロブリン可変領域を連結することができる。リンカーは、長さが２～３０個のアミノ酸であってよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、２～２５個、２～２０個、又は３～１８個のアミノ酸長であってよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６又は５個以下のアミノ酸長のペプチドであってよい。他の実施形態では、リンカーは、５～２５個、５～１５個、４～１１個、１０～２０個、又は２０～３０個のアミノ酸長であってよい。他の実施形態では、リンカーは、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０個のアミノ酸長であってよい。例示的なリンカーとしては、例えば、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳ（配列番号１）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号４）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５）、ＧＧＧＧＱ（配列番号６）、ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号７）、ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号８）、ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号９）、ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号１０）、ＧＧＧＧＳＡＡＡ（配列番号１１）、ＴＶＡＡＰ（配列番号１２）、ＡＳＴＫＧＰ（配列番号１３）、及びＡＡＡ（配列番号１４）が挙げられ、特に、上述したアミノ酸配列又はアミノ酸配列のサブユニットの繰り返しを含む（例えばＧＧＧＧＳ（配列番号１）又はＧＧＧＧＱ（配列番号６）の繰り返し）。

【００３６】

本発明のＨＨＬＬ分子の文脈における特定の実施形態では、リンカー１のリンカー配列は少なくとも１０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー１は少なくとも１５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー１は少なくとも２０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー１は少なくとも２５個のアミノ酸である。他の実施形態

では、リンカー１は少なくとも３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー１は１０～３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー１は１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０個のアミノ酸である。更に他の実施形態では、リンカー１は３０個超のアミノ酸である。

【００３７】

本発明のＨＨＬＬ分子の文脈における特定の実施形態では、リンカー２のリンカー配列は少なくとも１５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー２は少なくとも２０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー２は少なくとも２５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー２は少なくとも３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー２は１５～３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー２は１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０個のアミノ酸である。更に他の実施形態では、リンカー２は３０個超のアミノ酸である。

【００３８】

本発明のＨＨＬＬ分子の文脈における特定の実施形態では、リンカー３のリンカー配列は少なくとも１５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー３は少なくとも２０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー３は少なくとも２５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー３は少なくとも３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー３は１５～３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー３は１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０個のアミノ酸である。更に他の実施形態では、リンカー３は３０個超のアミノ酸である。

【００３９】

本発明のＨＨＬＬ分子の文脈における特定の実施形態では、リンカー４のリンカー配列は少なくとも５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は少なくとも１０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は少なくとも１５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は少なくとも２０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は少なくとも２５個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は少なくとも３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は５～３０個のアミノ酸である。他の実施形態では、リンカー４は５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０個のアミノ酸である。更に他の実施形態では、リンカー４は３０個超のアミノ酸である。

【００４０】

図４Ａ～４Ｄは、ＨＨＬＬ構築物の様々な配向の分子モデルを示しており、ＨＨＬＬ構築物が適切な立体構造を取り、Ｈ－Ｌ結合ドメインの両方が機能することができるようにするためには、どのような特定の長さのリンカーが必要となるのかを示している。Ａ、Ｂ、及びＣは、一方のドメインの末端残基と、もう一方のドメインの開始残基のＣα原子との間の距離を表している。熟練の施術者であれば、この情報を用いて、ＨＨＬＬ構築物が所望の通りに発現及び機能するように、想定されるＨＨＬＬ構築物をモデル化し、特定のＨ－Ｌ結合ドメインに必要とされるリンカー長を調整することが可能であろう。

【００４１】

本発明のＨＨＬＬ分子の文脈における特定の実施形態では、リンカー配列及び位置が下記の表１に記載されており、リンカーの位置は図１に記載されるものに対応し、Ｆｃ領域が更にＨＨＬＬ分子に結合している場合は、任意選択によりリンカー４を使用する。

【００４２】

【表１】

表 1

リンカー							
リンカー1	配列番号	リンカー2	配列番号	リンカー3	配列番号	リンカー4	配列番号
$(GGGGS)_2$	2	$(GGGGS)_3$	3	$(GGGGS)_3$	3	GGGG	56
$(GGGGS)_4$	4	$(GGGGS)_4$	4	$(GGGGS)_4$	4	GGGG	56
$(GGGGS)_5$	5	$(GGGGS)_5$	5	$(GGGGS)_5$	5	GGGG	56
$(GGGGS)_3$	3	$(GGGGS)_5$	5	$(GGGGS)_5$	5	GGGG	56
$(GGGGS)_3$	3	$(GGGGS)_3$	3	$(GGGGS)_2$	2	GGGG	56
$(GGGGS)_{2\text{-}10}$	52	$(GGGGS)_{3\text{-}10}$	54	$(GGGGS)_{3\text{-}10}$	54	$(GGGG)_{1\text{-}10}$	57
$(GGGGQ)_2$	7	$(GGGGQ)_3$	8	$(GGGGQ)_3$	8	GGGG	56
$(GGGGQ)_4$	9	$(GGGGQ)_4$	9	$(GGGGQ)_4$	9	GGGG	56
$(GGGGQ)_5$	10	$(GGGGQ)_5$	10	$(GGGGQ)_5$	10	GGGG	56
$(GGGGQ)_3$	8	$(GGGGQ)_5$	10	$(GGGGQ)_5$	10	GGGG	56
$(GGGGQ)_{2\text{-}10}$	53	$(GGGGQ)_{3\text{-}10}$	55	$(GGGGQ)_{3\text{-}10}$	55	$(GGGG)_{1\text{-}10}$	57

*数字の添字は繰り返しの回数を示す。例えば、$(GGGGS)_2$ = GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2)

【００４３】
３－３－２リンカーは、陰性対照として機能するように、意図的に最適でない長さで設計されているということに留意されたい。

【００４４】
結合領域のアミノ酸配列

本明細書に記載される例示的な実施形態では、二重特異性結合構築物は、様々な所望の標的に対する所望の結合性を維持するが、このことは、適切な立体構造によってこうした結合が可能になるという仮定からもたらされるものである。免疫グロブリン可変領域はＶＨ及びＶＬドメインを含んでおり、これらが会合して所望の標的に結合する可変ドメインを形成する。

【００４５】
可変ドメインは、所望の特性を有する任意の免疫グロブリンから得ることができ、これを達成するための方法が更に本明細書に記載される。一実施形態では、ＶＨ１とＶＬ１とが会合してＣＤ３εに結合し、ＶＨ２とＶＬ２とが会合して異なる標的に結合する。別の実施形態では、ＶＨ２とＶＬ２とがＣＤ３εに結合し、ＶＨ１とＶＬ１とが異なる標的に結合する。

【００４６】
別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、本明細書に記載の軽鎖可変ドメインの配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一のアミノ酸配列を含む。

【００４７】
別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、中程度にストリンジェントな条件下で本明細書に記載の配列から選択される軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、ストリンジェントな条件下で本明細書に記載の配列からなる群から選択される軽鎖可変ドメインをコードす

るポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

【００４８】

別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、本明細書に記載の配列から選択される重鎖可変ドメインの配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、本明細書に記載の配列から選択される重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、中程度にストリンジェントな条件下で本明細書に記載の配列から選択される重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、ストリンジェントな条件下で本明細書に記載の配列から選択される重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

【００４９】

置換

本発明の二重特異性結合構築物は、結合構築物が同等な又はより良好な所望の結合特異性（例えば、ＣＤ３への結合性）を保持するのであれば、少なくとも１つのアミノ酸置換を有してもよいということが理解されよう。従って、結合構築物の構造に対する修飾が本発明の範囲内に包含される。一実施形態では、結合構築物は、本明細書に記載されるようなＣＤＲ配列から５、４、３、２、１又は０個の単一アミノ酸の付加、置換及び／又は欠失によってそれぞれ独立して異なる配列を含む。本明細書で使用する場合、本明細書に記載のＣＤＲ配列から、全体で例えば４個以下のアミノ酸の付加、置換及び／又は欠失によって異なるＣＤＲ配列とは、本明細書に記載の配列と比較して４、３、２、１又は０個の単一アミノ酸の付加、置換及び／又は欠失を有する配列であることを意味する。これらは、結合構築物の所望の結合能力を損なうことのない、保存的又は非保存的であり得るアミノ酸置換を含み得る。保存的アミノ酸置換は非天然起源のアミノ酸残基を包含してもよく、これらは典型的に生体系における合成によってではなく、化学的なペプチド合成によって組み込まれる。こうしたものには、ペプチド模倣体及びアミノ酸部分が逆転又は反転した他の形態が含まれる。保存的アミノ酸置換には、その位置におけるアミノ酸残基の極性又は電荷にほとんど或いはまったく影響しないような、天然アミノ酸残基と標準残基との置換も含まれ得る。

【００５０】

非保存的置換には、１つのクラスのアミノ酸又はアミノ酸模倣物のメンバーと、物理的性質（例えば、サイズ、極性、疎水性、電荷）が異なる、別のクラスに由来するメンバーとの交換も含まれ得る。特定の実施形態では、そのような置換残基を、非ヒト抗体と相同なヒト抗体の領域、又は分子の非相同領域に導入してもよく、これを使用して本発明の結合構築物を生成することができる。

【００５１】

更に、当業者であれば、それぞれの所望のアミノ酸残基に単一のアミノ酸置換を含む試験変異体を生成することができる。続いて、この変異体を当業者に公知の活性アッセイを使用してスクリーニングすることができる。そのような変異体を使用して、好適な変異体に関する情報を収集することができる。例えば、破壊されたり、所望しない還元を受けたり、又は不適切な活性が生じた特定のアミノ酸残基に対する変更を発見した場合、このような変更を有する変異体を避けてもよい。換言すれば、当業者であれば、そのような日常的な実験から収集された情報に基づいて、単独又は他の変異と組み合わせて、更なる置換を避ける必要のあるアミノ酸を容易に判断することができる。

【００５２】

当業者であれば、よく知られる手法を使用して、本明細書に記載されるような結合構築物の好適な変異体を決定することができるであろう。特定の実施形態では、当業者であれば、活性に重要ではないと考えられる領域を標的とすることによって、活性を損なうことなく、変更してもよい分子の好適な領域を特定することができる。特定の実施形態では、上記に記載したように、類似のポリペプチドの中に保存されている分子の残基及び部分を特定することもできる。特定の実施形態では、生物活性又は構造に重要となる可能性がある領域であっても、生物活性を損なわず、又はポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすことなく保存的アミノ酸置換を行ってもよい。

【００５３】

更に、当業者であれば、活性又は構造に重要となる、類似のポリペプチド内の残基を特定する構造機能試験を検討することができる。そのような比較を考慮することで、類似のタンパク質の活性又は構造に重要なアミノ酸残基に対応するタンパク質のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者であれば、そのように重要であると予測されるアミノ酸残基に対して化学的に類似したアミノ酸置換を選択することができる。

【００５４】

いくつかの実施形態では、当業者であれば、所望の通りに向上した特性をもたらす、変更してもよい残基を特定することができる。例えば、アミノ酸置換（保存的又は非保存的）によって、所望の標的に対して増強された結合親和性をもたらすことができる。

【００５５】

当業者であれば、類似のポリペプチドの構造に関する三次元構造及びアミノ酸配列を分析することもできる。当業者であれば、そのような情報を考慮することで、その三次元構造に関する抗体のアミノ酸残基のアライメントを予測することができる。特定の実施形態では、当業者であれば、タンパク質の表面に存在することが予測されるアミノ酸残基は、他の分子との重要な相互作用に関与する可能性があるため、そのような残基に根本的な変化が生じないような選択をすることができる。二次構造の予測には、多くの科学刊行物が寄稿されている。Ｍｏｕｌｔ Ｊ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ．，７（４）：４２２－４２７（１９９６），Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３（２）：２２２－２４５（１９７４）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１１３（２）：２１１－２２２（１９７４）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．Ｒｅｌａｔ．Ａｒｅａｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４７：４５－１４８（１９７８）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，４７：２５１－２７６及びＣｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．，２６：３６７－３８４（１９７９）を参照されたい。更に、現在では二次構造の予測支援にコンピュータープログラムを利用することができる。二次構造の予測方法の１つには、ホモロジーモデリングに基づくものがある。例えば、３０％を超える配列相同性又は４０％を超える類似性を有する２つのポリペプチド又はタンパク質は、多くの場合類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（ＰＤＢ）の発達によって、ポリペプチド構造又はタンパク質構造内の折り畳みの潜在的な数を含む、二次構造の予測精度が向上してきている。Ｈｏｌｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．，２７（１）：２４４－２４７（１９９９）を参照されたい。二次構造を予測する更なる方法としては、「スレッディング」（Ｊｏｎｅｓ，Ｄ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，７（３）：３７７－８７（１９９７）；Ｓｉｐｐｌ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，４（１）：１５－１９（１９９６））、「プロファイル分析」（Ｂｏｗｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１６４－１７０（１９９１）；Ｇｒｉｂｓｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．，１８３：１４６－１５９（１９９０）；Ｇｒｉｂｓｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８４（１３）：４３５５－４３５８（１９８７））、及び「進化的リンケージ（ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｌｉｎｋａｇｅ）」（前掲のＨｏｌｍ（１９９９）、及び前掲のＢｒｅｎｎｅｒ（１９９７）を参照されたい）が挙げられる。

【００５６】

特定の実施形態では、結合構築物の変異体としては、親ポリペプチドのアミノ酸配列と比較してグリコシル化部位の数及び／又はタイプが変化した、グリコシル化変異体が挙げられる。特定の実施形態では、変異体は、天然タンパク質よりも数が多い又は少ないＮ結合グリコシル化部位を含む。或いは、この配列を削除する置換によって既存のＮ結合炭水化物鎖が除去される。また、１つ以上のＮ結合グリコシル化部位（典型的には、天然に存在するもの）が削除されて１つ以上の新しいＮ結合部位が生成される、Ｎ結合炭水化物鎖の再配置がもたらされる。更なる変異体としては、親アミノ酸配列と比較して、別のアミノ酸（例えば、セリン）によって１つ以上のシステイン残基が欠失又は置換されているシステイン変異体が挙げられる。システイン変異体は、不溶性封入体の単離後などの、抗体又は二重特異性構築物が生物学的に活性な立体構造に再び折り畳まれる必要がある場合に有用であり得る。システイン変異体は、一般に、天然タンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、典型的には、不対システインから生じる相互作用を最小限に抑えるために偶数個のシステイン残基を有する。

【００５７】

所望のアミノ酸置換（保存的か又は非保存的かにかかわらず）は、そのような置換を所望する時点で当業者が決定することができる。特定の実施形態では、アミノ酸置換を用いて、目的の標的に対する結合構築物の重要な残基を特定することができるか、又は本明細書に記載の目的の標的に対する結合構築物の親和性を増大若しくは減少させることができる。

【００５８】

特定の実施形態によれば、所望されるアミノ酸置換は、（１）タンパク質分解に対する感受性を減少させるもの、（２）酸化に対する感受性を減少させるもの、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させるもの、（４）結合親和性を変化させるもの、及び／又は（４）そのようなポリペプチドに対して他の生理化学的特性又は機能的特性を付与又は改変させるものである。特定の実施形態によれば、単一又は複数のアミノ酸置換（特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列内で（特定の実施形態では、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの部分で）行われてもよい。特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、典型的に、親配列の構造的特徴を実質的に変化させることができない（例えば、置換アミノ酸によって、親配列中に存在するヘリックスが破壊されたり、又は親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造が破壊されたりする傾向があってはならない）。当業者に知られているポリペプチドの二次構造及び三次構造の例は、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））；及びＴｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５（１９９１）に記載があり、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

【００５９】

半減期延長及びＦｃ領域

特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物のインビボにおける半減期を延長することが望ましい。これは、半減期延長部分を二重特異性結合構築物の一部として含むことによって達成することができる。半減期延長部分の非限定的な例としては、Ｆｃポリペプチド、アルブミン、アルブミンフラグメント、アルブミン若しくは新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する部分、アルブミン若しくはそのフラグメントに結合するように改変されたフィブロネクチンの誘導体、ペプチド、単一ドメインタンパク質フラグメント、又は血清半減期を増大させることができる他のポリペプチドが挙げられる。代替的実施形態では、半減期延長部分は、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのポリペプチドではない分子であってよい。

【００６０】

本明細書で使用する場合、「Ｆｃポリペプチド」という用語には、抗体のＦｃ領域由来のポリペプチドの天然型及びムテイン型が含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有するこのようなポリペプチドの切断型も含まれる。本明細書に記載される他の特性に加えて、Ｆｃ部分を含むポリペプチドは、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって生成できるという利点をもたらす。

【００６１】

特定の実施形態では、半減期延長部分は抗体のＦｃ領域である。Ｆｃ領域は、ＨＨＬＬ二重特異性結合構築物のＮ末端の端部に位置していてもよく、又はＨＨＬＬ二重特異性結合構築物のＣ末端の端部に位置していてもよい。ＨＨＬＬ二重特異性結合構築物とＦｃ領域との間にリンカーが存在してもよいが、そうである必要はない。上記で説明したように、Ｆｃポリペプチド鎖はヒンジ領域の全て又は一部を含んでもよく、その後にＣＨ２及びＣＨ３領域を含んでもよい。Ｆｃポリペプチド鎖は、哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒトコブラクダ、若しくは新世界若しくは旧世界ザル）、鳥類、又はサメ起源のものであってよい。加えて、上記で説明したように、Ｆｃポリペプチド鎖は限られた数の変異を含んでもよい。例えば、Ｆｃポリペプチド鎖は、１つ以上のヘテロ二量体化変異、ＦｃγＲに対する結合性を阻害若しくは増強する１つ以上の変異、又はＦｃＲｎに対する結合性を増大させる１つ以上の変異を含み得る。

【００６２】

特定の実施形態では、半減期を延長するのに利用されるＦｃは、単鎖Ｆｃ（「ｓｃＦｃ」）である。

【００６３】

いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドのアミノ酸配列は、哺乳類、例えばヒトのアミノ酸配列であってよい。Ｆｃポリペプチドのアイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、若しくはＩｇＧ４などのＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、又はＩｇＭであってよい。ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のＦｃポリペプチド鎖のアミノ酸配列のアライメントを下記の表２に示す。

【００６４】

使用可能なヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のＦｃポリペプチド鎖の配列を、配列番号３６～３９に示す。配列のうち１００個のアミノ酸につき１０個以下の単一アミノ酸の欠失、挿入、又は置換を含む他の類似変異体として、１つ以上のヘテロ二量体化変異、半減期を延長する１つ以上のＦｃ変異、ＡＤＣＣを増強する１つ以上の変異、及び／又はＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）の結合性を阻害する１つ以上の変異を含有するこれらの配列の変異体もまた想定される。

【００６５】

【表２】

表 2: ヒトIgGのFc ポリペプチド鎖のアミノ酸配列

```
IgG1                ----------------------------------------------
IgG2                ----------------------------------------------
IgG3                ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
IgG4                ----------------------------------------------

                  225       235       245       255       265       275
                   *         *         *         *         *         *
IgG1   EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
IgG2   ERKCCVE---CPPCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
IgG3   EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
IgG4   ESKYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF


                  285       295       305       315       325       335
                   *         *         *         *         *         *
IgG1   NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
IgG2   NWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT
IgG3   KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
IgG4   NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT

                  345       355       365       375       385       395
                   *         *         *         *         *         *
IgG1   ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
IgG2   ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
IgG3   ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP
IgG4   ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP

                  405       415       425       435       445
                   *         *         *         *         *
IgG1   PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ( 配列番号 :36)
IgG2   PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ( 配列番号 :37)
IgG3   PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK ( 配列番号 :38)
IgG4   PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK ( 配列番号 :39)
```

【００６６】

表２に示す番号付けは、ＩｇＧ１抗体の定常領域の連続する番号付けに基づいたＥＵ番号付けシステムに従った。Ｅｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９６９），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６３：７８－８５。従って、この番号付けは、ＩｇＧ３のヒンジの余分な長さに十分対応していない。それにもかかわらず、本明細書ではこの番号付けをＦｃ領域内の位置を表すのに使用する。これは、Ｆｃ領域内の位置を指すために依然としてこの番号付けが当該技術分野で一般的に使用されているためである。ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４のＦｃポリペプチドのヒンジ領域は、位置２１６のあたりから位置２３０のあたりに伸びている。ＩｇＧ２及びＩｇＧ４のヒンジ領域がＩｇＧ１ヒンジよりもそれぞれアミノ酸３個分短いことは、アライメントから明らかである。ＩｇＧ３のヒンジはかなり長く、上流に更なる４７個のアミノ酸が伸びている。ＣＨ２領域は位置２３１～３４０のあたりから伸びており、ＣＨ３領域は位置３４１～４４７のあたりから伸びている。

【００６７】

Ｆｃポリペプチドの天然に存在するアミノ酸は、わずかに異なっている可能性がある。そのような変形形態には、天然に存在するＦｃポリペプチド鎖の配列のうち１００個のアミノ酸につき１０個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、又は置換が含まれる。置換が存在する場合、これらは上記で定義したように保存的アミノ酸置換であってよい。第１及び第２のポリペプチド鎖上のＦｃポリペプチドは、アミノ酸配列内で異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、それらには、「ヘテロ二量体化変異」、例えば、上記で定義した

ようにヘテロ二量体形成を促進する電荷対合置換が含まれ得る。更に、ＰＡＢＰのＦｃポリペプチド部分にＦｃγＲ結合を阻止又は増強させる変異を含むこともできる。そのような変異については、上記及びＸｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０００），Ｃｅｌｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００（１）：１６－２６に記載されており、その関連部分は参照により本明細書に組み込まれる。また、Ｆｃポリペプチド部分は、上記に記載したように、「半減期を延長するＦｃ変異」を含むことができ、例えば、米国特許７，０３７，７８４号明細書、同第７，６７０，６００号明細書、及び同第７，３７１，８２７号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０２３４５７５号明細書、及び国際出願ＰＣＴ／ＵＳ第２０１２／０７０１４６号明細書に記載されるようなものを含み、その全ての関連部分が参照により本明細書に組み込まれる。更に、Ｆｃポリペプチドは、上記で定義したように、「ＡＤＣＣを増強する変異」を含み得る。

【００６８】

ＰＣＴ出願公開の国際公開第９３／１０１５１号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている、別の好適なＦｃポリペプチドは、ヒトＩｇＧ１抗体のＦｃ領域のＮ末端のヒンジ領域から天然のＣ末端に延びる単鎖ポリペプチドである。別の有用なＦｃポリペプチドは、米国特許５，４５７，０３５号明細書及びＢａｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，ＥＭＢＯ　Ｊ．１３：３９９２－４００１に記載されているＦｃムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、アミノ酸１９がＬｅｕからＡｌａに変更され、アミノ酸２０がＬｅｕからＧｌｕに変更され、アミノ酸２２がＧｌｙからＡｌａに変更されているという点を除き、国際公開第９３／１０１５１号パンフレットに提示された天然Ｆｃ配列のアミノ酸配列と同一のものである。このムテインは、Ｆｃ受容体に対する親和性の低下を示す。

【００６９】

１つ以上の変異をＦｃに導入することによって、抗体のエフェクター機能を増大又は低下させることができる。本発明の実施形態には、エフェクター機能を増大させるように改変されたＦｃを有するＩＬ－２ムテインＦｃ融合タンパク質（米国特許第７，３１７，０９１号明細書及びＳｔｒｏｈｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２０：６８５－６９１，２００９；双方共にその全体が本明細書に参照により組み込まれる）が含まれる。特定の治療指標では、エフェクター機能を増大させることが望ましい場合がある。別の治療指標では、エフェクター機能を低下させることが望ましい場合がある。

【００７０】

増大したエフェクター機能を有する例示的なＩｇＧ１のＦｃ分子としては、以下の置換基を有するようなものが挙げられる。

Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２３９Ｄ／Ａ３３０Ｓ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２３９Ｄ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２９８Ａ／Ｄ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ
Ｐ２４７Ｉ／Ａ３３９Ｄ
Ｐ２４７Ｉ／Ａ３３９Ｑ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ／Ｓ２９８Ｄ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ／Ｓ２９８Ｖ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｐ３９６Ｌ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ
Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ
Ｋ３２６Ａ／Ｅ３３３Ａ
Ｋ３２６Ｗ／Ｅ３３３Ｓ
Ｋ２９０Ｅ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ
Ｋ２９０Ｎ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ

Ｋ２９０Ｅ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ／Ｋ３２６Ｅ
Ｋ２９０Ｎ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ／Ｋ３２６Ｅ
【００７１】
ＩｇＧのＦｃ含有タンパク質のエフェクター機能を増大させる別の方法には、Ｆｃのフコシル化を減少させることによるものがある。Ｆｃに結合した二分岐の複合型オリゴ糖からコアフコースを除去することによって、抗原結合性又はＣＤＣエフェクター機能を変化させることなくＡＤＣＣエフェクター機能が著しく増大する。Ｆｃ含有分子、例えば抗体のフコシル化を減少又は消失させるためのいくつかの方法が知られている。これらの方法には、ＦＵＴ８ノックアウト細胞株、変異型ＣＨＯ株Ｌｅｃ１３、ラットハイブリドーマ細胞株ＹＢ２／０、ＦＵＴ８遺伝子に特異的な低分子干渉ＲＮＡを含む細胞株、及びα－１，４－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ及びゴルジα－マンノシダーゼＩＩを共発現する細胞株を含む特定の哺乳類細胞株における組換え発現が挙げられる。或いは、Ｆｃ含有分子を、植物細胞、酵母、又は原核細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの、非哺乳類細胞に発現させてもよい。
【００７２】
本発明の特定の実施形態では、二重特異性結合構築物は、エフェクター機能を低下させるように改変されたＦｃを含む。低下したエフェクター機能を有する例示的なＦｃ分子としては、以下の置換基を有するようなものが挙げられる。
Ｎ２９７Ａ又はＮ２９７Ｑ（ＩｇＧ１）
Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（ＩｇＧ１）
Ｖ２３４Ａ／Ｇ２３７Ａ（ＩｇＧ２）
Ｌ２３５Ａ／Ｇ２３７Ａ／Ｅ３１８Ａ（ＩｇＧ４）
Ｈ２６８Ｑ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ａ３３１Ｓ（ＩｇＧ２）
Ｃ２２０Ｓ／Ｃ２２６Ｓ／Ｃ２２９Ｓ／Ｐ２３８Ｓ（ＩｇＧ１）
Ｃ２２６Ｓ／Ｃ２２９Ｓ／Ｅ２３３Ｐ／Ｌ２３４Ｖ／Ｌ２３５Ａ（ＩｇＧ１）
Ｌ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｐ３３１Ｓ（ＩｇＧ１）
Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ（ＩｇＧ１）
【００７３】
ヒトＩｇＧ１はＮ２９７（番号付けシステム）にグリコシル化部位を有し、グリコシル化はＩｇＧ１抗体のエフェクター機能に寄与することが知られている。例示的なＩｇＧ１配列を配列番号３６に示す。アグリコシル化抗体を作製するために、Ｎ２９７を変異させてもよい。例えば、変異によってＮ２９７をグルタミン（Ｎ２９７Ｑ）などの生理化学的性質がアスパラギンに類似したアミノ酸、又は極性基を持たないアスパラギンを模倣したアラニン（Ｎ２９７Ａ）で置換することができる。
【００７４】
特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１のアミノ酸Ｎ２９７をグリシン、即ちＮ２９７Ｇに変異させると、その残基における他のアミノ酸置換と比較してはるかに優れた精製効率及び生物物理学的特性がもたらされる。例えば、米国特許第９，５４６，２０３号明細書及び同第１０，０９３，７１１号明細書を参照されたい。特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物は、Ｎ２９７Ｇ置換を有するヒトＩｇＧ１のＦｃを含む。
【００７５】
Ｎ２９７Ｇ変異を有するヒトＩｇＧ１のＦｃを含む本発明の二重特異性結合構築物はまた、更なる挿入、欠失、及び置換を含んでもよい。特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１のＦｃはＮ２９７Ｇ置換を含み、配列番号３６に記載されるアミノ酸配列と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９３％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９８％同一、又は少なくとも９９％同一である。特に好ましい実施形態では、Ｃ末端のリシン残基が置換又は欠失している。
【００７６】
場合によっては、アグリコシル化されたＩｇＧ１のＦｃ含有分子は、グリコシル化され

たＩｇＧ１のＦｃ含有分子よりも安定性が劣っている可能性がある。従って、Ｆｃ領域を改変して、アグリコシル化分子の安定性を更に増大させてもよい。いくつかの実施形態では、二量体の状態のジスルフィド結合を形成するために、１つ以上のアミノ酸をシステインに置換する。特定の実施形態では、配列番号３６に記載されるアミノ酸配列の残基Ｖ２５９、Ａ２８７、Ｒ２９２、Ｖ３０２、Ｌ３０６、Ｖ３２３、又はＩ３３２をシステインで置換してもよい。他の実施形態では、残基の特定の対合が互いにジスルフィド結合を優先的に形成するように置換され、それによってジスルフィド結合のスクランブルを制限又は防止する。特定の実施形態では、対合として、Ａ２８７Ｃ及びＬ３０６Ｃ、Ｖ２５９Ｃ及びＬ３０６Ｃ、Ｒ２９２Ｃ及びＶ３０２Ｃ、並びにＶ３２３Ｃ及びＩ３３２Ｃが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７７】

上記のリンカーの項にて本明細書に記載したように、特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物は、特にＦｃをＶＬ２に連結する、ＦｃとＨＨＬＬ二重特異性結合構築物との間のリンカーを含む。特定の実施形態では、ＦｃとＨＨＬＬポリペプチドとの間のペプチドの１つ以上のコピーは、ＧＧＧＧＳ（配列番号１）、ＧＧＮＧＴ（配列番号１５）、又はＹＧＮＧＴ（配列番号１６）を含む。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域とＨＨＬＬポリペプチドとの間のポリペプチド領域が、ＧＧＧＧＳ（配列番号１）、ＧＧＮＧＴ（配列番号１５）、又はＹＧＮＧＴ（配列番号１６）の単一コピーを含む。特定の実施形態では、リンカーＧＧＮＧＴ（配列番号１５）又はＹＧＮＧＴ（配列番号１６）は、適切な細胞に発現するとグリコシル化され、そのようなグリコシル化によって、溶液内のタンパク質、及び／又はインビボで投与されたときのタンパク質の安定化を促進させることができる。従って、特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物は、Ｆｃ領域とＨＨＬＬポリペプチドとの間にグリコシル化されたリンカーを含む。

【００７８】

二重特異性結合構築物をコードする核酸

別の実施形態では、本発明は、本発明の二重特異性結合構築物をコードする単離核酸分子を提供する。加えて、核酸を含むベクター、核酸を含む細胞、及び本発明の結合構築物を作製する方法が提供される。核酸は、例えば、二重特異性結合構築物の全部若しくは一部、又はそのフラグメント、誘導体、ムテイン、若しくは変異体をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドの発現を阻害するポリペプチド、アンチセンス核酸をコードするポリヌクレオチドを同定、分析、変異又は増幅するためのハイブリダイゼーションプローブ、ＰＣＲプライマー又はシークエンシングプライマーとして使用するのに十分なポリヌクレオチド、及び上記の相補的配列を含む。核酸は、所望の使用又は機能に適した任意の長さであってよく、１つ以上の更なる配列、例えば調節配列、及び／又はより大きな核酸、例えばベクターの一部を含み得る。核酸は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチド、並びにその人工的な変異体（例えば、ペプチド核酸）を含み得る。

【００７９】

ポリペプチド（例えば、重鎖又は軽鎖、可変ドメインのみ、又は完全長）をコードする核酸は、抗原で免疫化されたマウスのＢ細胞から単離してもよい。核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの従来の手順によって単離してもよい。

【００８０】

重鎖及び軽鎖可変領域をコードする核酸配列が本明細書に含まれる。当業者であれば、遺伝暗号の縮重によって、本明細書で開示されるポリペプチド配列のそれぞれが多数の他の核酸配列によってコードされていることが理解されよう。本発明は、本発明のそれぞれの結合構築物をコードする、それぞれの縮重ヌクレオチド配列を提供するものである。

【００８１】

本発明は更に、特定のハイブリダイゼーション条件下で他の核酸にハイブリダイズする核酸を提供する。核酸をハイブリダイズする方法は、当該技術分野においてよく知られている。例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏ

ｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．１９８９；６．３．１－６．３．６を参照されたい。本明細書に定義されるように、例えば、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、５×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）、０．５％のＳＤＳ、１．０ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を含む予洗溶液、約５０％のホルムアミド、６×ＳＳＣのハイブリダイゼーション緩衝液、及び５５℃のハイブリダイゼーション温度（又は、約５０％のホルムアミドを含むような、４２℃のハイブリダイゼーション温度での他の類似のハイブリダイゼーション溶液）、並びに０．５×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ中で６０℃での洗浄条件が用いられる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、４５℃の６×ＳＳＣ中でハイブリダイズし、その後６８℃の０．１×ＳＳＣ、０．２％ＳＤＳ中で１回以上洗浄する。更に、当業者であれば、ハイブリダイゼーション条件及び／又は洗浄条件を操作して、互いに少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９９％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸が典型的に互いにハイブリダイズしたままで維持されるように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加又は減少させることができる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本的なパラメータ及び好適な条件を考案するための手引きは、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，ｃｈａｐｔｅｒｓ ９ ａｎｄ １１；及びＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５，Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ｓｅｃｔｉｏｎｓ ２．１０ ａｎｄ ６．３－６．４）に記載されており、当業者であれば、例えばＤＮＡの長さ及び／又は塩基組成に基づいて容易に決定することができる。核酸への変異導入によって変更を導入することができ、それによって核酸がコードするポリペプチド（例えば、結合構築物）のアミノ酸配列に変更が生じる。変異は、当該技術分野において公知の任意の手法を使用して導入することができる。一実施形態では、例えば、部位特異的変異導入プロトコールを使用して１つ以上の特定のアミノ酸残基が変更される。別の実施形態では、例えば、ランダム変異導入プロトコールを使用して１つ以上のランダムに選択される残基が変更される。実施方法はどうあれ、変異ポリペプチドを発現させ、その所望の特性をスクリーニングすることができる。

【００８２】

核酸がコードするポリペプチドの生物活性を大きく変えることなく、変異を核酸に導入することができる。例えば、非必須アミノ酸残基位置でのアミノ酸置換を生じさせるヌクレオチド置換を実施することができる。一実施形態では、本発明の結合構築物の本明細書で提供されるヌクレオチド配列、又はその所望のフラグメント、変異体、若しくは誘導体を、本発明の結合構築物の軽鎖又は本発明の結合構築物の重鎖に関して本明細書に示されるアミノ酸残基の１つ以上の欠失又は置換を含むアミノ酸配列をコードし、２つ以上の配列が異なる残基となるように変異させる。別の実施形態では、この変異導入によって、本発明の結合構築物の軽鎖又は本発明の結合構築物の重鎖に関して本明細書に示される１つ以上のアミノ酸残基に隣接するアミノ酸が２つ以上の配列の異なる残基となるように挿入される。或いは、核酸がコードするポリペプチドの生物活性を選択的に変更する核酸に１つ以上の変異を導入することができる。

【００８３】

別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチド又はその一部をコードする核酸を含むベクターを提供する。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳類ベクター及び発現ベクター、例えば組換え発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８４】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞に核酸を発現させるのに適した形態の本発明の核酸を含み得る。組換え発現ベクターは、発現のために使用される宿主細胞に基づいて

選択される１つ以上の調節配列を含み、こうした調節配列は、発現する核酸配列に作動可能に連結されている。調節配列としては、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の恒常的発現を誘導するもの（例えば、ＳＶ４０初期遺伝子エンハンサー、ラウス肉腫ウイルスプロモーター及びサイトメガロウイルスプロモーター）、特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を誘導するもの（例えば、組織特異的調節配列；その全体が参照によって本明細書に組み込まれるＶｏｓｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．１１：２８７，Ｍａｎｉａｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３６：１２３７を参照されたい。）、並びに特定の処理又は条件に応じてヌクレオチド配列の誘導性発現を誘導するもの（例えば、哺乳類細胞におけるメタロチオネインプロモーター、並びに原核生物系と真核生物系の両方におけるｔｅｔ応答性及び／又はストレプトマイシン応答性プロモーター（同文献を参照されたい）が挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に依存する可能性があることを当業者であれば理解されよう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって、本明細書に記載されるような核酸によってコードされる融合タンパク質又はペプチドを含む、タンパク質又はペプチドを産生することができる。

【００８５】

別の実施形態では、本発明は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞を提供する。宿主細胞は、任意の原核細胞又は真核細胞であってよい。原核生物の宿主細胞としては、グラム陰性又はグラム陽性の微生物、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）又は桿菌（ｂａｃｉｌｌｉ）が挙げられる。高等な真核細胞としては、昆虫細胞、酵母細胞、及び哺乳類起源の株化細胞が挙げられる。好適な哺乳類宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞若しくはＶｅｇｇｉｅ ＣＨＯなどのそれらの派生株、及び無血清培地で増殖する関連細胞株（Ｒａｓｍｕｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２８：３１を参照されたい）、又はＤＨＦＲを欠損したＣＨＯ系統のＤＸＢ－１１（Ｕｒｌａｕｂ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６－２０を参照されたい）が挙げられる。更なるＣＨＯ細胞株としては、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ＃ＣＣＬ－６１）、ＥＭ９（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ－１８６１）、及びＵＶ２０（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ－１８６２）が挙げられる。更なる宿主細胞としては、サル腎培養細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）（Ｇｌｕｚｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｃｅｌｌ ２３：１７５を参照されたい）、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １６３）、ＡＭ－１／Ｄ細胞（米国特許第６，２１０，９２４号明細書に記載されている）、ヒーラー細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １０）細胞株、アフリカミドリザル腎細胞株ＣＶ１に由来するＣＶ１／ＥＢＮＡ細胞株（ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）（ＭｃＭａｈａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：２８２１を参照されたい）、２９３、２９３ ＥＢＮＡ若しくはＭＳＲ ２９３などのヒト胚腎臓細胞、ヒト上皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養に由来する細胞株、初代移植片、ＨＬ－６０細胞、Ｕ９３７細胞、ＨａＫ細胞又はジャーカット細胞が挙げられる。細菌、真菌、酵母菌、及び哺乳類細胞宿主と共に使用するのに適切なクローニングベクター及び発現ベクターは、Ｐｏｕｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８５）に記載されている。

【００８６】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換技術又は形質移入技術によって原核細胞又は真核細胞に導入することができる。哺乳類細胞の安定した形質移入の場合、使用する発現ベクター及び形質移入技術に応じて、ごくわずかな細胞のみで外来ＤＮＡをそのゲノムに組み込みことができることが知られている。こうした組み込み体を識別して選択するために、一般的に、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性のための）をコードする遺伝子が目的遺伝子と共に宿主細胞に導入される。更なる選択マーカーとしては、Ｇ４１８、ハイグロマイ

シン及びメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を与えるものが挙げられる。導入された核酸で安定的に形質移入された細胞は、他の方法の中でも特に、薬物選択によって識別することができる（例えば、選択マーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生存することになるが、他の細胞は死滅する）。

【００８７】

形質転換細胞は、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養することができ、そのポリペプチドを従来のタンパク質精製手順によって回収することができる。本明細書で使用することが想定されるポリペプチドは、内在性物質の混入を実質的に含まない、実質的に均質な組換え哺乳類ポリペプチドを含む。

【００８８】

本発明の二重特異性結合構築物をコードする核酸を含む細胞には、ハイブリドーマも含まれる。ハイブリドーマの生成及び培養が本明細書で述べられる。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載されるような核酸分子を含むベクターが提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書で記載されるような核酸分子を含む宿主細胞を含む。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載されるような二重特異性結合構築物をコードする核酸分子が提供される。

【００９１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の少なくとも１つの二重特異性結合構築物を含む薬学的組成物が提供される。

【００９２】

生成方法

本発明の結合構築物は、タンパク質（例えば、抗体）を合成するための当該技術分野において公知の任意の方法、特に化学合成技術、又は好ましくは組換え発現技術によって生成することができる。

【００９３】

結合構築物の組換え発現には、二重特異性結合構築物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築することが必要となる。二重特異性結合構築物をコードするポリヌクレオチドが得られたら、二重特異性結合構築物を生成するためのベクターを組換えＤＮＡ技術によって生成することができる。発現ベクターは、二重特異性結合構築物のコード配列、並びに適切な転写及び翻訳制御シグナルを含むように構築される。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えが挙げられる。

【００９４】

従来技術によって発現ベクターを宿主細胞に導入し、続いてこの形質移入細胞を従来技術によって培養して、本発明の二重特異性結合構築物を生成する。

【００９５】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明の二重特異性結合構築物を発現させてもよい。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を生成し、続いて精製することができる媒体を意味するだけでなく、適切なヌクレオチドのコード配列で形質転換又は形質移入した場合にその場で本発明の分子を発現することができる細胞をも意味する。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの細菌細胞、及び真核細胞は、組換え結合分子の発現、特に、組換え結合分子全体を発現させるために一般的に使用されている。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子のプロモーターエレメントなどのベクターと組み合わせたチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）などの哺乳類細胞は、抗体にとって効果的な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：２（１９９０））。

【００９６】

加えて、宿主細胞株は、所望される特定の方法で挿入配列の発現を調節したり、又は遺伝子産物を改変及びプロセシングしたりするものを選択してもよい。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセシング（例えば、切断）は、タンパク質が機能するために重要なものである。異なる宿主細胞では、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセシング及び修飾に関して特徴的で特異な機構を有する。発現した外来タンパク質の正確な修飾及びプロセシングを確実なものとするために、適切な細胞株又は宿主系を選択することができる。この目的を達成するために、遺伝子産物の一次転写物の適切なプロセシング、グリコシル化、及びリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用することができる。そのような哺乳類宿主細胞としては、ＣＨＯ、ＣＯＳ、２９３、３Ｔ３、又は骨髄腫細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９７】

組換えタンパク質を長期間にわたって高収率で産生するためには、安定発現が好ましい。例えば、結合分子を安定的に発現させる細胞株を改変してもよい。ウイルス性複製起点を含有する発現ベクターを使用する代わりに、適切な発現調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）で調節されたＤＮＡ及び選択マーカーによって宿主細胞を形質転換することができる。外来ＤＮＡを導入した後に、改変細胞を濃縮培地で１～２日間増殖させ、続いて選択培地に切り替えてもよい。組換えプラスミド内の選択マーカーによって選択に対する耐性が与えられ、細胞がそれらの染色体にプラスミドを安定的に組み込み、増殖して集積を形成することが可能となり、これらがクローニングされて細胞株に拡大することができる。本方法を使用して、結合分子を発現する細胞株を有利に改変することができる。そのような改変細胞株は、特に、結合分子と直接又は間接的に相互作用する化合物をスクリーニングし、評価する際に有用となり得る。

【００９８】

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ ＆ Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ４８：２０２（１９９２））、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２２：８１７（１９８０））が挙げられるが、これらに限定されない多数の選択系を使用してもよく、遺伝子はそれぞれｔｋ、ｈｇｐｒｔ又はａｐｒｔ－細胞において使用することができる。また、以下の遺伝子：メトトレキサートに対する耐性を与えるｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：１５２７（１９８１））；ミコフェノール酸に対する耐性を与えるｇｐｔ（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ＆ Ｂｅｒｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：２０７２（１９８１））；アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与えるｎｅｏ（Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５（１９９１））；及び、ハイグロマイシンに対する耐性を与えるｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ３０：１４７（１９８４））を選択する基準として、代謝拮抗薬耐性を用いてもよい。組換えＤＮＡ技術の当該技術分野において一般に公知の方法を通常通りに適用して、所望の組換えクローンを選択してもよく、そのような方法は、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）；及びｉｎ Ｃｈａｐｔｅｒｓ １２ ａｎｄ １３，Ｄｒａｃｏｐｏｌｉ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１（１９８１）に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９９】
結合分子の発現レベルは、ベクターを増幅することによって増加させることができる（確認のために、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｈｅｎｔｓｃｈｅｌ，“Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｖｅｃｔｏｒｓ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｇｅｎｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｃｌｏｎｅｄ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ”（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｖｏｌ．３．Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７）を参照されたい）。結合を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害因子のレベルが増加することにより、マーカー遺伝子のコピー数が増加する。増幅領域は遺伝子と会合するため、タンパク質産物も増加する（Ｃｒｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２５７（１９８３））。

【０１００】
宿主細胞は、本発明の複数の発現ベクターで同時形質移入してもよい。ベクターは、発現したポリペプチドの同様な発現を可能にする同一の選択マーカーを含んでもよい。或いは、例えば本発明のポリペプチドをコードし、発現させることができる単一のベクターを使用してもよい。コード配列は、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡを含んでもよい。

【０１０１】
本発明の結合分子が、動物によって、化学的に合成することによって生成されるか、又は組換えによって発現したら、免疫グロブリン分子を精製するための当該技術分野において公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、特にプロテインＡ後の特異抗原へのアフィニティークロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、又はタンパク質を精製するための任意の他の標準的な技術によって精製してもよい。加えて、本発明の結合構築物又はこれらのフラグメントは、本明細書に記載されるか又は別様に当該技術分野において公知の異種のポリペプチド配列に融合させて、精製を促進することができる。精製技術は、Ｆｃ領域（例えば、ｓｃＦＣ）が本発明の二重特異性結合構築物に結合しているか否かに応じて異なり得る。

【０１０２】
いくつかの実施形態では、本発明には、組換え技術によってポリペプチドに融合する、又は化学的にポリペプチドにコンジュゲートする（共有結合及び非共有結合の両方によるコンジュゲートを含む）結合構築物が包含される。精製を容易にするために、融合又はコンジュゲートした本発明の結合構築物を使用してもよい。例えば、Ｈａｒｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，前掲、及びＰＣＴ出願公開の国際公開第９３／２１２３２号パンフレット；欧州特許第４３９，０９５号明細書；Ｎａｒａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．３９：９１－９９（１９９４）；米国特許第５，４７４，９８１号明細書；Ｇｉｌｌｉｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８９：１４２８－１４３２（１９９２）；Ｆｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４６：２４４６－２４５２（１９９１）を参照されたい。

【０１０３】
更に、本発明の結合構築物又はこれらのフラグメントは、精製を促進するためにペプチドなどのマーカー配列に融合させることができる。好ましい実施形態では、マーカーのアミノ酸配列は、特に、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．、９２５９ Ｅｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、Ｃａｌｉｆ．、９１３１１）に設けられるタグなどのヘキサヒスチジンペプチド（配列番号５８）であり、その多くは市販されている。Ｇｅｎｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されているように、例えば、ヘキサヒスチジン（配列番号５８）は、簡単な融合タンパク質の精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する「ＨＡ」タグ（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ３７：７６７（１９８４））、及び「ｆｌａｇ」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０４】
二重特異性結合構築物の生成
本発明の二重特異性結合構築物は、一般的には、所望の抗体からＶＨ領域及びＶＬ領域を選択し、それらを本明細書で記載されるようなポリペプチドリンカーを使用して連結し、任意選択によりＦｃ領域が結合されたＨＨＬＬ二重特異性結合構築物を形成することによって構築される。より具体的には、ＶＨ、ＶＬ及びリンカー、並びに任意選択によりＦｃをコードする核酸を組み合わせて、本発明の二重特異性結合構築物をコードするＨＨＬＬ核酸構築物を生成する。
【０１０５】
抗体の生成
特定の実施形態では、本発明の二重特異性結合構築物を生成する前に、所望の標的に対する結合特異性を有する単一特異性抗体を最初に生成する。
【０１０６】
本発明の二重特異性結合構築物を生成するのに有用な抗体は、当該技術分野においてよく知られる手法によって調製してもよい。例えば、動物（例えば、マウス若しくはラット又はウサギ）を免疫化することによって、続いて免疫スケジュールの完了後に、この動物から採取した脾臓細胞を不死化することによって調製してもよい。脾臓細胞は、当該技術分野において公知の任意の技術を使用して不死化することができ、例えば、脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマを生成することよって不死化することができる。例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ（例えば、１９８８からの）又は２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（例えば、２０１４からの）を参照されたい。
【０１０７】
一実施形態では、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス抗体の可変ドメイン（又はその抗原結合部位の全て又は一部）と、ヒト抗体由来の定常ドメインとを含む。或いは、ヒト化抗体フラグメントは、マウスモノクローナル抗体の抗原結合部位と、ヒト抗体由来の可変ドメインフラグメント（抗原結合部位を欠損させた）とを含んでもよい。改変モノクローナル抗体を生成するための手順は、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３，Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３４３９，Ｌａｒｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：９３４，及びＷｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３，ＴＩＰＳ １４：１３９に記載されるものが挙げられる。一実施形態では、キメラ抗体はＣＤＲ移植抗体である。抗体をヒト化する技術は、例えば、米国特許第５，８６９，６１９号明細書；同第５，２２５，５３９号明細書；同第５，８２１，３３７号明細書；同第５，８５９，２０５号明細書；同第６，８８１，５５７号明細書、Ｐａｄｌａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５，ＦＡＳＥＢ Ｊ．９：１３３－３９，Ｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：１４３２－４１，Ｚｈａｎｇ，Ｗ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．４２（１２）：１４４５－１４５１，２００５；Ｈｗａｎｇ Ｗ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ．３６（１）：３５－４２，２００５；Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ ＷＦ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６（１）：４３－６０，２００５；及びＣｌａｒｋ，Ｍ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ．２１（８）：３９７－４０２，２０００に記載されている。
【０１０８】
本発明の結合分子はまた、完全ヒトモノクローナル抗体の領域を含んでもよい。完全ヒトモノクローナル抗体は、当業者が精通しているであろう多くの技術によって生成してもよい。そのような方法としては、ヒト末梢血細胞（例えば、Ｂリンパ球を含む）のエプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）形質転換、ヒトＢ細胞のインビトロ免疫化、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を有する免疫化したトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞の融合、ヒト免疫グロブリンＶ領域のファージライブラリーからの単離、又は当技術分野において公知の、及び本明細書に開示されるものに基づくような他の手順が挙げられるが

、これらに限定されない。

【０１０９】

非ヒト動物でヒトモノクローナル抗体を生成するための手順が開発されてきた。例えば、様々な手段によって１つ以上の内在性免疫グロブリン遺伝子が不活性化されたマウスが作製されている。不活性化したマウス遺伝子を置き換えるために、マウスにヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されている。この手法では、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子座のエレメントが胚性幹細胞由来のマウスの系統に導入されるが、これには内在性重鎖及び軽鎖遺伝子座を標的化して破壊することが含まれる（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：４５５－５８（１９９７）も参照されたい）。例えば、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、ミニ遺伝子の構築物、又はマウスリンパ組織のＢ細胞に特有のＤＮＡ再編成及び高頻度突然変異を受けた、酵母人工染色体上の導入遺伝子座であってもよい。

【０１１０】

動物内で生成された抗体は、その動物に導入されたヒト遺伝子材料によってコードされるヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖を組み込んでいる。一実施形態では、トランスジェニックマウスなどの非ヒト動物を好適な免疫原で免疫化する。

【０１１１】

ヒト抗体又は部分的なヒト抗体を生成するために、トランスジェニック動物を生成及び使用する手法の例が、米国特許第５，８１４，３１８号明細書、同第５，５６９，８２５号明細書、及び同第５，５４５，８０６号明細書、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｒｏｍ ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ ｍｉｃｅ ｉｎ Ｌｏ，ｅｄ．Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，ＮＪ：１９１－２００（２００３），Ｋｅｌｌｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１３：５９３－９７，Ｒｕｓｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ．６８：１８２０－２６，Ｇａｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎ．３０：５３４－４０，Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１８：４２１－２５，Ｇｒｅｅｎ，１９９９，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２３１：１１－２３，Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ，１９９８，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ３１：３３－４２，Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１８８：４８３－９５，Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ Ａ，１９９８，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ．７：６０７－１４，Ｔｓｕｄａ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ．４２：４１３－２１，Ｍｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．１５：１４６－５６，Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ，１９９４，Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ．４：７６１－６３，Ａｒｂｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．１：２４７－６０，Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．７：１３－２１，Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ．３６２：２５５－５８，Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．９０：２５５１－５５．Ｃｈｅｎ，Ｊ．，Ｍ．Ｔｒｏｕｎｓｔｉｎｅ，Ｆ．Ｗ．Ａｌｔ，Ｆ．Ｙｏｕｎｇ，Ｃ．Ｋｕｒａｈａｒａ，Ｊ．Ｌｏｒｉｎｇ，Ｄ．Ｈｕｓｚａｒ．“Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｇｅｎｅ ｒｅａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔ ｉｎ Ｂ－ｃｅｌｌ ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ ｍｉｃｅ ｇｅｎｅｒａｔｅｄ ｂｙ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｅｌｅｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＪＨ ｌｏｃｕｓ．”Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５（１９９３）：６４７－６５６，Ｃｈｏｉ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４：１１７－２３，Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５－５１，Ｈａｒｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ａｎｎａｌｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－５９，Ｌｏｎｂｅｒｇ，１９９４，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ Ｈｕ

man Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology 113：49－101，Lonberg et al.，1995，Internal Review of Immunology 13：65－93，Neuberger，1996，Nature Biotechnology 14：826，Taylor et al.，1992，Nucleic Acids Research 20：6287－95，Taylor et al.，1994，International Immunology 6：579－91，Tomizuka et al.，1997，Nature Genetics 16：133－43，Tomizuka et al.，2000，Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97：722－27，Tuaillon et al.，1993，Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90：3720－24，及びTuaillon et al.，1994，Journal of Immunology 152：2912－20.；Lonberg et al.，Nature 368：856，1994；Taylor et al.，Int.Immun.6：579，1994；米国特許第５，８７７，３９７号明細書；Bruggemann et al.，1997 Curr.Opin.Biotechnol.8：455－58；Jakobovits et al.，1995 Ann.N.Y.Acad.Sci.764：525－35に記載されている。加えて、XenoMouse（登録商標）（Abgenix、現在はAmgen，Inc.）を含むプロトコールは、例えば、米国特許出願第０５／０１１８６４３号明細書、及び国際公開第０５／６９４８７９号パンフレット、国際公開第９８／２４８３８号パンフレット、国際公開第００／７６３１０号パンフレット、及び米国特許第７，０６４，２４４号明細書に記載されている。

【０１１２】

例えば、ハイブリドーマを生成するために、免疫化したトランスジェニックマウス由来のリンパ系細胞を骨髄腫細胞と融合させる。ハイブリドーマを生成する融合手順において使用するための骨髄腫細胞は、好ましくは非抗体産生細胞であり、高い融合効率を有し、且つ所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する、特定の選択培地での増殖を不可能にする酵素欠損を有する。そのような融合に使用するのに好適な細胞株の例としては、Ｓｐ－２０、Ｐ３－Ｘ６３／Ａｇ８、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳ１／１．Ａｇ４ １、Ｓｐ２１０－Ａｇ１４、ＦＯ、ＮＳＯ／Ｕ、ＭＰＣ－１１、ＭＰＣ１１－Ｘ４５－ＧＴＧ１．７及びＳ１９４／５ＸＸＯ Ｂｕｌが挙げられ、ラット融合において使用される細胞株の例としては、Ｒ２１０．ＲＣＹ３、Ｙ３－Ａｇ１．２．３、ＩＲ９８３Ｆ及び４Ｂ２１０が挙げられる。細胞融合に有用な他の細胞株は、Ｕ－２６６、ＧＭ１５００－ＧＲＧ２、ＬＩＣＲ－ＬＯＮ－ＨＭｙ２及びＵＣ７２９－６である。

【０１１３】

リンパ系（例えば、脾臓）細胞及び骨髄腫細胞をポリエチレングリコール又は非イオン性界面活性剤などの膜融合促進剤と数分間混合し、続いてハイブリドーマ細胞の増殖を支持するが、ただし骨髄腫細胞を融合しない選択培地に低密度で蒔いてもよい。選択培地の１つに、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）がある。十分な時間、通常は約１～２週間後に細胞のコロニーが観察される。単一のコロニーを単離し、当該技術分野において公知であり、本明細書に記載の様々なイムノアッセイのうちの任意の１つを使用して、細胞によって産生された抗体を、所望の標的に対する結合活性について試験してもよい。ハイブリドーマをクローニングし（例えば、限界希釈クローニング又は軟寒天プラーク単離によって）、所望の標的に特異的な分子を産生する陽性クローンを選択して培養する。ハイブリドーマ培養液に由来する結合分子を、ハイブリドーマ培養液の上清から単離してもよい。従って、本発明は、細胞の染色体において本発明の結合構築物をコードするポリヌクレオチドを含むハイブリドーマを提供するものである。これらのハイブリドーマは、本明細書に記載され、当該技術分野において公知の方法に従って培養することができる。

【０１１４】
本発明の二重特異性結合分子を生成するのに有用なヒト抗体を生成するための別の方法には、ヒト末梢血細胞をＥＢＶ形質転換によって不死化することが含まれる。例えば、米国特許第４，４６４，４５６号明細書を参照されたい。所望の標的に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する、そのように不死化したＢ細胞株（又はリンパ芽球様細胞株）は、本明細書で提供されるような免疫検出法、例えば、ＥＬＩＳＡによって同定することができ、続いて標準的なクローニング技術によって単離することができる。抗体を産生するリンパ芽球様細胞株の安定性は、当該技術分野において公知の方法に従って（例えば、Ｇｌａｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ ８：３７７－８９（１９８９）を参照されたい）、形質転換細胞をマウス骨髄腫と融合させてマウス－ヒトハイブリッド細胞株を生成することによって向上させることができる。ヒトモノクローナル抗体を生成するための更なる別の方法には、ヒト脾臓のＢ細胞を抗原でプライミングし、その後プライミングしたＢ細胞をヘテロハイブリッドの融合パートナーと融合させることを含むインビトロ免疫化がある。例えば、Ｂｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：８６－９５を参照されたい。

【０１１５】
特定の実施形態では、所望の抗体を産生するＢ細胞を選択し、当該技術分野において公知の分子生物学的手法（国際公開第９２／０２５５１号パンフレット；米国特許第５，６２７，０５２号明細書；Ｂａｂｃｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：７８４３－４８（１９９６））及び本明細書に記載の手法に従って、このＢ細胞から軽鎖及び重鎖可変領域をクローニングする。所望の抗体を産生する細胞を選択することによって、免疫化した動物由来のＢ細胞を脾臓、リンパ節、又は末梢血試料から単離してもよい。Ｂ細胞はまた、ヒトの、例えば末梢血試料から単離してもよい。所望の特異性を有する抗体を産生する単一のＢ細胞を検出するための方法は当該技術分野においてよく知られており、例えば、プラーク形成、蛍光活性化細胞選別、インビトロ刺激後の特異的抗体の検出などによるものがある。特異的抗体を産生するＢ細胞を選択するための方法としては、例えば、抗原を含む軟寒天中でＢ細胞の単一の細胞懸濁液を調製することが含まれる。Ｂ細胞によって産生される特異的抗体が抗原に結合すると複合体の形成が生じるが、この複合体は免疫沈降物として目に見える場合がある。所望の抗体を産生するＢ細胞を選択した後に、ＤＮＡ又はｍＲＮＡを単離及び増幅することによって特異的抗体遺伝子をクローニングしてもよく、これを使用して当該技術分野において公知であり、本明細書に記載の方法に従って本発明の二重特異性結合構築物を生成してもよい。

【０１１６】
本発明の二重特異性結合構築物を生成するのに有用な抗体を得るための更なる方法には、ファージディスプレイによるものがある。例えば、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：４３３－５５；Ｂｕｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４ Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５７：１９１－２８０を参照されたい。ヒト又はマウス免疫グロブリン可変領域遺伝子のコンビナトリアルライブラリーをファージベクター内で生成してもよく、これによってＴＧＦ－β結合タンパク質又はその変異体若しくはフラグメントに特異的に結合するＩｇフラグメント（Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓＦｖ、又はそれらの多量体）をスクリーニングして選択することができる。例えば、米国特許第５，２２３，４０９号明細書；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９８９ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－８１；Ｓａｓｔｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５７２８－３２（１９８９）；Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：１－９（１９９０）；Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：４３６３－６６；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，１９９２ Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１－３８８；Ｓｃｈｌｅｂｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９７ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ １６：４７－５２及びその中で引用された文献を参照されたい。例えば、Ｉｇ可変領域フラグメントをコードする複数のポリヌクレオチド配列を含むファージ

を、ファージコートタンパク質をコードする配列とインフレームでＭ１３又はその変異体などの糸状バクテリオファージのゲノムに挿入してもよい。融合タンパク質は、コートタンパク質と軽鎖可変領域ドメイン及び／又は重鎖可変領域ドメインとの融合体であってよい。特定の実施形態によれば、免疫グロブリンＦａｂフラグメントをファージ粒子上にディスプレイすることもできる（例えば、米国特許第５，６９８，４２６号明細書を参照されたい）。

【０１１７】

重鎖及び軽鎖免疫グロブリンｃＤＮＡ発現ライブラリーは、λファージ、例えばλＩｍｍｕｎｏＺａｐ（商標）（Ｈ）及びλＩｍｍｕｎｏＺａｐ（商標）（Ｌ）ベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）でも調製することができる。要約すると、ｍＲＮＡをＢ細胞集団から単離し、これを使用して、λＩｍｍｕｎｏＺａｐ（Ｈ）及びλＩｍｍｕｎｏＺａｐ（Ｌ）ベクター内に重鎖及び軽鎖免疫グロブリンｃＤＮＡ発現ライブラリーを生成する。これらのベクターを個別にスクリーニングするか、又は共発現させて、Ｆａｂフラグメント又は抗体を形成してもよい（Ｈｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．、前掲を参照されたい；また、Ｓａｓｔｒｙ　ｅｔ　ａｌ．、前掲も参照されたい）。その後、陽性プラークを非溶解性のプラスミドに転換させてもよく、これによって大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）由来のモノクローナル抗体フラグメントを高レベルで発現させることができる。

【０１１８】

一実施形態では、ハイブリドーマにおいて、ヌクレオチドプライマーを使用して目的のモノクローナル抗体を発現する遺伝子の可変領域を増幅する。これらのプライマーは、当業者によって合成されてもよく、又は市販の供給源から購入してもよい。（例えば、特に、ＶＨａ、ＶＨｂ、ＶＨｃ、ＶＨｄ、ＣＨ１、ＶＬ及びＣＬ領域のプライマーを含むマウス及びヒト可変領域のプライマーを販売するＳｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）を参照されたい。）。これらのプライマーを使用して重鎖又は軽鎖可変領域を増幅してもよく、続いてこれをＩｍｍｕｎｏＺＡＰ（商標）Ｈ又はＩｍｍｕｎｏＺＡＰ（商標）Ｌ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）などのベクターにそれぞれ挿入してもよい。続いて、これらのベクターを発現用の大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、酵母菌、又は哺乳類ベースの系に導入してもよい。これらの方法を使用して、ＶＨドメインとＶＬドメインとの融合体を含む、大量の単鎖タンパク質を産生することができる（Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６，１９８８を参照されたい）。

【０１１９】

特定の実施形態では、本発明の結合構築物は、「重鎖のみ」の抗体、即ち「ＨＣＡｂ」を産生するトランスジェニック動物（例えば、マウス）から得てもよい。ＨＣＡｂは、天然に存在するラクダ及びラマの単鎖ＶＨＨ抗体に類似するものである。例えば、米国特許第８，５０７，７４８号明細書及び同第８，５０２，０１４号明細書、並びに米国特許出願公開第２００９／０２８５８０５Ａ１号明細書、米国特許出願公開第２００９／０１６９５４８Ａ１号明細書、米国特許出願公開第２００９／０３０７７８７Ａ１号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０３１４５６３Ａ１号明細書、米国特許出願公開第２０１２／０１５１６１０Ａ１号明細書、国際公開第２００８／１２２８８６Ａ２号パンフレット、及び国際公開第２００９／０１３６２０Ａ２号パンフレットを参照されたい。

【０１２０】

上述した免疫化技術及び他の技術のいずれかを使用して本発明による抗体を産生する細胞が得られたら、本明細書に記載されるような標準的な手順に従い、そこからＤＮＡ又はｍＲＮＡを単離及び増幅することによって特異的抗体遺伝子をクローニングしてもよく、続いてこれを使用して本発明の二重特異性構築物を生成してもよい。そこから産生された抗体を配列決定してもよく、ＣＤＲを同定し、ＣＤＲをコードするＤＮＡを前述の通りに操作して、本発明による他の二重特異性構築物を生成してもよい。

【０１２１】

抗体結合部位の中央にある相補性決定領域（ＣＤＲ）の分子進化は、親和性が増大した

抗体、例えば、Ｓｃｈｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：５５１に記載されるような抗体を単離するためにも使用されている。従って、そのような手法は本発明の結合構築物を調製するのに有用である。

【０１２２】

ヒト抗体、部分的なヒト抗体、又はヒト化抗体は多くの用途、特に本発明の用途に好適であるが、特定の用途には他の種類の結合構築物が好適となる。これらの非ヒト抗体は、例えば、任意の抗体産生動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバ、又はヒト以外の霊長類（例えば、カニクイザル又はアカゲザル）又は類人猿（例えば、チンパンジー）などのサル由来のものであってよい。例えば、その種の動物を所望の免疫原によって免疫化することによって、又はその種の抗体を生成するための人工的な系（例えば、特定の種の抗体を生成するための細菌又はファージディスプレイに基づく系）を使用することによって、又は、例えば、抗体の定常領域を他の種に由来する定常領域で置き換えるか、若しくは他の種由来の抗体の配列に更に酷似するように抗体の１つ以上のアミノ酸残基を置換することにより、１つの種に由来する抗体を別の種に由来する抗体に転換することによって、特定の種由来の抗体を生成することができる。一実施形態では、抗体は、２つ以上の異なる種由来の抗体に由来するアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。続いて、所望の結合領域配列を使用して、本発明の二重特異性結合構築物を生成することができる。

【０１２３】

上述したＣＤＲのうちの１つ以上を含有する、本発明による結合構築物の親和性を向上させることが望まれる場合、ＣＤＲの維持（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５４，３９２－４０３，１９９５）、鎖シャフリング法（Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０，７７９－７８３，１９９２）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の変異株の使用（Ｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５０，３５０－３６８，１９９６）、ＤＮＡシャフリング法（Ｐａｔｔｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，８，７２４－７３３、１９９７）、ファージディスプレイ法（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５６，７－８８，１９９６）、及び更なるＰＣＲ技術（Ｃｒａｍｅｒｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３９１，２８８－２９１，１９９８）を含む、多数の親和性成熟プロトコールによって達成することができる。これらの親和性成熟方法の全ては、Ｖａｕｇｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１６，５３５－５３９，１９９８）に述べられている。

【０１２４】

特定の実施形態では、本発明のＨＨＬＬ二重特異性結合構築物を生成するために、まず、アミノ酸架橋（短いペプチドリンカー）を介して重鎖及び軽鎖可変ドメイン（Ｆｖ領域）フラグメントを連結することによって形成され得る、より典型的な単鎖抗体を生成して、単鎖ポリペプチドを生じさせることが望ましい場合がある。そのような単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）は、２つの可変ドメインポリペプチド（ＶＬ及びＶＨ）をコードするＤＮＡ間のペプチドリンカーをコードするＤＮＡを融合することによって調製される。得られたポリペプチドは、それら自体で再度折り畳まれ、２つの可変ドメインの間の可動性リンカーの長さに応じて、抗原結合性の単量体を形成することができるか、又は多量体（例えば、二量体、三量体、又は四量体）を形成することができる（Ｋｏｒｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．１０：４２３；Ｋｏｒｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｂｉｏｍｏｌ．Ｅｎｇ．１８：９５－１０８）。単鎖抗体を生成するために開発された手法としては、米国特許第４，９４６，７７８号明細書；Ｂｉｒｄ，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３；Ｈｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９；Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５４４，ｄｅ　Ｇｒａａｆ　ｅｔ　ａｌ．，２００２，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．１７８：３７９－８７に記載されるものが挙げられる。これらの単鎖抗体は、本発明の二重特異性結合構築物とは区別され、また異なるものである。

【０１２５】

抗体由来の抗原結合性フラグメントは、従来の方法に従って、例えば抗体をタンパク質分解性の加水分解によって、例えば全抗体をペプシン又はパパイン消化することによって得ることもできる。例として、抗体をペプシンによって酵素的開裂させることによって抗体フラグメントを生成し、Ｆ（ａｂ’）２と称される５Ｓフラグメントを提供することができる。チオール還元剤を使用してこのフラグメントを更に開裂し、３．５Ｓ　Ｆａｂ’一価フラグメントを生成することができる。任意選択により、ジスルフィド結合の開裂によって生じるスルフヒドリル基のブロック基を使用して、開裂反応を行うことができる。別の方法として、パパインを使用した酵素的開裂により、２つの一価ＦａｂフラグメントおよびＦｃフラグメントが直接生成される。これらの方法は、例えば、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ，米国特許第４，３３１，６４７号明細書，Ｎｉｓｏｎｏｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．８９：２３０，１９６０；Ｐｏｒｔｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．７３：１１９，１９５９；Ｅｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｉｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１：４２２（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　１９６７）；及びｂｙ　Ａｎｄｒｅｗｓ，Ｓ．Ｍ．ａｎｄ　Ｔｉｔｕｓ，Ｊ．Ａ．ｉｎ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｃｏｌｉｇａｎ　Ｊ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ），Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（２００３），ｐａｇｅ　２．８．１－２．８．１０　ａｎｄ　２．１０Ａ．１－２．１０Ａ．５に記載されている。一価重鎖－軽鎖フラグメント（Ｆｄ）を形成するために重鎖を分離したり、フラグメントを更に開裂させたり、又は他の酵素的手法、化学的手法、若しくは遺伝子手法などの、抗体を開裂させるための他の方法もまた、インタクト抗体に認識される抗原にフラグメントが結合する限りにおいて使用してもよい。

【０１２６】

特定の実施形態では、二重特異性結合構築物は、抗体の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。ＣＤＲは、目的のＣＤＲをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得ることができる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば、抗体産生細胞のｍＲＮＡを鋳型として使用して可変領域を合成するために、ポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される（例えば、Ｌａｒｒｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ａ　Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２：１０６，１９９１；Ｃｏｕｒｔｅｎａｙ－Ｌｕｃｋ，“Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，”ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｒｉｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．），ｐａｇｅ　１６６（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ　１９９５）；及びＷａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，”ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｂｉｒｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，（ｅｄｓ．），ｐａｇｅ　１３７（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９９５）を参照されたい）。抗体フラグメントは更に、本明細書に記載の抗体の少なくとも１つの可変領域ドメインを含んでもよい。従って、例えば、Ｖ領域ドメインは単量体及びＶＨ又はＶＬドメインであってよく、これらは、本明細書で記載されるように少なくとも10^{-7}Ｍ以下に相当する親和性で所望の標的（例えば、ヒトＣＤ３）に独立して結合することができる。

【０１２７】

可変領域は、任意の天然に存在する可変ドメインであってもよく、又はその改変されたバージョンであってもよい。改変されたバージョンとは、組換えＤＮＡ改変技術を使用して生成されている可変領域を意味する。そのような改変されたバージョンとしては、例えば、特異的抗体のアミノ酸配列内における挿入、欠失、若しくは変更、又は特定の抗体のアミノ酸配列への挿入、欠失、若しくは変更による、特異的抗体の可変領域から生成されるようなものが挙げられる。当業者であれば、改変に好適なアミノ酸残基を特定するために、任意の公知の方法を使用することができる。更なる例としては、少なくとも１つのＣ

ＤＲ、並びに任意選択により第１の抗体由来の１つ以上のフレームワークのアミノ酸、及び第２の抗体由来の可変領域ドメインの残部を含む、改変された可変領域が挙げられる。抗体可変ドメインの改変されたバージョンは、当業者が精通しているであろう多くの手法によって生成してもよい。

【０１２８】

可変領域は、Ｃ末端アミノ酸において少なくとも１つの他の抗体ドメイン又はこれらのフラグメントに共有結合されていてもよい。従って、例えば、可変領域に存在するＶＨが免疫グロブリンのＣＨ１ドメインに連結されていてもよい。同様に、ＶＬドメインがＣＫドメインに連結されていてもよい。このように、例えば、抗体は、抗原結合ドメインがＶＨドメイン及びＶＬドメインのＣ末端でそれぞれＣＨ１及びＣＫドメインに共有結合した、会合したＶＨドメイン及びＶＬドメインを含有するＦａｂフラグメントであってよい。ＣＨ１ドメインを更なるアミノ酸で伸長し、例えば、Ｆａｂ’フラグメントに見られるようなヒンジ領域又はヒンジ領域ドメインの一部を提供してもよく、又は抗体のＣＨ２及びＣＨ３ドメインなどの更なるドメインを提供してもよい。

【０１２９】

結合特異性

抗体又は二重特異性結合構築物は、10^{-7}Ｍ以下の値の平衡解離定数（ＫＤ、又は下記に定義するようにＫＤに相当するもの）によって求められるような高い結合親和性を有する抗原に結合する場合に、抗原に「特異的に結合する」。

【０１３０】

親和性は、当該技術分野において公知の様々な手法、例えば、これらに限定されないが、平衡法（例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）；ＫｉｎＥｘＡ，Ｒａｔｈａｎａｓｗａｍｉ ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｖｏｌ．３７３：５２－６０，２００８；又はラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ））、又は表面プラズモン共鳴アッセイ、又は他の動態学をベースとしたアッセイの機構（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析若しくはＯｃｔｅｔ（登録商標）分析（ｆｏｒｔｅＢＩＯ））、並びに間接的な結合アッセイ、競合的結合アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、ゲル電気泳動、及びクロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー）などの他の方法を用いて測定することができる。これら及び他の方法では、検査する構成成分の１つ以上に標識を使用してもよく、及び／又は発色性標識、蛍光標識、発光標識、又は同位体標識が挙げられるが、これらに限定されない様々な検出法を使用してもよい。結合親和性及び動態についての詳細な説明は、抗体と免疫原の相互作用に焦点を当てたＰａｕｌ，Ｗ．Ｅ．，ｅｄ．，Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４ｔｈ Ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（１９９９）に見出すことができる。競合的結合アッセイの一例には、非標識抗原の量を増加させた状態で標識抗原を目的の抗体とインキュベートし、標識抗原と結合した抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイがある。特定の抗原に対する目的の抗体の親和性及び結合解離率は、スキャッチャードプロット分析によるデータから求めることができる。第２の抗体との競合はラジオイムノアッセイを用いて求めることもできる。この場合、非標識の第２の抗体の量を増加させた状態で、抗原を標識化合物にコンジュゲートした目的の抗体とインキュベートする。このタイプのアッセイは、本発明の二重特異性結合構築物と共に使用するように容易に適合させることができる。

【０１３１】

本発明の更なる実施形態は、10^{-7}Ｍ未満、又は10^{-8}Ｍ未満、又は10^{-9}Ｍ未満、又は10^{-10}Ｍ未満、又は10^{-11}Ｍ未満、又は10^{-12}Ｍ未満、又は10^{-13}Ｍ未満、又は5×10^{-13}Ｍ未満（値が低いほどより高い結合親和性を示す）の平衡解離定数、即ちＫＤ（ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）で所望の標的と結合する、二重特異性結合構築物を提供するものである。なお、本発明の更なる実施形態は、約10^{-7}Ｍ未満、又は約10^{-8}Ｍ未満、又は約10^{-9}Ｍ未満、又は約10^{-10}Ｍ未満、又は約10^{-11}Ｍ未満、又は約10^{-12}Ｍ未満、又は約10^{-13}Ｍ未満、又は約5×10^{-13}Ｍ未満の平衡解離定

数、即ちＫＤ（ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）で所望の標的と結合する二重特異性結合構築物である。

【０１３２】

更に別の実施形態では、所望の標的に結合する二重特異性結合構築物は、約１０$^{-7}$Ｍ～約１０$^{-8}$Ｍ、約１０$^{-8}$Ｍ～約１０$^{-9}$Ｍ、約１０$^{-9}$Ｍ～約１０$^{-10}$Ｍ、約１０$^{-10}$Ｍ～約１０$^{-11}$Ｍ、約１０$^{-11}$Ｍ～約１０$^{-12}$Ｍ、約１０$^{-12}$Ｍ～約１０$^{-13}$Ｍの平衡解離定数、即ちＫＤ（ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を有する。更に別の実施形態では、本発明の二重特異性構築物は、１０$^{-7}$Ｍ～１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ～１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ～１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ～１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ～１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ～１０$^{-13}$Ｍの平衡解離定数、即ちＫＤ（ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を有する。

【０１３３】

分子安定性

特にバイオ医薬品の治療用分子の文脈において、分子安定性の様々な態様が望まれる場合がある。例えば、様々な温度における安定性（「熱安定性」）が望まれる場合がある。いくつかの実施形態では、この熱安定性には、生理的温度範囲、例えば約３７℃、又は３２℃～４２℃における安定性が包含され得る。他の実施形態では、この熱安定性には、より高い温度範囲、例えば、４２℃～６０℃における安定性が包含され得る。他の実施形態では、この熱安定性には、より低い温度範囲、例えば、２０℃～３２℃における安定性が包含され得る。更に他の実施形態では、この熱安定性には、冷凍状態、例えば、０℃以下の間における安定性が包含され得る。

【０１３４】

タンパク質分子の熱安定性を測定するためのアッセイは、当技術分野において公知である。例えば、熱勾配の間に内在性タンパク質蛍光及び静的光散乱（ＳＬＳ）データを同時に取得することが可能な、完全に自動化されたＵＮｃｌｅプラットフォーム（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ）が使用されており、更に実施例に記載されている。更に、示差走査蛍光定量法（ＤＳＦ）及び静的光散乱（ＳＬＳ）などの実施例において本明細書に記載の熱安定性及び凝集アッセイを使用して、熱融解（Ｔｍ）及び熱凝集（Ｔａｇｇ）の両方をそれぞれ測定することもできる。

【０１３５】

或いは、実施例において本明細書で記載されるように、この分子に促進応力試験を実行することができる。要約すると、この試験は、特定の温度（例えば、４０℃）でタンパク質分子をインキュベートし、続いてサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって様々な時点で凝集を測定することを伴うものであり、この場合、凝集レベルが低いほど、より良好なタンパク質の安定性を示している。

【０１３６】

或いは、以下のように分子が凝集する温度の観点から、熱安定性パラメータを決定することができる：濃度２５０μｇ／ｍｌの分子溶液を単回使用のキュベットに移し、動的光散乱（ＤＬＳ）装置内に置く。測定した半径を常時取得しながら、０．５℃／分の加熱速度で４０℃から７０℃に試料を加熱する。半径の増大はタンパク質の融解及び凝集を示し、これを用いて分子の凝集温度を算出する。

【０１３７】

或いは、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって融解温度曲線を測定し、結合構築物の固有の生物物理学的なタンパク質の安定性を測定することができる。これらの実験は、ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＬＬＣ（Ｎｏｒｔｈａｍｐｔｏｎ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ）ＶＰ－ＤＳＣ装置を使用して実行する。結合構築物を含有する試料のエネルギー取り込みを２０℃から９０℃まで記録して、製剤緩衝液のみを含有する試料と比較する。結合構築物を、例えば、ＳＥＣランニング緩衝液中２５０μｇ／ｍｌの最終濃度に調整する。それぞれの融解曲線を記録するために試料の全体温度を段階的に上昇させる。それぞれの温度Ｔにおける試料及び製剤緩衝液標準物質のエネルギー取り込みを記録する。試料から標準物質を差し引いたエネルギー取り込みＣｐ（ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ／℃）の差をそれぞれの温度に対してプロットする。融解温度は、エネルギー取り込みが最初に最大となる温度として定義される。

【０１３８】
更なる実施形態では、本発明による二重特異性結合構築物は、おおよその生理的ｐＨ、即ち約ｐＨ７．４で安定する。他の実施形態では、二重特異性結合構築物は、低いｐＨ、例えば、ｐＨ６．０までで安定する。他の実施形態では、二重特異性結合構築物は、高いｐＨ、例えば、最大ｐＨ９．０で安定する。一実施形態では、二重特異性結合構築物は、６．０～９．０のｐＨで安定する。別の実施形態では、二重特異性結合構築物は、６．０～８．０のｐＨで安定する。別の実施形態では、二重特異性結合構築物は、７．０～９．０のｐＨで安定する。
【０１３９】
特定の実施形態では、二重特異性結合構築物が非生理的ｐＨ（例えば、ｐＨ６．０）に対して耐性が高いほど、充填されたタンパク質の総量に対してイオン交換カラムから溶出される分子の回収率が高くなる。一実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧３０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧４０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧５０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧６０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧７０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧８０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧９０％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧９５％である。別の実施形態では、イオン（例えば、カチオン）交換カラムからの分子の回収率は≧９９％である。
【０１４０】
特定の実施形態では、分子の化学的安定性を測定することが望まれる場合がある。二重特異性結合構築物の化学的安定性の測定は、更に実施例において本明細書に記載されるような内在性タンパク質蛍光をモニタリングすることによる等温化学変性（「ＩＣＤ」）によって実行することができる。ＩＣＤによってＣ１／２及びΔＧが得られ、これらはタンパク質の安定性に対する優れた測定基準であり得る。Ｃ１／２はタンパク質の５０％を変性させるのに必要となる化学的変性剤の量であり、これを用いてΔＧ（即ちアンフォールディングエネルギー）を導出する。
【０１４１】
タンパク鎖のクリッピングは、生物学的製剤に関して注意深く観察され又は報告される、別の決定的な製品品質特性である。典型的には、長いリンカー、及び／又はそれほど構造化されていないリンカーは、インキュベーション時間及び温度に応じてクリッピングの増大が生じることが予想される。標的ドメイン又はＴ細胞結合ドメインを接続するリンカーへのクリッピングは、薬剤の効力及び有効性に最終的に有害な影響を与えるため、クリッピングは二重特異性結合構築物にとって重大な問題である。ｓｃＦｃを含む更なる部位へのクリッピングは、薬力学的／動態学的特性に影響を与える可能性がある。クリッピングの増大は医薬品において回避されなければならない特性である。従って、特定の実施形態では、タンパク質のクリッピングを実施例において本明細書で記載されるようにアッセイすることができる。
【０１４２】
免疫エフェクター細胞及びエフェクター細胞タンパク質
二重特異性結合構築物は、免疫エフェクター細胞（本明細書では「エフェクター細胞タンパク質」と称する）の表面に発現する分子、及び標的細胞の表面に発現する別の分子（本明細書では「標的細胞タンパク質」と称する）に結合することができる。免疫エフェクター細胞は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、又は好中球であってよい。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞タンパク質は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）－ＣＤ３複合体に含まれるタンパク質である。ＴＣＲ－ＣＤ３複合体は、ＴＣＲα及びＴＣＲβ、又はＴＣＲγ及びＴＣＲδ、加えてＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）鎖、ＣＤ３イプシロン（ＣＤ３ε

）鎖、ＣＤ３ガンマ（ＣＤ３γ）鎖、及びＣＤ３デルタ（ＣＤ３δ）鎖の中から様々なＣＤ３鎖からなるヘテロ二量体を含むヘテロ多量体である。

【０１４３】

ＣＤ３受容体複合体はタンパク質複合体であり、４つの鎖から構成されている。哺乳動物では、この複合体は、ＣＤ３γ（ガンマ）鎖、ＣＤ３δ（デルタ）鎖、及び２つのＣＤ３ε（イプシロン）鎖を含有する。これらの鎖は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）及びいわゆるζ（ゼータ）鎖と会合してＴ細胞受容体－ＣＤ３複合体を形成し、Ｔリンパ球において活性化シグナルを生成する。ＣＤ３γ（ガンマ）、ＣＤ３δ（デルタ）及びＣＤ３ε（イプシロン）鎖は、単一の細胞外免疫グロブリンドメインを含有する、非常に近縁の免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面タンパク質である。ＣＤ３分子の細胞内尾部は、ＴＣＲのシグナル伝達能に必須の免疫受容活性化チロシンモチーフ、即ち略してＩＴＡＭとして知られる単一の保存モチーフを含有する。ＣＤ３イプシロン分子は、ヒトの第１１染色体に存在するＣＤ３Ｅ遺伝子によってコードされるポリペプチドである。最も好ましいＣＤ３イプシロンのエピトープは、ヒトＣＤ３イプシロン細胞外ドメインのアミノ酸残基１～２７の範囲に含まれる。本発明による二重特異性結合構築物は、典型的且つ有利には、特定の免疫療法において望ましくない非特異的Ｔ細胞活性化をそれほど示さないということが想定される。このことは、言い換えれば副作用のリスクを低減するということになる。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞タンパク質は、多量体タンパク質の一部であってよいヒトＣＤ３イプシロン（ＣＤ３ε）鎖（その成熟したアミノ酸配列が配列番号４０に開示される）であってよい。或いは、エフェクター細胞タンパク質は、ヒト及び／又はカニクイザルのＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、ＣＤ３ベータ（ＣＤ３β）鎖、ＣＤ３ガンマ（ＣＤ３γ）鎖、ＣＤ３デルタ（ＣＤ３δ）鎖、又はＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）鎖であってよい。

【０１４５】

更に、いくつかの実施形態では、二重特異性結合構築物は、マウス、ラット、ウサギ、新世界ザル、及び／又は旧世界ザル種などの、非ヒト種由来のＣＤ３ε鎖に結合することもできる。そのような種としては、以下の哺乳類種が挙げられるが、これらに限定されない：ハツカネズミ（Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ）；クマネズミ（Ｒａｔｔｕｓ ｒａｔｔｕｓ）；ドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓ ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）；カニクイザル（Ｍａｃａｃａ ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）；マントヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｈａｍａｄｒｙａｓ）；ギニアヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｐａｐｉｏ）；アヌビスヒヒ（Ｐａｐｉｏ ａｎｕｂｉｓ）；キイロヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｃｙｎｏｃｅｐｈａｌｕｓ）；チャクマヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｕｒｓｉｎｕｓ）；マーモセット（Ｃａｌｌｉｔｈｒｉｘ ｊａｃｃｈｕｓ）；ワタボウシタマリン（Ｓａｇｕｉｎｕｓ Ｏｅｄｉｐｕｓ）；及びリスザル（Ｓａｉｍｉｒｉ ｓｃｉｕｒｅｕｓ）。カニクイザルのＣＤ３ε鎖の成熟したアミノ酸配列は配列番号４１に示される。ヒト、並びにマウス及びサルなどの前臨床試験に一般に使用される種において同等の活性を有する治療用分子は、薬剤開発を簡素化し、促進し、最終的に改善された成果をもたらすことができる。薬剤を市場に出すための長期で費用のかかるプロセスにおいては、このような利点は重要となり得る。

【０１４６】

特定の実施形態では、二重特異性結合構築物は、ヒトＣＤ３ε鎖又は異なる種由来のＣＤ３ε鎖であってよく、特に上記に列記した哺乳類種のうちの１つであってよいＣＤ３ε鎖（配列番号４３）の最初の２７個のアミノ酸内のエピトープに結合することができる。エピトープは、アミノ酸配列Ｇｌｎ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｇｌｕ（配列番号５９）を含有してもよい。このようなエピトープに結合する分子の利点は、その関連部分が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１０／０１８３６１５Ａ１号明細書に詳細に説明されている。抗体又は二重特異性結合構築物が結合するエピトープは、例えば、その関連部分が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１

０／０１８３６１５Ａ１号明細書に記載されているアラニンスキャニングによって決定することができる。他の実施形態では、二重特異性結合構築物は、ＣＤ３εの細胞外ドメイン（配列番号４２）内のエピトープに結合することができる。

【０１４７】

Ｔ細胞が免疫エフェクター細胞である実施形態では、二重特異性結合構築物が結合することのできるエフェクター細胞タンパク質としては、ＣＤ３ε鎖、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ鎖、ＣＤ３ζ鎖、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及びＴＣＲδが挙げられるがこれらに限定されない。ＮＫ細胞又は細胞障害性Ｔ細胞が免疫エフェクター細胞である実施形態では、例えば、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ３５２、ＮＫｐ４６、又はＣＤ１６ａがエフェクター細胞タンパク質であってよい。ＣＤ８＋Ｔ細胞が免疫エフェクター細胞である実施形態では、例えば、４－１ＢＢ又はＮＫＧ２Ｄがエフェクター細胞タンパク質であってよい。或いは、他の実施形態では、二重特異性結合構築物は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、又は好中球に発現する他のエフェクター細胞タンパク質に結合することができる。

【０１４８】

標的細胞及び標的細胞に発現する標的細胞タンパク質

上記で説明したように、二重特異性結合構築物は、エフェクター細胞タンパク質及び標的細胞タンパク質に結合することができる。標的細胞タンパク質は、例えば、癌細胞、病原体に感染した細胞、又は疾患、例えば炎症状態、自己免疫状態、及び／若しくは線維性状態を媒介する細胞の表面に発現することができる。いくつかの実施形態では、標的細胞タンパク質は標的細胞に高度に発現することができるが、高レベルの発現が必ずしも必要とされるわけではない。

【０１４９】

標的細胞が癌細胞である場合、本明細書で記載されるような二重特異性結合構築物は、上記で説明したように癌細胞抗原に結合することができる。癌細胞抗原は、ヒトタンパク質又は別の種由来のタンパク質であってよい。例えば、二重特異性結合構築物は、数ある中でも特にマウス、ラット、ウサギ、新世界ザル、及び／又は旧世界ザル種由来の標的細胞タンパク質に結合してもよい。そのような種としては、以下の種が挙げられるが、これらに限定されない：ハツカネズミ（Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ）；クマネズミ（Ｒａｔｔｕｓ ｒａｔｔｕｓ）；ドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓ ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）；カニクイザル（Ｍａｃａｃａ ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）；マントヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｈａｍａｄｒｙａｓ）；ギニアヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｐａｐｉｏ）；アヌビスヒヒ（Ｐａｐｉｏ ａｎｕｂｉｓ）；キイロヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｃｙｎｏｃｅｐｈａｌｕｓ）；チャクマヒヒ（Ｐａｐｉｏ ｕｒｓｉｎｕｓ）；マーモセット（Ｃａｌｌｉｔｈｒｉｘ ｊａｃｃｈｕｓ）、ワタボウシタマリン（Ｓａｇｕｉｎｕｓ Ｏｅｄｉｐｕｓ）、及びリスザル（Ｓａｉｍｉｒｉ ｓｃｉｕｒｅｕｓ）。

【０１５０】

いくつかの例では、標的細胞タンパク質は感染細胞に選択的に発現するタンパク質であってよい。例えば、ＨＢＶ又はＨＣＶ感染症の場合、標的細胞タンパク質は、感染細胞の表面に発現するＨＢＶ又はＨＣＶのエンベロープタンパク質であってよい。他の実施形態では、標的細胞タンパク質は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染細胞上のＨＩＶによってコードされるｇｐ１２０であってよい。

【０１５１】

他の態様では、標的細胞は、自己免疫疾患又は炎症性疾患を媒介する細胞であってよい。例えば、喘息におけるヒト好酸球が標的細胞であってよく、その場合には、例えばＥＧＦ様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体（ＥＭＲ１）が標的細胞タンパク質であってよい。或いは、全身性エリテマトーデス患者における過剰なヒトＢ細胞が標的細胞であってよく、その場合には、例えばＣＤ１９又はＣＤ２０が標的細胞タンパク質であってよい。他の自己免疫状態では、過剰なヒトＴｈ２　Ｔ細胞が標的細胞であってよく、その場合には、例えばＣＣＲ４が標的細胞タンパク質であってよい。同様に、標的細胞は、アテローム性動脈硬化症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、硬変症、強皮症、腎移植線維症、腎

臓同種移植腎症、若しくは特発性肺線維症及び／又は特発性肺高血圧症を含む肺線維症などの疾患を媒介する線維性細胞であってよい。そのような線維性状態の場合、例えば、線維芽細胞活性化タンパク質α（ＦＡＰα）が標的細胞タンパク質であってよい。

【０１５２】

治療方法及び治療用組成物

二重特異性結合構築物を使用して、例えば、様々な形態の癌、感染症、自己免疫状態若しくは炎症状態、及び／又は線維性状態を含む多種多様な状態を治療することができる。

【０１５３】

従って、一実施形態では、疾患を予防、治療、又は緩和するのに使用される二重特異性結合構築物が、本明細書で提供される。

【０１５４】

別の実施形態では、疾患を予防、治療又は緩和するための医薬の製造における本発明の結合構築物の（又は本発明のプロセスに従って生成される結合構築物の）使用を提供する。

【０１５５】

二重特異性結合構築物を含む薬学的組成物が、本明細書で提供される。これらの薬学的組成物は、治療上有効な量の二重特異性結合構築物と、生理学的に許容可能なキャリア、賦形剤、又は希釈剤などの１つ以上の追加の成分とを含む。いくつかの実施形態では、これらの追加の成分としては、多くの可能性の中でも特に、緩衝液、炭水化物、ポリオール、アミノ酸、キレート剤、安定剤、及び／又は防腐剤を挙げることができる。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、時に、癌細胞が新しい領域に侵襲する、即ち転移することを可能にする隣接組織の破壊と新生血管の成長とを伴う、調節されない及び／又は不適切な細胞の増殖に関与する癌を含む細胞増殖性疾患を治療するために、二重特異性結合構築物を使用することができる。二重特異性結合構築物によって治療することができる状態には、結腸直腸ポリープ、脳虚血、総嚢胞性疾患、多発性嚢胞腎疾患、良性前立腺肥大症、及び子宮内膜症を含む不適切な細胞増殖に関与する非悪性状態が含まれる。二重特異性結合構築物を使用して、血液悪性腫瘍又は固形腫瘍悪性病変を治療することができる。より具体的には、二重特異性結合構築物を使用して治療することができる細胞増殖性疾患は、例えば、中皮腫、扁平上皮癌、骨髄腫、骨肉腫、神経膠芽腫、膠腫、癌腫、腺癌、黒色腫、肉腫、急性及び慢性白血病、リンパ腫、及び髄膜腫、ホジキン病、セザリー症候群、多発性骨髄腫、及び肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、頭頸部癌、膀胱癌、卵巣癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸部癌、膣癌、胃癌、腎細胞癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、及び食道癌、肝胆道癌、骨癌、皮膚癌、及び血液癌、並びに鼻腔及び副鼻腔、鼻咽腔、口腔、中咽頭、喉頭、下喉頭、唾液腺、縦隔、胃、小腸、結腸、直腸及び肛門部、尿管、尿道、陰茎、精巣、外陰、内分泌系、中枢神経系、及び形質細胞の癌を含む癌である。

【０１５７】

癌療法のための手引き書を提供するテキストには、Ｃａｎｃｅｒ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，４ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＤｅＶｉｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄｓ．Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ（１９９３）がある。癌の特定の種類及び患者の全身状態などの他の要因に従って、関連する分野で認識されているような適切な治療手段を選択する。癌患者を治療する際に、他の抗悪性腫瘍剤を使用する治療レジメンに二重特異性結合構築物を追加することができる。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、例えば、化学療法剤、非化学療法の抗悪性腫瘍剤、及び／又は放射線などの癌の治療に広く使用されている様々な薬剤及び治療と同時に、その前又はその後に、二重特異性結合構築物を投与することができる。例えば、本明細書に記載の任意の治療の前、その間、及び／又はその後に、化学療法及び／又は放射線を行うことができる。化学療法剤の例は上記に記載されており、シスプラチン、タキソール、エトポシド

、ミトキサントロン（Ｎｏｖａｎｔｒｏｎｅ（登録商標））、アクチノマイシンＤ、シクロヘキシミド、カンプトテシン（又はこれらの水溶性誘導体）、メトトレキサート、マイトマイシン（例えば、マイトマイシンＣ）、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、抗悪性腫瘍性抗生物質、例えばアドリアマイシン（ドキソルビシン）及びダウノマイシン、並びに前述の全ての化学療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５９】

感染症疾患、数ある中でも特に、例えば慢性Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染症、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染症、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）感染症、又はサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）感染症を治療するために、二重特異性結合構築物を使用することもできる。

【０１６０】

二重特異性結合構築物は、特定の細胞型を減少させるのに有用である場合、他の種類の状態における更なる使用を見出すことができる。例えば、喘息におけるヒト好酸球、全身性エリテマトーデスにおける過剰なヒトＢ細胞、自己免疫状態における過剰なヒトＴｈ２Ｔ細胞、又は感染症疾患における病原体感染細胞を減少させることが有益となり得る。線維性状態では、線維性組織を形成する細胞を減少させるのに有益となり得る。

【０１６１】

治療上有効な投与量の二重特異性結合構築物を投与することができる。治療上の用量を構成する二重特異性結合構築物の量は、治療される指標、患者の体重、算出した患者の皮膚表面領域によって異なっていてもよい。望ましい効果を得るために、二重特異性結合構築物の投与量を調節することができる。多くの場合、反復投与が必要とされ得る。

【０１６２】

二重特異性結合構築物、又はそのような分子を含有する薬学的組成物を、実現可能な任意の方法によって投与することができる。ある特別な処方又はそのような特別な状況でない場合、経口投与では胃の酸性環境内でタンパク質の加水分解が生じてしまうため、タンパク質治療薬は通常、非経口経路、例えば注射によって投与される。可能な投与経路としては、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、動脈内注射、病巣内注射、又は腹膜ボーラス注射がある。二重特異性結合構築物は、注入、例えば静脈内注入又は皮下注入によって投与することもできる。特に皮膚に関わる疾患に対しては、局所投与も可能である。或いは、粘膜と接触させることによって、例えば、鼻腔内投与、舌下投与、膣内投与、又は直腸投与又は吸入薬としての投与によって、二重特異性結合構築物を投与することができる。或いは、二重特異性結合構築物を含む特定の適切な薬学的組成物を経口投与することができる。

【０１６３】

「治療」という用語には、少なくとも１つの症状又は他の障害の具現化の緩和、又は疾患重症度を低減させることなどが包含される。本発明による二重特異性結合構築物は、実行可能な治療薬を構成するために、完全治癒又はあらゆる疾患の症状又は発現の根絶をもたらす必要はない。関連分野で認識されているように、治療薬として使用される薬物は、所与の病状の重症度を減少させることができるが、有用な治療薬とみなされるために、疾患のあらゆる発現を消失させる必要はない。単に、疾患の影響を減少させることで（例えば、その症状の数又は重症度を減少させることによって、又は別の治療の有効性を増大させることによって、又は別の有益な効果を生じさせることによって）、又は疾患が対象において発症するか又は悪化する可能性を減少させることで十分である。本発明の一実施形態は、特定の障害の重症度を反映する指標がベースラインを超える持続的改善を誘導するのに十分な量及び時間で、患者に本発明の二重特異性結合構築物を投与することを含む方法に関する。

【０１６４】

「防止」という用語には、少なくとも１つの症状又は他の障害の具現化などを防止することが包含される。本発明による二重特異性結合構築物を組み込んだ予防的に施される治療は、実行可能な予防剤を構成するために、状態の発症を予防するのに完全に有効である

必要はない。単に、疾患が対象において発症するか又は悪化する可能性を減少させることで十分である。

【０１６５】

関連分野において理解されているように、二重特異性結合構築物を含む薬学的組成物は、指標及び組成物に適切な方法で対象に投与される。非経口投与、局所投与、又は吸入による投与が含まれるが、これらに限定されない任意の好適な手法によって、薬学的組成物を投与してもよい。注射の場合、例えば、関節内、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内若しくは皮下経路を介して、ボーラス注射によって、又は持続注入によって薬学的組成物を投与することができる。吸入による送達には、例えば、経鼻又は経口吸入、ネブライザーの使用、結合構築物をエアロゾル形態で吸入することなどが挙げられる。他の代替手段としては、丸薬、シロップ剤、又はドロップを含む経口剤が挙げられる。

【０１６６】

生理学的に許容可能なキャリア、賦形剤、又は希釈剤などの１つ以上の追加の成分を含む組成物の形態で、二重特異性結合構築物を投与することができる。任意選択により、組成物は１つ以上の生理学的活性剤を更に含む。様々な特定の実施形態では、組成物は、１つ以上の二重特異性結合構築物に加えて、１、２、３、４、５、又は６つの生理学的活性剤を含む。

【０１６７】

本明細書で述べられる状態のいずれかを治療するのに使用される、１つ以上の二重特異性結合構築物及びラベル又は他の説明書を含む、医師が使用するためのキットが提供される。一実施形態では、キットは、本明細書に開示されるような組成物の形態であってよく、１つ以上のバイアル内に入っていてもよい、１つ以上の二重特異性結合構築物の無菌製剤を含む。

【０１６８】

投与量及び投与頻度は、投与経路、使用される特定の二重特異性結合構築物、治療される疾患の性質及び重症度、状態が急性なのか又は慢性なのか、及び対象の身長及び全身状態などの要因によって異なっていてもよい。

【０１６９】

上記で一般的な用語で本発明を説明してきたため、限定するものではなく実例として以下の実施例を提供する。

【実施例】

【０１７０】

実施例１

二重特異性ＨＨＬＬ結合構築物の生成及び発現

提示されたＨＨＬＬ構成によって向上した安定性が生じるどうかを評価するために、Ｆｌｔ３、Ｍｓｌｎ、及びＤｌｌ３をそれぞれ標的化するＢｉＴＥのパネルを設計し、これを発現させて精製した。これらには、標準型、即ち野生型（ＷＴ）のＨＬＥ－ＢｉＴＥ（ＨＬＥ＝半減期が延長された）が含まれており、提示されたＨＨＬＬ　ＢｉＴＥ構造の３つの異なるリンカー長の構成は、タイト、ミディアム、ルーズである。

【０１７１】

ＨＬＥ－ＢｉＴＥを含む様々な鎖を接続するために、ＧｌｙＧｌｙＧｌｙＧｌｙＳｅｒ（Ｇ４Ｓ）（配列番号１）のリピートのリンカーを使用した。ＷＴのＨＬＥ－ＢｉＴＥでは、標的ドメインの重鎖及び軽鎖（Ｈ１及びＬ１）を３つのＧ４Ｓリピート（配列番号３）で接続した。抗ＣＤ３ドメインもまた重鎖及び軽鎖のペア（Ｈ２及びＬ２）を含み、３つのＧ４Ｓリピート（配列番号３）で接続した。抗標的ドメインと抗ＣＤ３　ｓｃＦｖドメインを接続するためには、単一のＧ４Ｓリンカー（配列番号１）が必要であった。代替的に、これを以下の命名法で記述することができる：Ｈ１－（Ｇ４Ｓ）$_3$－Ｌ１－（Ｇ４Ｓ）$_1$－Ｈ２－（Ｇ４Ｓ）$_3$－Ｌ２。

【０１７２】

提示される「タイト」なＨＨＬＬ構成では、２つのＧ４Ｓリピート（配列番号２）がＨ

１をＨ２に接続し、続いて３つのＧ４Ｓリピート（配列番号３）がこのセグメントをＬ１鎖に接続している。Ｈ１Ｈ２Ｌ１をＬ２に接続し、分子モデリングによって求められるような適切な折り畳みを可能とするには、別の３つのＧ４Ｓリピート（配列番号３）が必要であった。この「タイト」な構成は、以下のように記述することもできる：Ｈ１－（Ｇ４Ｓ）２－Ｈ２－（Ｇ４Ｓ）３－Ｌ１（Ｇ４Ｓ）３－Ｌ２、又は省略して２３３。

【０１７３】

「ミディアム」な構成は、一連の４つのリピートのＧ４Ｓリンカー（配列番号４）によって様々な鎖（Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２）の全てを接続しており、以下のように記述することができる：Ｈ１－（Ｇ４Ｓ）４－Ｈ２－（Ｇ４Ｓ）４－Ｌ１（Ｇ４Ｓ）４－Ｌ２、又は略して４４４。

【０１７４】

「ルーズ」な構成は、一連の５つのリピートのＧ４Ｓリンカー（配列番号５）を使用しており、以下のように記述することができる：Ｈ１－（Ｇ４Ｓ）５－Ｈ２－（Ｇ４Ｓ）－Ｌ１（Ｇ４Ｓ）５－Ｌ２、又は略して５５５。

【０１７５】

プラスミド：

Ｎ末端にシグナルペプチドを有する、目的のＢｉＴＥ遺伝子を宿す発現プラスミドをｐＴＴ５ベクターにクローニングした。

【０１７６】

発現及び精製：

一過性に形質移入されたＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞を使用して、全てのＢｉＴＥタンパク質を生成した。要約すると、ＰＥＩ　ＭＡＸ形質移入試薬によって、Ｎ末端にシグナル分泌ペプチドを有するＢｉＴＥ標的配列をコードするプラスミドＤＮＡを、約９９．９％の生存率及び１．５ｅ６の細胞密度で細胞に導入した。タンパク質を過剰産生させるために、３７℃、５％のCO_2、１５０ＲＰＭで６日間細胞を維持した。続いて細胞を遠心分離によって採取し（４０００ＲＰＭで３０分間）、続いて得られた細胞の培地上清を濾過し、精製用に保存した。

【０１７７】

単鎖Ｆｃ（「ｓｃＦｃ」）で発現したＢｉＴＥを、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＨｉＴｒａｐ　ｍＡｂ　Ｓｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ）を使用して精製した。結合緩衝液（２５ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）中でプロテインＡ樹脂を平衡化し、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ３．６）を使用してタンパク質を溶出した。溶出緩衝液からＢｉＴＥを速やかに取り出すために、１０ｍＭのリン酸カリウム、７５ｍＭのリシン、４％のトレハロース（ｐＨ８．０）中で脱塩する工程（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＨｉＰｒｅｐ　２６／１０　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇ）を実行し、その後サイズ排除クロマトグラフィー（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＨｉＬｏａｄ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００）によって分離した。同様の方法で、プロテインＡの代わりにプロテインＬ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌ）を使用して、ｓｃＦｃを含まないＢｉＴＥを精製した。純度はＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認した。続いて、タンパク質を１ｍｇ／ｍｌの濃度で１０ｍＭのグルタミン酸、９％のスクロース、０．０１％のポリソルベート８０（ｐＨ４．２）に配合した。使用前にタンパク質を－８０℃で保存した。

【０１７８】

実施例２

分析用ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー

タンパク質凝集及び安定性を定量化するために、分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）と組み合わせていくつかの時間経過温度試験を完了した。分析を単純化するために、温度試験を問わず、同一のＳＥＣ方法を使用した。約２μｇの試料を、１００ｍＭのリン酸ナトリウム、２５０ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ６．８）中で平衡化したＳＥＣカラム（Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　ＢＥＨ　ＳＥＣ　２００Å）

に注入した。２８０ｎｍの吸光度データを収集し、Ｃｈｒｏｍｅｌｅｏｎを使用してピークを積分した。データをプロットし、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍで分析した。

【０１７９】

実施例３

還元型キャピラリー電気泳動

温度安定性アッセイにおいて低分子量（ＬＭＷ）の種の形成を検査するために、還元型キャピラリー電気泳動－ドデシル硫酸ナトリウム（ｒＣＥ－ＳＤＳ）分析を実施した。分析する前に、試料をＳＤＳ及び熱、並びにβ－メルカプトエタノールの存在によってそれぞれ変性させて還元した。続いて、約１０μｇの試料をＣＥカセットに充填し、ＵＶ検出によってタンパク質及びフラグメントをモニタリングした。純度は、Ｃｈｒｏｍｅｌｅｏｎを使用してピーク面積の割合を定量化することによって求めた。

【０１８０】

実施例４

化学的安定性

等温化学変性

ＢｉＴＥの化学的安定性の測定は、内在性タンパク質蛍光をモニタリングすることによる等温化学変性（「ＩＣＤ」）によって実行する。ＩＣＤによってＣ１／２及びΔＧが得られ、これらはタンパク質の安定性に対する優れた測定基準であり得る。Ｃ１／２はタンパク質の５０％を変性させるのに必要となる化学的変性剤の量であり、これを用いてΔＧ（即ちアンフォールディングエネルギー）を導出する。化学的変性剤に応じたタンパク質のアンフォールディングをモニタリングするために、内在性タンパク質蛍光を測定した。３つの異なる標的、Ｆｌｔ３、Ｍｓｌｎ、及びＤｌｌ３を使用して、ＨＨＬＬ構成の化学的安定性プロファイルを調査した。ＨＵＮＫ機器（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ）を使用することにより、このプロセスを完全に自動化した。０～５．５２Ｍの塩酸グアニジン（ＧｕＨＣｌ）の範囲で３２個の独立した変性データポイントを生成し、得られた３５０／３３０ｎｍの蛍光強度比をプロットし、変性した割合を求めるためにフィッティングを行い、Ｃ１／２及びΔＧ値を導出した。確実性が最大となるように、４２個のデータポイントを収集してＦｌｔ３データを画定した。プロットは、正規化データがフィッティングしていることを示している。２状態又は３状態モデルのいずれかとなるようにデータをフィッティングした。図８は、本実験の結果を示すものである。

【０１８１】

化学的安定性の向上の程度が、Ｆｌｔ３の場合に最も高かったことが観察された。ここでは、Ｆｌｔ３－４４４及び５５５、即ち「ミディアム」及び「ルーズ」な変異体は、Ｃ１／２において約０．８Ｍシフトし、ΔＧが約１～６ｋｃａｌ／ｍｏｌ向上したことによって認められるように、Ｆｌｔ３－ＷＴと比較して著しい向上を示した。一方、Ｍｓｌｎ及びＤｌｌ３の両方の場合では、Ｃ１／２において劇的なシフトは観察されなかった。しかしながら、Ｍｓｌｎ－５５５、即ちルーズな構造では、より低いΔＧ値が観察されるため、Ｍｓｌｎ－ＷＴよりもわずかに安定性が劣っていた。このデータから、ＨＨＬＬ構成の化学的安定性は、Ｆｌｔ３－４４４及びＦｌｔ－５５５変異体で観察されるように、標準型ＨＬＨＬ構成と同等に機能するか、又は理想的な例では、標的ドメインに依存的な様式でＷＴタンパク質を上回ることができることが結論づけられた。

【０１８２】

下記の表３は、これらの結果の一部についてまとめたものである。

【０１８３】

【表３】

表3

構築物	$C_{1/2}$ (1)	ΔG (1)	M(1)	$C_{1/2}$ (2)	ΔG(2)	M(2)
Flt3-WT	2.81	2.85 ± 0.07	1.01 ± 0.03			
Flt3-233	3.62	4.46 ± 0.64	1.72 ± 0.40			
Flt3-444	3.60	5.98 ± 0.70	1.66 ± 0.20			
Flt3-555	3.33	3.99 ± 0.44	1.2 ± 0.20			
Msln- WT	1.66	7.79 ± 1.09	4.71 ± 0.15	2.58	2.58 ± 0.17	1.59 ± 0.44
Msln 233	1.5	11.15 ± 2.5	7.41 ± 0.25	2.66	4.96 ± 0.20	1.86 ± 0.95
Msln 355	1.99	3.36 ± 0.31	1.69 ± 0.38	2.73	6.31 ± 0.68	2.25 ± 0.15
Msln-444	1.6	9.24 ± 1.6	5.79 ± 0.19	2.58	4.57 ± 0.20	1.77 ± 0.64
Msln-444-noscFc	1.48	9.57 ± 1.93	6.46 ± 0.40	2.74	8.95 ± 0.44	3.27 ± 0.72
Msln-555	1.93	3.53 ± 0.32	1.83 ± 0.43	2.68	5.16 ± 0.71	1.92 ± 0.16

【０１８４】
実施例５
熱安定性
示差走査蛍光光度計によるＴｍ測定及び静的光散乱によるＴａｇｇ測定
ＢｉＴＥタンパク質の様々なＴｍ及びＴａｇｇ値を測定するために、熱勾配の際に内在性タンパク質蛍光及び静的光散乱（ＳＬＳ）データを同時に取得することが可能な、完全に自動化されたＵＮｃｌｅプラットフォーム（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ）を使用した。要約すると、データを取得する間、１ｍｇ／ｍｌのタンパク質試料に２０～９０℃の熱勾配を受けさせた。ＵＮｃｌｅ解析ソフトウエアを使用して３つの複写物の平均からＴｍ及びＴａｇｇ値を導出した。
【０１８５】
熱安定性及び凝集アッセイを使用して更にＨＨＬＬ構成を特性評価すると、安定性の測定基準が向上していることが更に明らかとなった。これらの様々な実験の結果を図９Ａ、図９Ｂ、及び図１０に示す。示差走査蛍光定量法（ＤＳＦ）及び静的光散乱（ＳＬＳ）の両方を使用してＢｉＴＥ分子のパネルをスクリーニングし、熱融解（Ｔｍ）及び熱凝集（Ｔａｇｇ）の両方をそれぞれ測定した。興味深いことに、この場合もやはり、Ｔｍプロファイルに関しては向上の程度がＦｌｔ３の場合に最も高かったことが観察された。このデータでは、全てのＨＨＬＬ　Ｆｌｔ３変異体（Ｆｌｔ３－２３３、Ｆｌｔ３－４４４、及びＦｌｔ３－５５５）は、ＤＳＦデータ及び導関数曲線のシフトによって確認されるように、Ｔｍが約３℃向上したことを示した。Ｆｌｔ３に関する熱勾配の静的光散乱データでは、このＦｌｔ３－４４４及びＦｌｔ３－５５５のような向上が見られないが、これらはＦｌｔ３－ＷＴと比較して同等のＴａｇｇ値を有している。注目すべきことに、Ｆｌｔ３－２３３のタイトな構成ではＴａｇｇが大幅に減少しており、このことは、Ｆｌｔ３－４４４、Ｆｌｔ３－５５５、及びＦｌｔ３－ＷＴと比較して、この変異体が容易に凝集する可能性があるということを示し得る。
【０１８６】
ＭｓｌｎのＨＨＬＬ変異体の場合では、ＤＳＦ又は導関数曲線に対する任意の著しい変化、従ってＴｍの著しい変化は観察されなかった。しかしながら、興味深いことに、ＭｓｌｎのＨＨＬＬ変異体のＴａｇｇの特性において著しい差異が見られなかった。ここで、

Ｍｓｌｎ－２３３、Ｍｓｌｎ－４４４、及びＭｓｌｎ－５５５のＴａｇｇ値では、約２～３℃の向上が観察された。このことは、実際に、ＭｓｌｎのＨＨＬＬ変異体が、標準型Ｍｓｌｎ　ＢｉＴＥと比較して向上した凝集特性を有することを示唆している。Ｄｌｌ３のＨＨＬＬ及び標準型ＢｉＴＥにおいて類似した傾向が観察された。データは、実際にＨＨＬＬ構成が標準型の構成よりも性能が優れている可能性があることを示唆している。

【０１８７】

促進応力試験

促進応力条件下で、ＨＨＬＬ構成の性能を評価した。ＢｉＴＥのパネルを４０℃でインキュベートし、分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によってＴ０、２週（２Ｗ）及び４週（４Ｗ）の時点で凝集を測定した。高分子量（ＨＭＷ）ピーク、主ピーク、及び低分子量（ＬＭＷ）ピークを積分することによって凝集レベルを定量化した。興味深いことに、Ｆｌｔ３のＨＨＬＬ変異体がタンパク質安定性（即ち、ＩＣＤ及びＴｍ）について最大の向上レベルを示した前回のデータとは異なり、それらの凝集特性において著しい向上は見られなかった。しかしながら、このことはＦｌｔ３についてＳＬＳで得られたＴａｇｇデータと一致しており、Ｔａｇｇにおける差は見られなかった。ＳＬＳデータは、Ｔａｇｇ値の低下によって示唆されるように、Ｆｌｔ－２３３、即ち「タイト」な構成は、凝集する傾向が高い可能性があることを示唆しており、実験上のＳＥＣ測定でこのことが観察されたことにも留意すべきである。Ｍｓｌｎ及びＤｌｌ３の両方のＨＨＬＬ変異体では、向上したＴａｇｇ特性を有しており、ＳＥＣによってＭｓｌｎ／Ｄｌｌ３－４４４及びＭｓｌｎ－５５５変異体の凝集特性に向上が見られた。Ｍｓｌｎ－４４４及び５５５のＢｉＴＥは最大の向上を示した。４４４変異体は、４週における時間経過と共に、ＷＴと比較して半分となる凝集レベルを示した。興味深いことに、Ｍｓｌｎ－５５５変異体は完全に可逆的な凝集を有するように見え、ＨＭＷ種は４週にわたって検出不可能な量まで低下した。陰性対照として、理想的でないリンカー長を有するＤｌｌ３－３３２のＨＨＬＬ変異体が含まれている。このタンパク質は、分子モデリングで観察されるように、末尾の軽鎖が折り畳まれるのを阻害する可能性が高い、短い最終リンカーを含んでいた。このタンパク質は時間の経過と共にＷＴ又はＨＨＬＬ変異体よりも容易に凝集し、このことは本発明者らの分子モデリング手法の妥当性を認めるものであった。まとめると、これらのデータにより、最適化されたリンカー長を有するＨＨＬＬ構成は、凝集に対する向上をもたらすことができるか、又は少なくともＷＴと同等であるということが示唆された。

【０１８８】

タンパク質のクリッピング

促進応力に誘発される凝集を調査することに加えて、タンパク質のクリッピングについて検査した。標的ドメイン又はＴ細胞結合ドメインのいずれかを接続するリンカーへのクリッピングは、薬剤の効力及び有効性に最終的に有害な影響を与えるため、クリッピングはＢｉＴＥにとって重大な問題である。ｓｃＦｃを含む更なる部位へのクリッピングは、薬力学的／動態学的特性に影響を与える可能性がある。このような理由から、還元型キャピラリー電気泳動（ｒＣＥ）を使用して、Ｔ０、２Ｗ、及び４Ｗにおけるタンパク質のクリッピングについてＢｉＴＥのパネルを評価した。本実験の結果を図１１に示す。明確にするために、Ｆｌｔ３－４４４変異体の例示的なｒＣＥを４０℃でＴ０及び４Ｗで追跡したものを、ＬＭＷピーク及び主ピーク領域の境界を画定した状態で示している。Ｆｌｔ３ＢｉＴＥは最も変化の高いクリッピングのレベルを示していたが、Ｆｌｔ－４４４変異体はＷＴのＨＬＥ－ＢｉＴＥよりも優れた性能を示しており、クリッピング事象が１０～１５％少なかった。「タイト」なＦｌｔ３－２３３タンパク質はＷＴのように機能する一方で、最も長いリンカーを有する「ルーズ」なＦｌｔ３－５５５タンパク質は２Ｗで最大のクリッピングの程度を示し、更に４Ｗまでにはこれらのクリッピングされたセグメントが分解されているということにも留意すべきである。驚くべきことに、「ミディアム及びルーズ」なＭｓｌｎ及びＤｌｌ３、即ち４４４タンパク質及び５５５タンパク質については、４Ｗで４０℃の応力を受けた試料においてクリッピングが５～１０％減少していることが確認された。リンカー長に応じたタンパク質のクリッピングへの影響があるように思わ

れた。このデータは、一般的に、４４４のＨＨＬＬ構成が、ＨＬＥ－ＢｉＴＥのパネル全体で忍容性が良好であるように思われることを示唆している。

【０１８９】

冷凍状態（－２０℃）安定性

１ｍｇ／ｍｌのタンパク質試料のそれぞれの１００μＬのアリコートを、－２０℃で３部冷凍した。タンパク質試料を、ｔ０、２週、４週、及び８週時点で（室温にて）解凍した。試料を解凍すると、直ちにサイズ排除クロマトグラフィーＨＰＬＣにかけて主ピークの割合を定量化した。ＷＴの二重特異性構築物と同等な冷凍状態の安定性が、様々なリンカー長のＨＨＬＬ構築物（例えば、４４４及び５５５構築物）で得られている。

【０１９０】

実施例６

凍結融解安定性アッセイ

１ｍｇ／ｍｌのタンパク質試料のそれぞれの１００μＬを、１．５ｍＬのエッペンドルフチューブ中で３部冷凍した。－８０℃の冷凍庫からタンパク質を取り出して室温にすることでタンパク質を解凍し、続いてこのタンパク質を－８０℃の冷凍庫に戻すことによって再度冷凍した。１回、５回、及び１０回の凍結融解サイクルで試料を試験した。結果を図１５に示す。ＷＴの二重特異性構築物と同等な安定性が、様々なリンカー長のＨＨＬＬ構築物（例えば、４４４及び５５５構築物）で得られている。１回の凍結融解ではＨＨＬＬのＨＭＷが高いが、ＨＭＷは凍結融解サイクルにわたって一様に低下しており、このことは、ＨＨＬＬ構成が凍結融解と適合するものであることを示している。

【０１９１】

実施例７

細胞ベースの活性アッセイ

恒常的に発現するホタルルシフェラーゼを定量化することによって標的細胞の生存率を測定し、Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって実施した。要約すると、本アッセイでは、ＣＤ３を発現するヒト皮膚Ｔ細胞リンパ球細胞株であるＨｕＴ－７８細胞を、メソセリンを発現するヒト卵巣癌細胞株であるＯＶＣＡＲ－８－Ｌｕｃ細胞とインキュベートし、細胞数と生存率とのマーカーとしてルシフェラーゼを恒常的に発現するように改変した。Ｍｓｌｎ ＢｉＴＥタンパク質を０．０１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬの範囲で３部希釈し、９６ウェル、全面積、平底、組織培養処理済み、無菌、白色ポリスチレンプレート（Ｃｏｓｔａｒ、＃３９１７）に入れた。ＨｕＴ－７８ Ｔ細胞とＯＶＣＡＲ－８－Ｌｕｃ Ｍｓｌｎ発現細胞とをそれぞれ１０：１の割合で含むプレートに細胞を加え、最低２４時間インキュベートした後、Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ試薬を添加した。Ｐｒｏｍｅｇａ社のプロトコールに従い、再構成したＳｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ試薬を添加し（１ウェルあたり２５μＬ）、アッセイプレートを室温で３０分間インキュベートした。超高感度の発光検出器を備えたＥｎＶｉｓｉｏｎマルチラベルリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）によって発光を定量化した。基準／対照としてＭｓｌｎ－ＷＴを使用して、データを１００％に正規化した。

【０１９２】

この細胞ベースの細胞毒性アッセイを使用して、Ｔ細胞媒介性の細胞殺傷におけるＦｌｔ３及びＭｓｌｎ ＨＨＬＬ ＢｉＴＥパネルの活性を評価した。本アッセイでは、Ｆｌｔ３マーカー及びＭｓｌｎマーカーの両方を発現するヒト由来のＴ細胞及びヒト卵巣癌細胞株、並びにＦｌｔ３又はＭｓｌｎのＢｉＴＥ ＷＴ及びＨＨＬＬ分子のいずれかとインキュベートしたルシフェラーゼレポーターを使用した。単純化するために、効力データをそれぞれのＷＴのＨＬＥ－ＢｉＴＥに正規化した。Ｆｌｔ３－ＨＨＬＬ ＢｉＴＥは全てＷＴと同様の効力を保持していた。Ｍｓｌｎ－ＨＨＬＬ ＢｉＴＥによる効力は、ＷＴのＭｓｌｎ ＨＬＥ－ＢｉＴＥと比較して全体的に約７５％低下することが観察された。本実験の結果を図１３に示す。

【０１９３】

本明細書に引用されるあらゆる文献は、全ての目的のためにその全体が参考によって本

明細書に組み込まれる。
【０１９４】
本発明は、個々の本発明の実施形態の単一の説明並びに機能的に同等な本発明の方法及び構成要素として意図される、本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際に、本明細書に図示され記載されるものに加えて、本発明の様々な変更形態は、上述の説明及び添付図面から当業者に明らかになるであろう。そのような変更形態は、特許請求の範囲内に含まれることが意図される。
【０１９５】
配列
例示的なリンカー配列
ＧＧＧＧＳ（配列番号１）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号４）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５）
ＧＧＧＧＱ（配列番号６）
ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号７）
ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号８）
ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号９）
ＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱＧＧＧＧＱ（配列番号１０）
ＧＧＧＧＳＡＡＡ（配列番号１１）
ＴＶＡＡＰ（配列番号１２）
ＡＳＴＫＧＰ（配列番号１３）
ＡＡＡ（配列番号１４）
ＧＧＮＧＴ（配列番号１５）
ＹＧＮＧＴ（配列番号１６）
【０１９６】
以下の配列は、発現の際に除去されるＮ末端シグナルペプチドを含んでいることに留意されたい。シグナルペプチド配列は、以下の通りである：ＭＤＭＲＶＰＡＱＬＬＧＬＬＬＬＷＬＲＧＡＲＣ（配列番号５２）。
【０１９７】
標的１：ｄｌｌ３＿３３２（配列番号１７）

【化１】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
GSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK
GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIV
LTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGAS
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGCGT
KLEIKSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNY
PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

【０１９８】

標的２：ｄｌｌ３＿４４４（配列番号１８）

【化２】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
GSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVR
QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNL
KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQ
APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYD
RSPLTFGCGTKLEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSP
GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０１９９】

標的３：ｄｌｌ３＿５５５（配列番号１９）

【化３】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
GSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA
MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNY
LAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL
IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV
FGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２００】

標的４：ｄｌｌ３＿ＷＴ＿ｉｎｔａｃｔ＿ＨＬＨＬ＿ｓｃＦＣｆｒｏｍＦｌｔ３（配列番号２０）

【化４】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
GSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQ
APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYD
RSPLTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF
NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQ
QKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY
CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQY
GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

【０２０１】

標的５：ＦＬＴ３＿ ＿ＡＴ＿Ｋｏｚａｋ（ＷＴ）（配列番号２１）

【化５】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSG
FSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSS
KTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQ
QKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY
CLQHNSYPLTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA
SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR
DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNY
PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED
EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

【０２０２】

標的６：ＦＬＴ３＿２３３（配列番号２２）

【化６】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSG
FSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSS
KTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG
KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGT
KVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV
TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG
VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２０３】

標的７：ＦＬＴ３＿４４４（配列番号２３）

【化７】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSG
FSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSS
KTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQ
QKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY
CLQHNSYPLTFGCGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
GGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２０４】

標的８：ＦＬＴ３＿５５５（配列番号２４）

【化８】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSG
FSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSS
KTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF
TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ
APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY
SNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR
CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEE
QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

【０２０５】

標的９：ＭＳＬＮ＿４４４＿ｎｏｓｃＦＣ（配列番号２５）

【化９】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSF
PRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG
SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

【０２０６】

標的１０：ＭＳＬＮ＿Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２＿ｎｏ＿ｓｃＦＣ（ＷＴ）（配列番号２６）

【化１０】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSF
PRTFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQK
PGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV
LWYSNRWVFGGGTKLTVL

【０２０７】

標的１１：ＭＳＬＮ＿　＿Ｈ１Ｌ２Ｌ１Ｈ２＿ｎｏＳＣＦＣ（配列番号２７）

【化１１】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQ
QKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY
CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS
VSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS

【０２０８】

標的１２：ＭＳＬＮ＿Ｌ１Ｈ２Ｈ１Ｌ２＿ｎｏｓｃＦＣ（配列番号２８）

【化１２】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS
QGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ
LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISS
SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSH
FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

【０２０９】

標的１３：ＭＳＬＮ　Ｌ１Ｌ２Ｈ１Ｈ２＿ｎｏｓｃＦＣ（配列番号２９）

【化１３】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS
QGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG
LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW
VFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLR
LSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY
LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS

【０２１０】

標的１４：ＭＳＬＮ＿Ｌ２Ｈ１Ｈ２Ｌ１＿ｎｏｓｃＦＣ（配列番号３０）

【化１４】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT
LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEW
LSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCA
RDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG
LVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS
YWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV
GDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKS

【０２１１】

標的１５：ＭＳＬＮ＿２３３（配列番号３１）

【化１５】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA
RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV
RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS
SVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKSG
GGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN
WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA
EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCE
EQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【０２１２】

標的１６：ＭＳＬＮ　３５５（配列番号３２）

【化１６】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKG
LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSF
PRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG
GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２１３】

標的１７：ＭＳＬＮ＿４４４（配列番号３３）

【化１７】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSF
PRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG
TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG
SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２１４】

標的１８：ＭＳＬＮ＿５５５（配列番号３４）

【化１８】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ
MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLA
WYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQ
TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG
GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG
GGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR
CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２１５】

標的１９：ＭＳＬＮ＿ｗｉｔｈ　ｓｃＦＣ（ＷＴ）（配列番号３５）

【化１９】

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK
NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSF
PRTFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQK
PGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCV
LWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS
TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

【０２１６】

Ｆｃ領域（３６～３９）

【０２１７】

【表４】

IgG1 ----------
IgG2 ----------
IgG3 elktplgdtthtcprcpepkscdtpppcprcpepkscdtpppcprcp
IgG4 ----------

225 235 245 255 265 275
* * * * * *

IgG1
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKF
IgG2 erkccve---cppcpappva-gpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqf
IgG3 epkscdtpppcprcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqf
IgG4 eskyg---ppcpscpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqf

285 295 305 315 325 335
* * * * * *

IgG1
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKT
IgG2 nwyvdgmevhnaktkpreeqfnstfrvvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiekt
IgG3 kwyvdgvevhnaktkpreeqynstfrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiekt
IgG4 nwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiekt

345 355 365 375 385 395
* * * * * *

IgG1
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTP
IgG2 isktkgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttp
IgG3 isktkgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewessgqpennynttp
IgG4 iskakgqprepqvytlppsqeemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttp

405 415 425 435 445
* * * * *

IgG1 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(配列番号:36)
IgG2 pmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (配列番号:37)
IgG3 pmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnifscsvmhealhnrftqkslslspgk (配列番号:38)
IgG4 pvldsdgsfflysrltvdksrwqegnvfscsvmhealhnhytqkslslslgk (配列番号:39)

【０２１８】
配列番号４０　成熟ヒトＣＤ３εのアミノ酸配列

【化２０】

qdgneemgg itqtpykvsi sgttviltcp qypgseilwq

hndkniggde ddknigsded hlslkefsel eqsgyyvcyp rgskpedanf ylylrarvce

ncmemdvmsv ativivdici tgglllvyy wsknrkakak pvtrgagagg rqrgqnkerp

ppvpnpdyep irkgqrdlys glnqrri

【０２１９】

配列番号４１　カニクイザルの成熟ＣＤ３εのアミノ酸配列

【化２１】

qdgneemgs itqtpyqvsi sgttviltcs qhlgseaqwq

hngknkgdsg dqlflpefse meqsgyyvcy prgsnpedas hhlylkarvc encmemdvma

vativivdic itlgllllvy ywsknrkaka kpvtrgagag grqrgqnker pppvpnpdye

pirkgqqdly sglnqrri

【０２２０】

配列番号４２　ヒトＣＤ３εの細胞外ドメインのアミノ酸配列

【化２２】

qdgneemgg itqtpykvsi sgttviltcp qypgseilwq

hndkniggde ddknigsded hlslkefsel eqsgyyvcyp rgskpedanf ylylrarvce

ncmemdvms

【０２２１】

配列番号４３　ヒトＣＤ３εのアミノ酸１～２７

ｑｄｇｎｅｅｍｇｇ　ｉｔｑｔｐｙｋｖｓｉ　ｓｇｔｔｖｉｌｔ

【０２２２】

ＤＬＬ３　Ｈｅａｖｙ（配列番号４４）

【化２３】

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTT

NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGTLV

TVS

【０２２３】

ＤＬＬ３　Ｌｉｇｈｔ（配列番号４５）

ＥＩＶＬＴＱＳＰＧＴＬＳＬＳＰＧＥＲＶＴＬＳＣＲＡＳＱＲＶＮＮＮＹＬＡＷＹＱＱＲ

ＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹＧＡＳＳＲＡＴＧＩＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥ

ＰＥＤＦＡＶＹＹＣＱＱＹＤＲＳＰＬＴＦＧＣＧＴＫＬＥＩＫ

【０２２４】

ＦＬＴ３　Ｈｅａｖｙ（配列番号４６）

【化２４】

QVTLKESGPTLVKPTETLTLTCTLSGFSLNNARMGVSWIRQPPGKCLEWLAHIFSNDE
KSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVVLTMTNVDPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFFDYW
GQGTLVTVS

【０２２５】
ＦＬＴ３　Ｌｉｇｈｔ（配列番号４７）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＲＮＤＬＧＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＲＬＩＹＡＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＬＱＨＮＳＹＰＬＴＦＧＣＧＴＫＶＥＩＫ
【０２２６】
ＭＳＬＮ　Ｈｅａｖｙ（配列番号４８）
【化２５】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGST
IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLV
TVS

【０２２７】
ＭＳＬＮ　Ｌｉｇｈｔ（配列番号４９）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＶＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＮＴＷＬＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡＳＧＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＡＫＳＦＰＲＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ
【０２２８】
ＣＤ３　Ｈｅａｖｙ（配列番号５０）
【化２６】

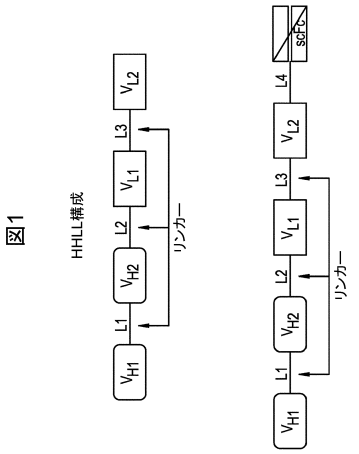
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVS

【０２２９】
ＣＤ３　Ｌｉｇｈｔ（配列番号５１）
ＱＴＶＶＴＱＥＰＳＬＴＶＳＰＧＧＴＶＴＬＴＣＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮＷＶＱＱ
ＫＰＧＱＡＰＲＧＬＩＧＧＴＫＦＬＡＰＧＴＰＡＲＦＳＧＳＬＬＧＧＫＡＡＬＴＬＳＧＶ
ＱＰＥＤＥＡＥＹＹＣＶＬＷＹＳＮＲＷＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ

【図面】

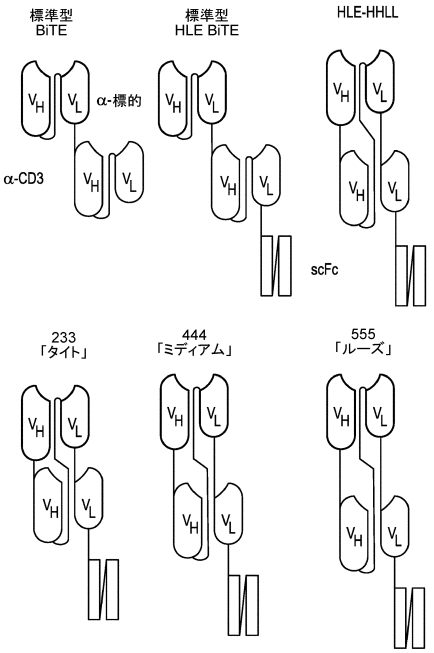
【図１】

図1



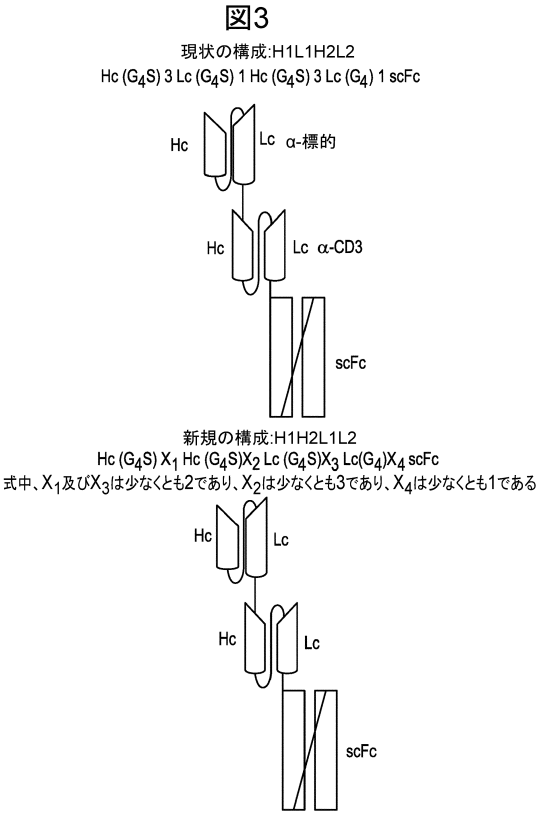
【図２】

図2



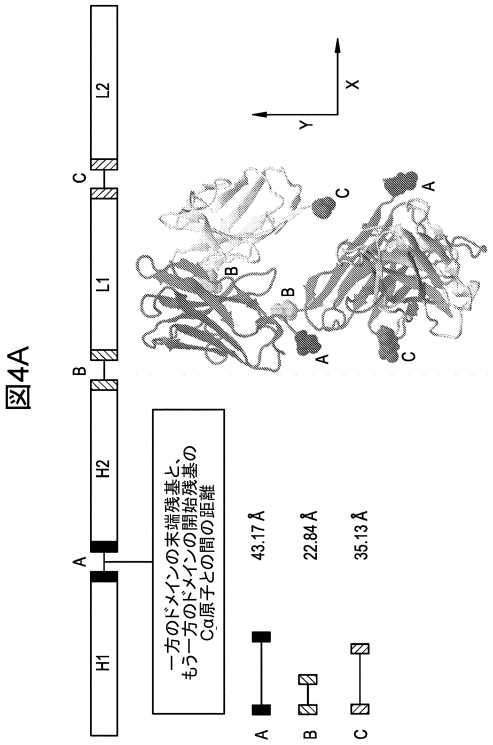
【図３】

図3

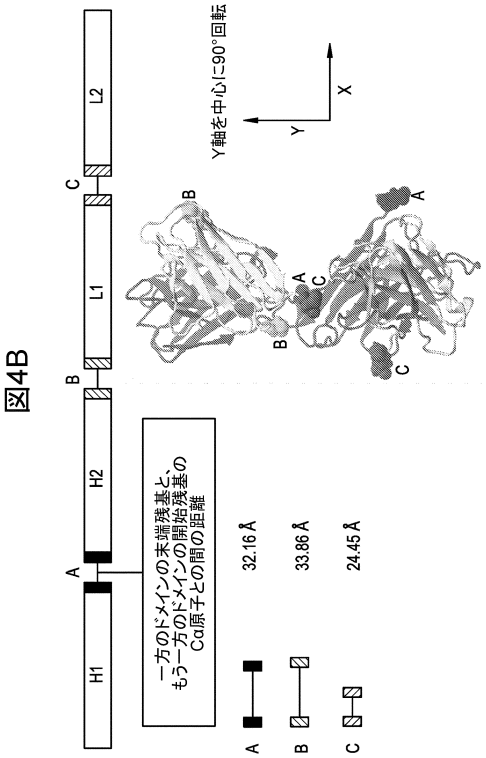


【図４Ａ】

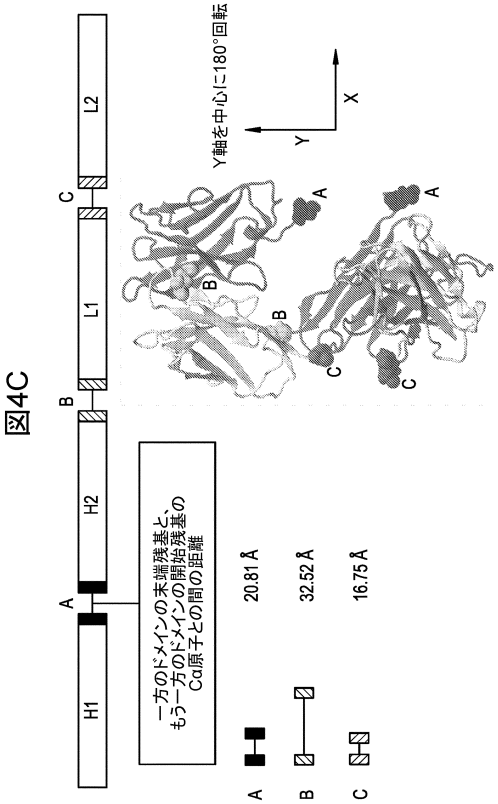
図4A



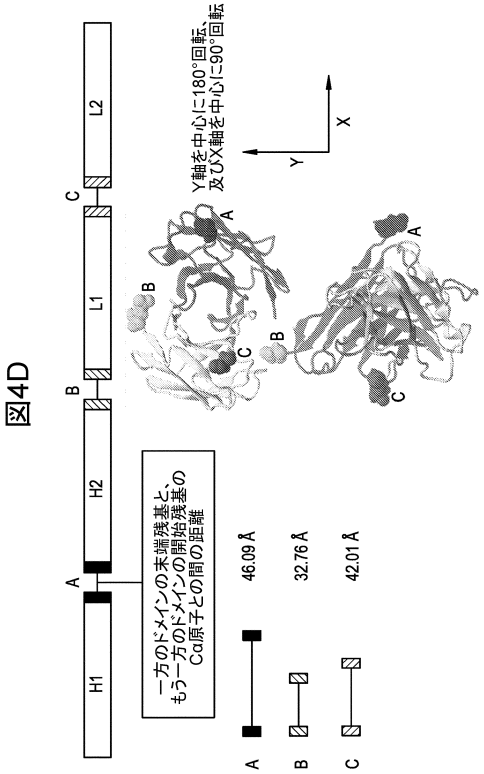
【図４Ｂ】



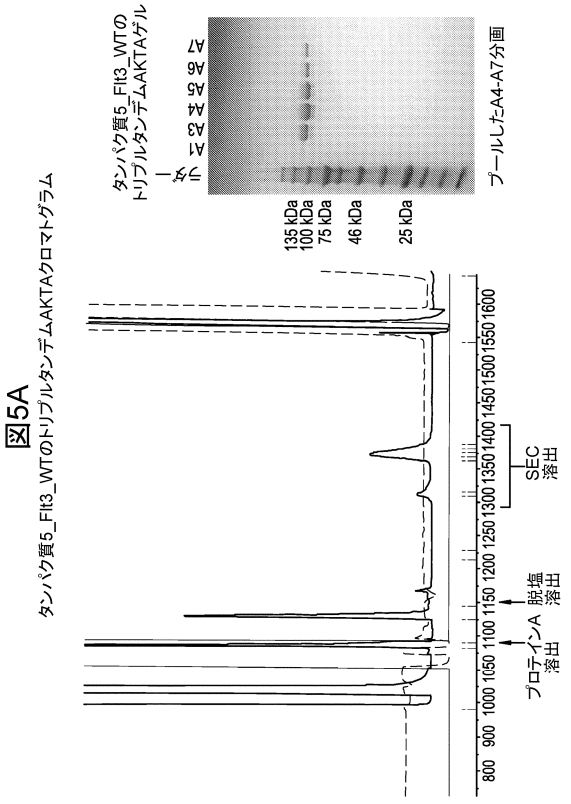
【図４Ｃ】



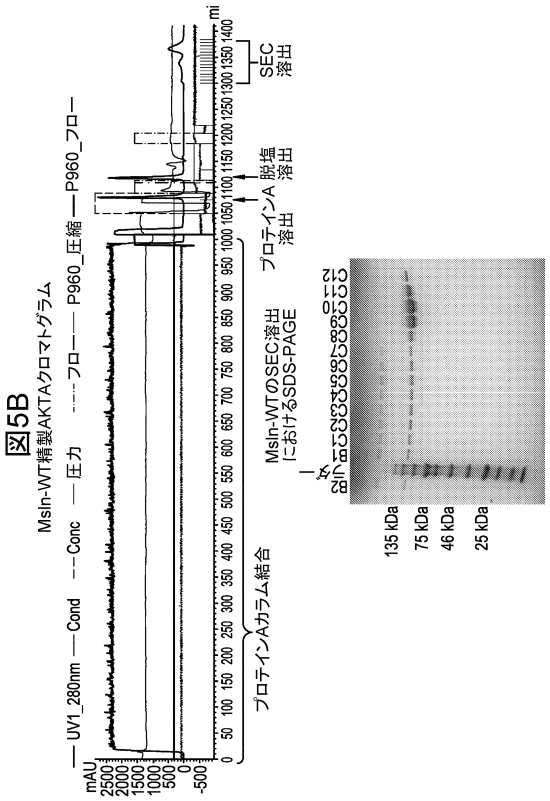
【図４Ｄ】



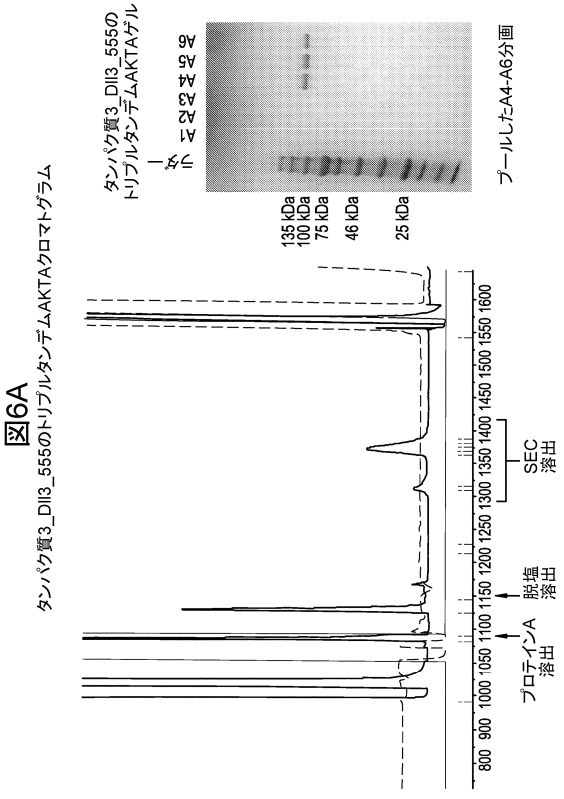
【図５Ａ】



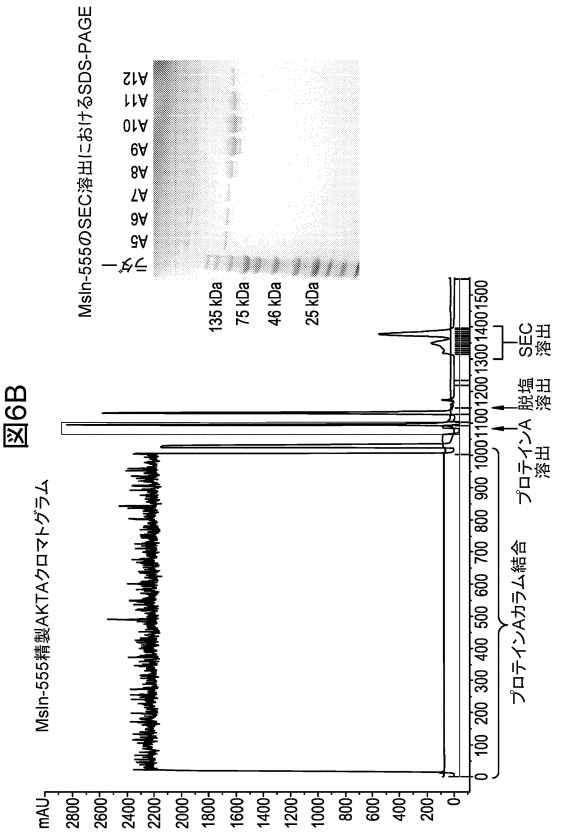
【図５Ｂ】



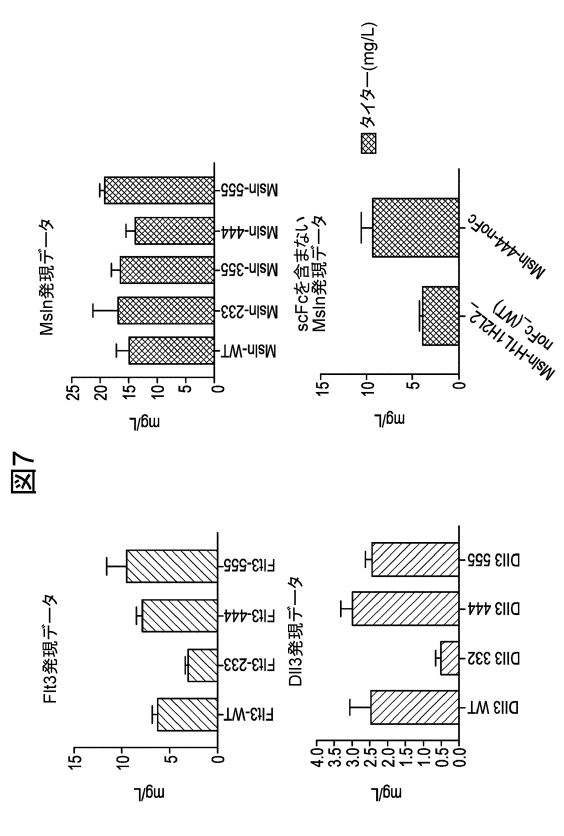
【図６Ａ】



【図６Ｂ】

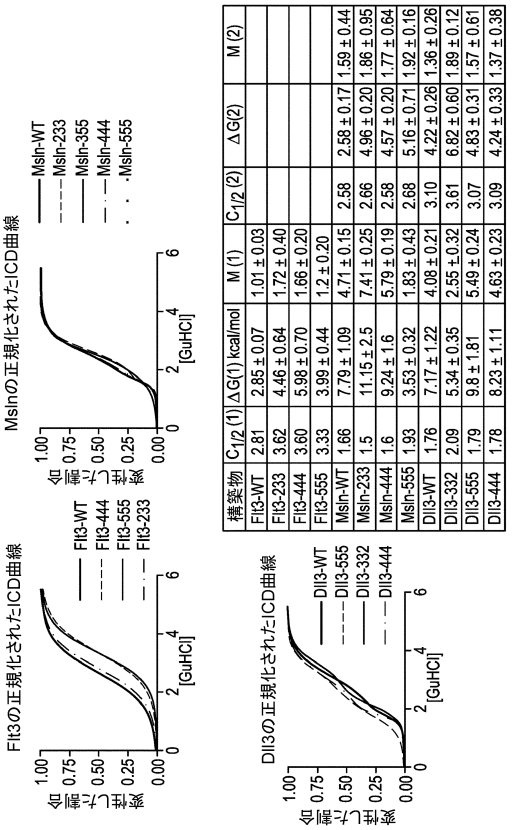


【図７】



【図８】

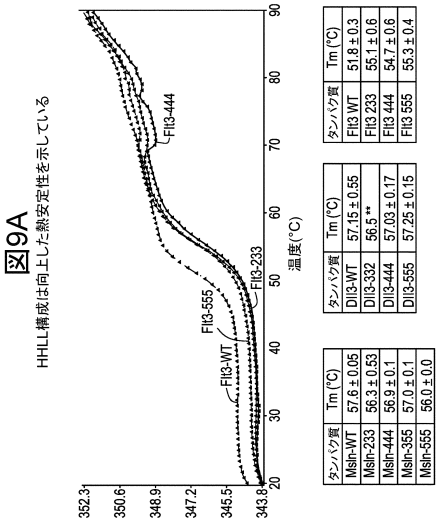
図8



構築物	$C_{1/2}$ (1)	ΔG(1) kcal/mol	M (1)	$C_{1/2}$ (2)	ΔG(2)	M (2)
Flt3-WT	2.81	2.85 ± 0.07	1.01 ± 0.03			
Flt3-233	3.62	4.46 ± 0.64	1.72 ± 0.40			
Flt3-444	3.60	5.98 ± 0.70	1.66 ± 0.20			
Flt3-555	3.33	3.99 ± 0.44	1.2 ± 0.20			
Msln-WT	1.66	7.79 ± 1.09	4.71 ± 0.15	2.58	2.58 ± 0.17	1.59 ± 0.44
Msln-233	1.5	11.15 ± 2.5	7.41 ± 0.25	2.66	4.96 ± 0.20	1.86 ± 0.95
Msln-444	1.6	9.24 ± 1.6	5.79 ± 0.19	2.58	4.57 ± 0.20	1.77 ± 0.64
Msln-555	1.93	3.53 ± 0.32	1.83 ± 0.43	2.68	5.16 ± 0.71	1.92 ± 0.16
Dll3-WT	1.76	7.17 ± 1.22	4.08 ± 0.21	3.10	4.22 ± 0.26	1.36 ± 0.26
Dll3-332	2.09	5.34 ± 0.35	2.55 ± 0.32	3.61	6.82 ± 0.60	1.89 ± 0.12
Dll3-555	1.79	9.8 ± 1.81	5.49 ± 0.24	3.07	4.83 ± 0.31	1.57 ± 0.61
Dll3-444	1.78	8.23 ± 1.11	4.63 ± 0.23	3.09	4.24 ± 0.33	1.37 ± 0.38

【図９Ａ】

図9A



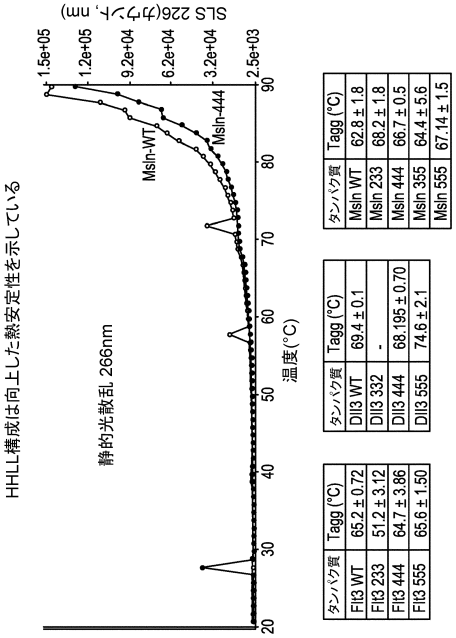
タンパク質	Tm (°C)
Msln-WT	57.6 ± 0.05
Msln-233	56.3 ± 0.53
Msln-444	56.9 ± 0.1
Msln-355	57.0 ± 0.1
Msln-555	56.0 ± 0.0

タンパク質	Tm (°C)
Dll3-WT	57.15 ± 0.55
Dll3-332	56.5 **
Dll3-444	57.03 ± 0.17
Dll3-555	57.25 ± 0.15

タンパク質	Tm (°C)
Flt3 WT	51.8 ± 0.3
Flt3 233	55.1 ± 0.6
Flt3 444	54.7 ± 0.6
Flt3 555	55.3 ± 0.4

【図９Ｂ】

図9B



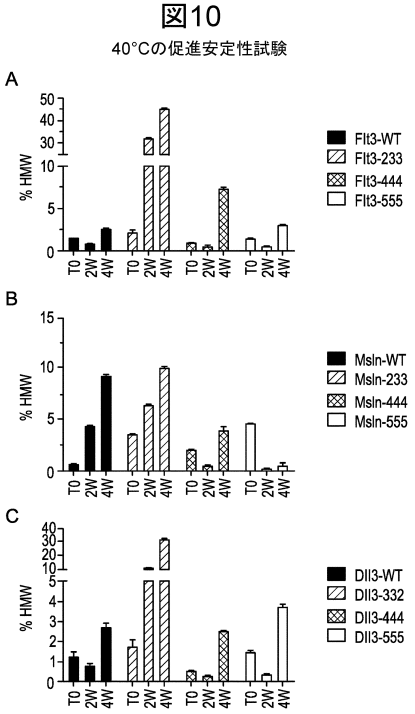
タンパク質	Tagg (°C)
Flt3 WT	65.2 ± 0.72
Flt3 233	51.2 ± 3.12
Flt3 444	64.7 ± 3.86
Flt3 555	65.6 ± 1.50

タンパク質	Tagg (°C)
Dll3 WT	69.4 ± 0.1
Dll3 332	-
Dll3 444	68.195 ± 0.70
Dll3 555	74.6 ± 2.1

タンパク質	Tagg (°C)
Msln WT	62.8 ± 1.8
Msln 233	68.2 ± 1.8
Msln 444	66.7 ± 0.5
Msln 355	64.4 ± 5.6
Msln 555	67.14 ± 1.5

【図１０】

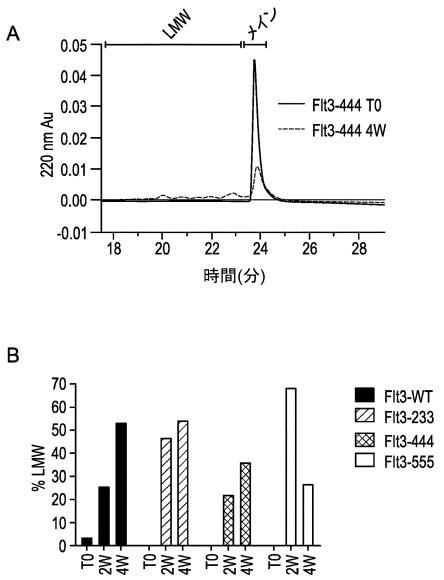
図10



【図１１－１】

図11

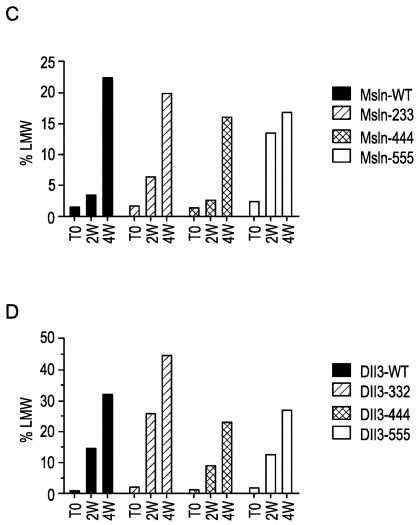
rCEは新規の構成がクリッピングを最小限に抑えるのに理想的であることを示唆している



【図１１－２】

図11(続き)

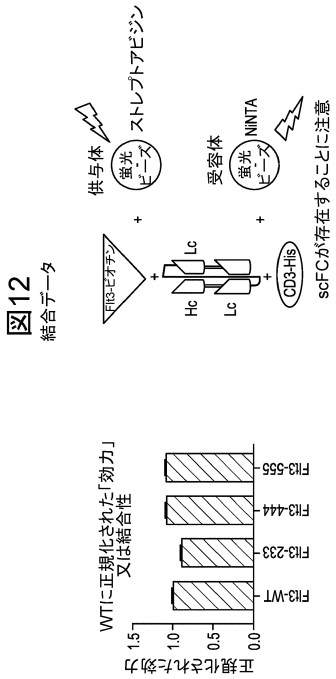
rCEは新規の構成がクリッピングを最小限に抑えるのに理想的であることを示唆している



【図１２】

図12

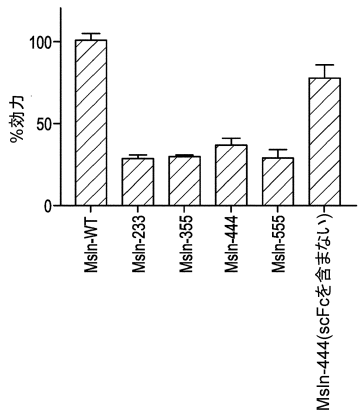
結合データ



【図１３】

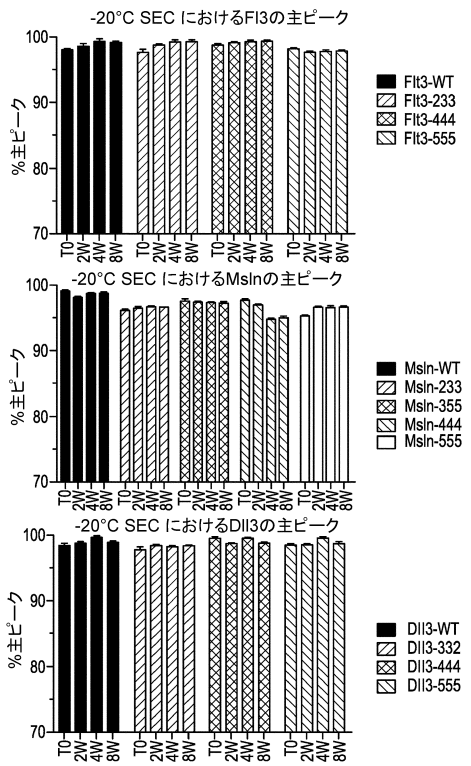
図13

細胞ベースアッセイにおける効力



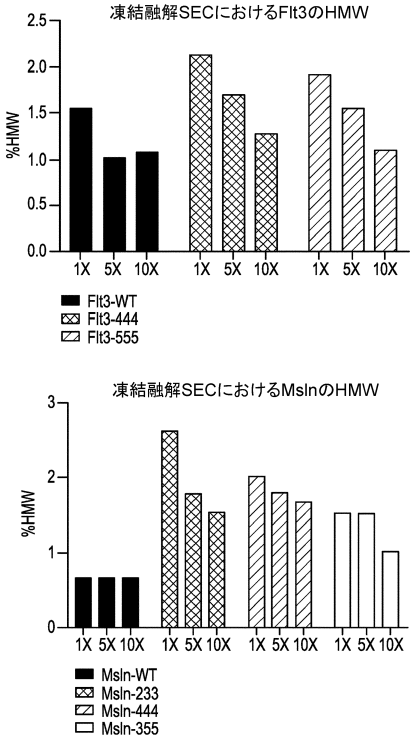
【図１４】

図14



【図１５】

図15



【配列表】

0007661245000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T
A61P 35/00 (2006.01)		A61K	39/395	N
		A61P	35/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(72)発明者 アメール，ブレンダン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、メール・ストップ・２８－５－エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付
審査官 小倉 梢
(56)参考文献 特表２０１６－５１０３１９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５２９３１７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５２７９０９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５２７９０８（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １６／００ － １６／４６
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ