

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527020
(P2024-527020A)

(43)公表日 令和6年7月19日(2024.7.19)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C O 7 K 16/28 (2006.01) C O 7 K 16/28 Z N A 4 H O 4 5

C O 7 K 16/46 (2006.01) C O 7 K 16/46

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全145頁)			
(21)出願番号	特願2024-504772(P2024-504772)	(71)出願人	316005432
(86)(22)出願日	令和4年7月27日(2022.7.27)		モルフォシス・アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和6年3月22日(2024.3.22)		ドイツ82152ブラネック、ゼンメル
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/071060		ヴァイスシュトラッセ7
(87)国際公開番号	WO2023/006809	(74)代理人	100169904
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)		弁理士 村井 康司
(31)優先権主張番号	21187924.2	(74)代理人	100217412
(32)優先日	令和3年7月27日(2021.7.27)		弁理士 小林 亜子
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	マルクス モスマイヤー
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		ドイツ連邦共和国 ランダウ アン・デア・イザール／タールハム 94405, ヌスバウム シュトラッセ 26アー
		(72)発明者	ニコル ハウプスト
			ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 81475, リーデナー シュトラッセ 8ツェー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原結合分子の組合せ

(57)【要約】

本開示は、2つの抗原結合分子の組合せ又はセット、特にそのような抗原結合分子の非対称組合せを提供する。2つの抗原結合分子は各々、CD3に特異的な抗体FvドメインのVL又はVHドメインのいずれかと融合した、腫瘍関連抗原に対して特異性を有するターゲティング部分から構成される。2つの抗原結合分子が細胞表面でそれらの標的抗原に結合すると、相補的VL及びVHドメインが互いに結合することができ、それによって機能性CD3特異的Fvドメインを再構成し、2つの抗原結合分子を非共有結合的に二量体化する。こうしてオンセル形成された三重特異性ヘテロ二量体抗体分子は、腫瘍細胞破壊のために細胞傷害性T細胞を誘導し、刺激することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 1 の抗原に特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、及び

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれ

か

から成る第 1 の抗原結合分子であって、

前記第 1 のターゲティング部分が、前記第 1 のペプチドリンカーを介して前記第 2 の結合部位の前記 V H 若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

10

b) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 3 の抗原に特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 のターゲティング部分、

i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i i i . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域、

i v . 第 3 のペプチドリンカー、及び

v . 前記第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメイン

20

から成る第 2 の抗原結合分子であって、

前記第 2 のターゲティング部分が、前記第 2 のペプチドリンカーを介して前記第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

前記第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端が、前記第 3 のペプチドリンカーを介して前記第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されており、

前記第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 4 のペプチドリンカーに融合されている、第 2 の抗原結合分子と

から成る、抗原結合分子のセット。

【請求項 2】

前記第 1 の抗原結合分子が、さらに以下：

30

i . 第 5 のペプチドリンカーと、

i i . 第 3 及び第 4 の F c 領域サブユニットから構成される第 2 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域とから成り、

前記第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかの C 末端は、前記第 5 のペプチドリンカーを介して第 3 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

前記第 4 の F c 領域サブユニットの N 末端は、第 6 のペプチドリンカーに融合されている、請求項 1 に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 3】

前記第 2 の抗原結合分子が、さらに以下：

40

i . 前記第 3 の抗原に特異的な第 4 の結合部位を含む第 3 のターゲティング部分

から成り、

前記第 3 のターゲティング部分は、前記第 4 のペプチドリンカーを介して前記第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されている、請求項 1 又は 2 に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 4】

前記ターゲティング部分が、抗体又は抗体フラグメントである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 5】

前記第 1 のターゲティング部分が第 1 の F a b であり、前記第 2 のターゲティング部分

50

が第 2 の F a b であり、前記第 3 のターゲティング部分が第 3 の F a b である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 6】

前記第 1 の F a b 重鎖の C 末端が、前記第 1 のペプチドリンカーを介して、前記第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、請求項 5 に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 7】

前記第 2 の F a b 重鎖の C 末端が、前記第 2 のペプチドリンカーを介して、前記第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されている、請求項 5 又は 6 に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 8】

前記第 3 の F a b 重鎖の C 末端が、前記第 4 のペプチドリンカーを介して、前記第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されている、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 9】

前記第 1 の抗原結合分子が、第 1 及び第 2 のポリペプチドから成り、ここで、

a) 前記第 1 のポリペプチドは、前記第 1 の F a b の軽鎖を含み、

b) 前記第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 1 の F a b の重鎖と、

i i . 前記第 1 のペプチドリンカーと、

i i i . 前記第 2 の抗原に特異的な前記第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれか

を含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 10】

前記第 1 の抗原結合分子が、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチドから成り、ここで、

a) 前記第 1 のポリペプチドは、前記第 1 の F a b の軽鎖を含み、

b) 前記第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 1 の F a b の重鎖、

i i . 前記第 1 のペプチドリンカー、

i i i . 前記第 2 の抗原に特異的な前記第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれか、

i v . 前記第 5 のペプチドリンカー、並びに

v . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 3 の F c 領域サブユニット

を含み、

c) 前記第 3 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 6 のペプチドリンカーと、

i i . その N 末端からその C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 4 の F c 領域サブユニット

を含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 11】

前記第 2 の抗原結合分子は、第 4、第 5 及び第 6 のポリペプチドから成り、ここで、

a) 前記第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 4 のペプチドリンカー、

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 2 の F c 領域サブユニット

を含み、

b) 前記第 5 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 2 の F a b の重鎖、

i i . 前記第 2 のペプチドリンカー、

10

20

30

40

50

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 1 の F c 領域サブユニット

i v . 前記第 3 のペプチドリンカー、

v . 前記第 2 の抗原に特異的な前記第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメインを含み、

c) 前記第 6 のポリペプチドは、前記第 2 の F a b の軽鎖を含む、請求項 5 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 2】

前記第 2 の抗原結合分子は、第 4、第 5、第 6 及び第 7 のポリペプチドから成り、ここで、

a) 前記第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 3 の F a b の重鎖、

i i . 前記第 4 のペプチドリンカー、

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 2 の F c 領域サブユニット

を含み、

b) 前記第 5 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 前記第 2 の F a b の重鎖

i i . 前記第 2 のペプチドリンカー

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される前記第 1 の F c 領域サブユニット、

i v . 前記第 3 のペプチドリンカー

v . 前記第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメインを含み、

c) 前記第 6 のポリペプチドは、前記第 2 の F a b の軽鎖を含む、

d) 前記第 7 のポリペプチドは、前記第 3 の F a b の軽鎖を含む、請求項 5 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 3】

前記第 1 の抗原結合分子と前記第 2 の抗原結合分子が、共有結合によって連結されていない、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 4】

前記第 1 の抗原結合分子又は前記第 2 の抗原結合分子のいずれも単独では、前記第 2 の抗原に結合することができない、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 5】

前記第 1 の抗原結合分子の第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれかと、前記第 2 の抗原結合分子の前記第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメインは、非共有結合的に互いに結合することができ、それによって前記第 2 の結合部位を形成する、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 6】

前記ペプチドリンカーが、5 ～ 4 9 アミノ酸残基、好ましくは 5 ～ 2 9 アミノ酸残基の長さを有する、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 7】

前記第 1 のペプチドリンカーが、5 ～ 4 5 アミノ酸残基の長さを有し、前記第 3 のペプチドリンカーが、5 ～ 2 0 アミノ酸残基の長さを有し、前記第 5 のペプチドリンカーが、9 ～ 4 9 アミノ酸残基の長さを有し、前記第 2、第 4 及び第 6 のペプチドリンカーがそれぞれ、5 ～ 2 0 アミノ酸残基の長さを有する、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 1 8】

前記第 2 の結合部位が、抗体 F v 領域である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の

10

20

30

40

50

抗原結合分子のセット。

【請求項 19】

前記抗体 Fv 領域が、CD3 に特異的である、請求項 18 に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 20】

前記第 1 の抗原と前記第 3 の抗原は、同じ細胞上に存在し、前記第 2 の抗原は、異なる細胞上に存在する、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 21】

前記第 1 の抗原と前記第 3 の抗原は異なる、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【請求項 22】

第 1 及び第 2 の Fc ドメインサブユニットの各 CH3 ドメイン、並びに第 3 及び第 4 の Fc ドメインサブユニットの各 CH3 ドメインは、それぞれ、前記第 1 及び第 2 の Fc 領域サブユニット、並びに前記第 3 及び第 4 の Fc 領域サブユニットの結合を促進するアミノ酸修飾を含む、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の抗原結合分子のセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、抗原結合分子の組合せ又はそれらのセットに関し、それらは、好ましくは類似しており、オンセル (on-cell) (細胞上) で活性化される。このようにしてオンセル形成された三重特異性ヘテロマー抗体分子は、腫瘍細胞破壊のために免疫細胞を誘導及び刺激することができる。本明細書に記載される非対称の組合せ手法は、腫瘍関連抗原上の異なるエピトープをターゲティングするのに特に有用であり、それによって、腫瘍細胞の殺傷が改善される。

【背景技術】

【0002】

通常、二重特異性抗体の使用に基づく治療コンセプトは、エフェクター細胞の動員に依存しており、従って、一方では腫瘍関連抗原 (TAA) を、他方では、治療関連性を有する実証済みの T 細胞刺激抗原である CD3 をターゲティングする。これらのコンセプトでは、標的細胞 (腫瘍細胞など) と T 細胞は二重特異性抗体を介して架橋され、免疫シナプスが形成されるため、これにより、エフェクター T 細胞が標的細胞を直接殺傷することを可能にする [Miller and Kontermann, Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010, 24 (2): 89-98]。免疫シナプスは、標的細胞からエフェクター T 細胞までの距離に依存するため、殺傷効果を高めるためには、腫瘍細胞上の標的エピトープと T 細胞上の CD3 が近接している必要があると提唱されている (Bluemel C., Cancer Immunol. Immunother. 2010 Aug; 59 (8): 1197-209)。また、腫瘍関連抗原の細胞表面近傍エピトープをターゲティングすることも、より効率的な T 細胞リダイレクト殺傷に寄与する可能性が示唆されている。概して、エフェクター T 細胞が腫瘍細胞表面に近くリダイレクトされるほど、T 細胞は、より効率的に腫瘍細胞を破壊することができると考えられる。

【0003】

CD3 標的化治療における 1 つの大きな問題は、オフターゲット T 細胞活性化に起因する毒性の課題である。このような用量制限毒性は、基本的に、標的細胞の存在に関係なく T 細胞を刺激する CD3 結合ドメイン固有の能力によって決定される。従って、このような用量制限毒性を軽減するために、中程度の結合親和性で、CD3 と一価で結合することが確立されてきた。CD3 共結合抗体の毒性を軽減するために当技術分野で論述される別の手法は、腫瘍細胞上の 2 つの異なる TAA の二重ターゲティングの使用である。こうした二重ターゲティングは、両標的抗原を一方のみ、或いは低レベルでしか発現しない正常

10

20

30

40

50

組織に対する選択性の向上につながる。しかし、こうした2つのTAAの組合せに結合するように開発された従来の多特異性抗体は、2つのTAA抗原の一方にのみ結合しても、どちらかの標的分子を発現する細胞の破壊のために免疫細胞を動員するのに依然として十分となり得るため、高度のオフターゲット効果をもたらす可能性がある。

【0004】

先行技術の従来の多特異性抗体フォーマットのもう1つの欠点は、これらが通常1つの完全な、且つ構造的に固定された分子として産生され、各腫瘍標的ドメインとCD3結合ドメインとの距離がほぼ同一であることである。このような分子において距離が一定であると、標的抗原又は抗原エпитオプの様々な距離を考慮に入れることができない。上に概説したように、2つの異なる抗原をターゲティングするT細胞誘導二重特異性抗体の有効性と効力は、標的エпитオプ、例えば、それらの互いの相対的な位置及び／又は細胞膜に対するそれらの相対的な位置に著しく依存し得る。

【0005】

従って、CD3ベースの免疫治療薬における有効性とオフターゲット毒性という、相反するニーズに対処する、改良された多特異性抗体フォーマットを提供する必要がある。

【0006】

前述の欠点のいくつかを克服する1つのアプローチは、国際公開第2013/104804号パンフレット [JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG] に記載されており、「DUAL ANTIGEN-INDUCED BIPARTITE FUNCTIONAL COMPLEMENTATION」又は「HEMIBODY (登録商標) アプローチ」と呼ばれている。前述のアプローチの一部として、2つのポリペプチドが設計され、各ポリペプチドは、分断若しくは解離したT細胞活性化抗CD3抗体Fvドメインの可変軽鎖ドメイン (VL) 又は相補可変重鎖 (VH) ドメインのいずれかに融合した、ターゲティング部分 (例えば、単鎖可変フラグメント (scFv) 又は抗体Fabフラグメント) から構成される。不對VH及びVLDドメイン (例えば、分断CD3 VHドメインと分断CD3 VLDドメイン) は、単独ではCD3に結合できない。しかし、前述の2つのポリペプチドがターゲティング部分を介して細胞表面の標的抗原に結合すると、相補的なVL及びVHドメインが接近し、互いに相互作用して元の機能的なCD3 Fvドメインを再構成する。このようにしてオンターゲットセル形成された (on-target cell formed) 三重特異性ヘテロ二量体抗体 (従来の三価の三重特異性抗体フォーマットなど) は、癌細胞の破壊のためにT細胞を誘導及び刺激する。

【0007】

最初の公開以来、HEMIBODY (登録商標) アプローチは、薬物動態学的問題、即ち、産物の均質性、及び標的細胞が存在しない溶液中のヘミボディ (Hemibodies) の不要な残留ヘテロ会合に対処するため、さらなる改良が加えられてきた (国際公開第2016/023909号パンフレット、同第2017/087789号パンフレット、同第2019/077092号パンフレット、同第2020/216883号パンフレット、同第2020/216879号パンフレット、同第2020/216878号パンフレット、同第2020/223108号パンフレット、同第2020/010104号パンフレット)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、当技術分野における公知のアプローチのいずれも、標的化エпитオプにより与えられる様々な距離を考慮に入れて、優れたT細胞媒介腫瘍細胞殺傷を可能にする、コンビナトリアルオンセル (on-cell) 多特異的抗体形成のために最適化されたオーダーメイドの抗原結合分子を提供していない。

【課題を解決するための手段】

【0009】

10

20

30

40

50

前述したニーズを考慮して、本開示の目的は、標的細胞上の２つの標的抗原又は抗原エпитープ（腫瘍関連抗原など）と、ＣＤ３などの免疫エフェクター細胞上の１つの抗原と結合するのに適した抗原結合分子のセットを提供することである。従って、本開示は、本明細書に開示されるような抗原結合分子のセットから構成されるオンセル形成三重特異性抗体を提供する。

【００１０】

本明細書にはさらに、第１の抗原結合分子と第２の抗原結合分子の組合せ又はセットが提供され、ここで、２つの抗原結合分子の各々は、第３の抗原、好ましくはヒトＣＤ３に特異的な抗体Ｆｖドメインの不對ＶＬ又はＶＨドメインのいずれかに融合した、標的抗原に対する特異性を有するターゲティング部分から構成され、２つの抗原結合分子は、共有結合によって結合されていない。

10

【００１１】

本開示の抗原結合分子に存在する不對ＶＬ又はＶＨドメインは、ＣＤ３などのその標的に単独では結合することができない。しかし、両抗原結合分子が同じ細胞の表面に発現したそれらの標的抗原に結合すると、相補的な不對ＶＬ及びＶＨドメインが接近し、互いに相互作用して、元の抗ＣＤ３抗体Ｆｖドメインを再構成し、このようにして、癌細胞の破壊のためにＴ細胞を誘導及び刺激することができるオンセル形成三重特異性ヘテロ二量体抗体を提供する。

【００１２】

本開示はまた、形状又は構造、及び個々の構成要素（ＩｇＧ Ｆｃ領域など）の有無が異なる、こうした第１及び第２の抗原結合分子の特定の組合せ又はセットにも関する。特に、本明細書に開示される抗原結合分子のセットに含まれる抗原結合分子は、ＣＤ３に特異的な不對ＶＨ又はＶＬドメインなどの不對可変ドメインに対するターゲティング部分の距離が異なってもよい。本明細書で開示される抗原結合分子の特異的な組合せは、対称型オンセル形成三重特異性抗体をもたらし得る。こうした対称の組合せでは、新たに形成された抗ＣＤ３ Ｆｖドメインに対する各ターゲティング部分の距離はほぼ同じである。好ましくは、本明細書に開示される抗原結合分子の特定の組合せ又はセットは、非対称型オンセル形成三重特異性抗体をもたらす。このような非対称の組合せでは、新たに形成される抗ＣＤ３ Ｆｖドメインに対する各ターゲティング部分の距離は、かなり異なっている。

20

30

【００１３】

本開示の発明者らは、驚くべきことに、このような非対称な組合せが、標的細胞上の異なる抗原又は抗原エпитープをターゲティングするのに特に有用であり、それにより、標的細胞の優れた殺傷効果が得られることを見出した。これは、前述したまちまちの距離のために、不對ＶＨドメイン及びＶＬドメインの機能的相補性（例えば、ＣＤ３に対する特異性を備える）は生じない可能性が高いと考えられていたことから、予想外なことであった。

【００１４】

一実施形態において、本開示は、第１及び第２の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子のセットを提供し、ここで、第１及び第２の抗原結合分子は、第１の抗原又は第１の抗原エпитープ及び第２の抗原又は第２の抗原エпитープに基づいて、例えば、それらの発現レベルに応じて選択される。

40

【００１５】

本開示の一実施形態において、第１及び第２の抗原結合分子は、第１の標的抗原エпитープから細胞表面までの距離と、第２標的抗原エпитープから細胞表面までの距離に基づいて選択される。

【００１６】

本開示の一実施形態では、第１及び第２抗原結合分子は、第１抗原又は第１抗原エпитープから第２抗原又は第２抗原エпитープまでの距離に基づいて選択される。

【００１７】

50

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原に特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれ

か

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子であって、

第1のターゲティング部分が、第1のペプチドリンカーを介して第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原に特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

ii. 第2のペプチドリンカー、

iii. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域、

iv. 第3のペプチドリンカー、及び

v. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメイン

から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

第2のターゲティング部分が、第2のペプチドリンカーを介して第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端が、第3のペプチドリンカーを介して第1のFc領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第4のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットを提供する。

【0018】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、第2の結合部位の可変ドメインのうちの1つだけを含む。

【0019】

本開示の実施形態において、第1の抗原結合分子は、任意に、さらに以下：

i. 第5のペプチドリンカーと、

ii. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される第2のFc領域から成るか、又はそれらを含み、ここで、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のFc領域サブユニットのN末端は、第6のペプチドリンカーに融合されている。

【0020】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、さらに以下：

i. 第5のペプチドリンカーと

ii. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される第2のFc領域から成るか、又はそれらを含み、ここで、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のFc領域サブユニットのN末端は、第6のペプチドリンカーに融合されている。

【0021】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、任意に、さらに以下：

i. 第3の抗原に特異的な第4の結合部位を含む第3のターゲティング部分から成るか、又はそれを含み、

10

20

30

40

50

ここで、第3のターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して第2の抗原結合分子サブユニットの第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0022】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、さらに以下：

i. 第3の抗原に特異的な第4の結合部位を含む第3のターゲティング部分から成るか、又はそれを含み、

ここで、第3のターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0023】

本開示の一実施形態において、第2のターゲティング部分と第3のターゲティング部分は同一である。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、第2のペプチドリンカーと同一である。

【0024】

本開示の一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。本開示の一実施形態において、ターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。本開示の一実施形態において、第1及び／又は第2及び／又は第3のターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fabである。一実施形態において、第1及び第2のターゲティング部分は、Fabである。一実施形態において、第1、第2及び第3のターゲティング部分は、Fabである。一実施形態において、第1のターゲティング部分は第1のFabであり、第2のターゲティング部分は第2のFabであり、第3のターゲティング部分は第3のFabである。一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインである。

【0025】

一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLドメインのいずれかのN末端に融合されている。一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第2のペプチドリンカーを介して第2の抗原結合分子の第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。一実施形態において、第3のFab重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0026】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原に特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子であって、

第1のFab重鎖のC末端が、第1のペプチドリンカーを介して第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) 下記：

i. 第3の抗原に特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第2のペプチドリンカー、

iii. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域、

iv. 第3のペプチドリンカー、及び

v. 第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

10

20

30

40

50

第2のF a b重鎖のC末端が、第2のペプチドリンカーを介して第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的V H若しくはV LドメインのN末端が、第3のペプチドリンカーを介して第1のF c領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第2のF c領域サブユニットのN末端が、第4のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットを提供する。

【0027】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、任意に、さらに以下：

i. 第5のペプチドリンカーと、

10

ii. 第3及び第4のF c領域サブユニットから構成される第2のF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成される、第2のF c領域から成るか、又はそれらを含み、ここで、

第2の結合部位のV Hド若しくはV LドメインのいずれかのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のF c領域サブユニットのN末端は、第6のペプチドリンカーに融合されている。

【0028】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、さらに以下：

i. 第5のペプチドリンカーと、

20

ii. 第3及び第4のF c領域サブユニットから構成される第2のF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成される、第2のF c領域から成るか、又はそれらを含み、ここで、

第2の結合部位のV Hド若しくはV LドメインのいずれかのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のF c領域サブユニットのN末端は、第6のペプチドリンカーに融合されている。

【0029】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、任意に、さらに以下：

i. 第3の抗原に特異的な第4の結合部位を含む第3のF a b

から成るか、又はそれらを含み、ここで、

ここで、第3のF a b重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して第2のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。

30

【0030】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、さらに以下：

i. 第3の抗原に特異的な第4の結合部位を含む第3のF a b

から成るか、又はそれらを含み、ここで、

ここで、第3のF a b重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して第2のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0031】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1及び第2のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

40

a) 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖を含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のF a bの重鎖と、

ii. 第1のペプチドリンカーと、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV Hドメイン若しくはV Lドメインのいずれか

を含む。

【0032】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1、第2及び第3のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

50

a) 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖を含み、
 b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第1のF a bの重鎖、
 i i. 第1のペプチドリンカー、
 i i i. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれか、

 i v. 第5のペプチドリンカー
 v. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第3のF c領域サブユニット
 を含み、さらに

10

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第6のペプチドリンカーと、
 i i. そのN末端からそのC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第4のF c領域サブユニット
 を含む。

【0033】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第4、第5及び第6のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第4のペプチドリンカー、
 i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第2のF c領域サブユニット
 を含み、

20

b) 第5のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第2のF a bの重鎖、
 i i. 第2のペプチドリンカー、
 i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第1のF c領域サブユニット

30

 i v. 第3のペプチドリンカー、
 v. 第2の結合部位の相補的V H又はV Lドメイン
 を含み、さらに

c) 第6のポリペプチドは、第2のF a bの軽鎖を含む。

【0034】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第4、第5、第6及び第7のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第3のF a bの重鎖、
 i i. 第4のペプチドリンカー、
 i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第2のF c領域サブユニット
 を含み、

40

b) 第5のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
 i. 第2のF a bの重鎖
 i i. 第2のペプチドリンカー
 i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第1のF c領域サブユニット、

 i v. 第3のペプチドリンカー
 v. 第2の結合部位の相補的V H又はV Lドメイン
 を含み、

c) 第6のポリペプチドは、第2のF a bの軽鎖を含み、さらに

50

d) 第7のポリペプチドは、第3のFabの軽鎖を含む。

【0035】

一実施形態において、本開示の抗原結合分子は、図1A、図1B若しくは図1C又は図4Aに描かれるような構造を有する。一実施形態では、第1の抗原結合分子は、図1Aに描かれるような構造を有する。一実施形態では、本開示による第1の抗原結合分子は、図1Bに描かれるような構造を有する。一実施形態では、本開示による第2の抗原結合分子は、図1Cに描かれるような構造を有する。一実施形態では、本開示による第2の抗原結合分子は、図4Aに描かれるような構造を有する。一実施形態において、本開示は、抗原結合分子のセットを提供し、ここで、第1の抗原結合分子は、図1A又は1Bに描かれるような構造を有し、ここで、第2の抗原結合分子は、図1C又は図4Aに描かれるような構造を有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットは、図2A～2F及び図4B～図4に示されるような構造を有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットは、図2Fに示されるような構造を有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットは、図2D～2F並びに図4C及び4Dに示されるような構造を有する。

10

【0036】

本開示の実施形態において、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態では、抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。

【0037】

一実施形態において、第2の結合部位のVH及びVLDメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。一実施形態では、第2の結合部位のVH及びVLDメインは、非共有結合的に互いに結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。

20

【0038】

一実施形態において、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのいずれかと、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VH又はVLDメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。一実施形態では、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのいずれかと、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VH又はVLDメインは、非共有結合的に互いに結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。

30

【0039】

一実施形態において、前記非共有結合は、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのいずれかと、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VH又はVLDメインとの機能的相補性をもたらす。本開示の実施形態では、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのいずれかと、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VH又はVLDメインの非共有結合時に、機能性の第2の結合部位が形成される。

【0040】

一実施形態において、前記非共有結合は溶液中で起こる。一実施形態において、前記非共有結合は、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子が、それらのターゲティング部分を介してそれらの標的抗原に結合すると、起こる。一実施形態において、前記非共有結合は、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子が、同じ細胞上に存在する標的抗原に結合すると、起こる。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、その細胞表面上に第1及び第3の抗原を発現する細胞が存在しない場合には結合しない。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、第1及び第3の抗原の非存在下では結合しない。

40

【0041】

一実施形態において、第2の結合部位のVH及びVLDメインの非共有結合は、第1及び第2の抗原結合分子を二量体化する。一実施形態において、本開示による第1の抗原結

50

合分子及び第 2 の抗原結合分子は、ヘテロマー分子を形成することができる。一実施形態において、前記ヘテロマー分子は、第 1 の抗原結合分子の第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインと、第 2 の抗原結合分子の第 2 の結合の相補的 V H 又は V L ドメインとの結合によって形成される。

【0042】

一実施形態において、第 1 の抗原と第 3 の抗原を発現する細胞が存在する条件下で形成されるヘテロマー分子の量は、そのような細胞が存在しない条件下、又は第 1 の抗原若しくは第 3 の抗原のいずれかを発現する細胞が存在する条件下よりも多い。一実施形態において、第 1 の抗原と第 3 の抗原が存在する条件下で形成されるヘテロマー分子の量は、両抗原が存在しない条件下、又は第 1 の抗原若しくは第 3 の抗原のいずれかが存在する条件下での量よりも多い。一実施形態において、ヘテロマー分子は、三重特異性抗体分子である。

10

【0043】

本開示の実施形態において、第 2 の結合部位の V H 及び V L ドメインの非共有結合は、第 1 の抗原及び第 3 の抗原を発現する細胞が存在する場合に選択的に生じる。本開示の一実施形態において、第 2 の結合部位の V H 及び V L ドメインの非共有結合は、第 1 の抗原及び第 3 の抗原が存在する場合に選択的に生じる。

【0044】

本開示の一実施形態において、第 1 抗原結合分子と第 2 抗原結合分子との間に形成されるヘテロマー分子が、T 細胞を介した細胞の殺傷をリダイレクトする能力は、第 1 抗原及び第 3 抗原を発現する細胞が存在する条件下の方が、そのような細胞が存在しない条件下、又は第 1 抗原若しくは第 3 抗原のみを発現する細胞が存在する条件下よりも高い。

20

【0045】

本開示の一実施形態において、第 2 の結合部位は、F v ドメイン又は F v 領域である。一実施形態では、第 2 の結合部位は、C D 3 に特異的な F v ドメイン又は F v 領域である。一実施形態において、F v ドメインの V H ドメインは、第 1 の抗原結合ドメイン上に存在し、F v ドメインの相補的 V L ドメインが、第 2 の抗原結合ドメイン上に存在するか、又はその逆である。

【0046】

本開示の一実施形態において、第 1 の抗原結合分子の第 2 結合部位が、V H ドメインを含むか、又は V H ドメインである場合、第 2 の抗原結合分子の第 2 の結合部位は、相補的な V L ドメインであるか、又はそれを含み、或いは、第 1 の抗原結合分子の第 2 結合部位が、V L ドメインを含むか、又は V L ドメインである場合、第 2 の抗原結合分子の第 2 の結合部位は、相補的 V H ドメインを含むか、又は V H ドメインである。

30

【0047】

本開示の一実施形態において、第 1 の抗原結合分子は、第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれかを含むが、抗体可変ドメインの両方を含まない。本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれかを含むが、抗体可変ドメインの両方を含まない。

【0048】

本開示の一実施形態では、第 2 の結合部位の V H 及び V L ドメインは、同じ抗体由来である。

40

【0049】

本開示の一実施形態では、第 2 の抗原に対する第 2 の結合部位の結合は、第 1 の抗原及び第 3 の抗原を発現する細胞が存在する条件下において、そのような細胞が存在しないか、又は第 1 の抗原若しくは第 3 の抗原のみを発現する細胞が存在する条件下よりも強い。

【0050】

本開示の一実施形態では、第 2 の抗原に対する第 2 の結合部位の結合は、第 1 の抗原及び第 3 の抗原が存在する条件下において、第 1 の抗原及び第 3 の抗原が存在しないか、又は第 1 の抗原若しくは第 3 の抗原のみが存在する条件下よりも強い。

50

【0051】

本開示の一実施形態において、第2の結合部位のVH単独又はVL単独では、第2の抗原に結合することができない。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子単独では、第2の抗原に結合することができない。本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子単独では、第3の抗原に結合することができない。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子又は第2の抗原結合分子のいずれも単独では、第2の抗原に結合することができない。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子単独では、細胞のT細胞媒介性殺傷をリダイレクトすることができない。本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子単独では、細胞のT細胞媒介性殺傷をリダイレクトすることができない。

【0052】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、ペプチドリンカーの長さは、5～50アミノ酸残基、好ましくは5～29アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、ペプチドリンカーは、5～49アミノ酸残基、好ましくは5～29アミノ酸残基の長さを有する。

【0053】

一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、5、20又は29アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、5アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、29アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、5、9、10、15、19、20、25、29、40、45又は49アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、前記ペプチドリンカーは、5、9、10、15、19、20、25、29、40、45又は49アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、本開示によるペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基だけを含む。一実施形態において、本開示によるペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基だけを含むが、システインは含まない。

【0054】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1及び第3のペプチドリンカーの長さは、5～40アミノ酸残基、好ましくは5～20アミノ酸残基、より好ましくは5及び／又は20アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1及び第3のペプチドリンカーの長さは、10～45アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。

【0055】

一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5～40アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5～40アミノ酸残基、好ましくは5～20アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、10アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、40アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5、10、20又は40アミノ酸残基の長さを有する。

【0056】

一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5～45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、10～45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、10～45アミノ酸残基、好ましくは10～25アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、10アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、25アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、

ーは、45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、10、15、25又は45アミノ酸残基の長さを有する。

【0057】

一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基のみからなる。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基だけを含むが、システインは含まない。

【0058】

一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：GQPSG（配列番号35）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：AQPAAAPAE（配列番号51）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG（配列番号16）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：AQPAAAPDAHEAPAPAQGS（配列番号31）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：AQPAAAPDAHEAPAPAQGS（配列番号52）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：GQPSG（配列番号35）又はGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG（配列番号16）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、以下：GQPSG（配列番号35）、AQPAAAPAE（配列番号51）、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG（配列番号16）、AQPAAAPDAHEAPAPAQGS（配列番号31）及びAQPAAAPDAHEAPAPAQGS（配列番号52）のアミノ酸配列からなる群より選択される。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、そのC末端に、EPKSC（配列番号100）のアミノ酸配列をさらに含む。

【0059】

一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104及び配列番号105からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、配列番号16、配列番号31、配列番号35、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号55、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104及び配列番号105からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、表22に示されるようなアミノ酸配列のいずれかを含む。一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、Fc領域を含まない。

【0060】

一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基、好ましくは20アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、5アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、配列番号16、配列番号31、配列番号35、配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号55からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、表22に示されるようなアミノ酸配列のいずれかを含む。

【0061】

一実施形態において、第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVHドメイン又はVLドメインのいずれかと第3のFc領域サブユニットとの融合は、第5のペプチドリンカーを介して起こる。一実施形態において、第5のペプチドリンカーは、IgGヒンジ又はその一部若しくは断片を含む。一実施形態において、第1の抗原結合分子の第5及び第6のペプチドリンカーは、1つ又は複数の鎖間ジスルフィド架橋を介して連結される。一実施形態において、第1の抗原結合分子の第5及び第6のペプチドリンカーは、第5及び第6のペプチドリンカー間の1つ又は複数の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする1つ又は複数のシステイン残基を含む。一実施形態において、第1の抗原結合分子の第5及び第6

10

20

30

40

50

のペプチドリンカーは、第 5 及び第 6 のペプチドリンカー間の 1 つ又は複数の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする 1 つ又は複数のシステイン残基を含み、これにより、ジスルフィド架橋安定化二量体ペプチドリンカーが得られる。一実施形態において、第 5 及び第 6 のペプチドリンカーは、免疫グロブリンヒンジ配列を含み、これは、好ましくは I g G ヒンジ、好ましくはヒト I g G ヒンジ、好ましくはその断片のヒト I g G 1 ヒンジに由来する。

【0062】

一実施形態において、第 5 のペプチドリンカーは、9 ～ 29 アミノ酸残基、好ましくは 29 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、第 5 のペプチドリンカーは、29 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、第 5 のペプチドリンカーは、20 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、第 6 のペプチドリンカーは、9 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、第 5 のペプチドリンカーは、9 ～ 49 アミノ酸残基、好ましくは 29 アミノ酸残基の長さを有する。

10

【0063】

一実施形態において、第 5 のペプチドリンカーは、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 106、配列番号 54、配列番号 56、及び配列番号 46 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 5 のペプチドリンカーは、以下：A Q P A A P A P D A H E A P A P A Q G S（配列番号 31）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 5 のペプチドリンカーは、以下：K T H T C P P C P（配列番号 32）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第 5 のペプチドリンカーは、以下：A Q P A A P A P D A H E A P A P A Q G S K T H T C P P C P（配列番号 33）のアミノ酸配列を含む。

20

【0064】

一実施形態において、第 6 のペプチドリンカーは、以下：K T H T C P P C P（配列番号 32）のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、第 6 のペプチドリンカーは、以下：D K T H T C P P C P（配列番号 46）のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、第 5 のペプチドリンカーは、A Q P A A P A P D A H E A P A P A Q G S K T H T C P P C P（配列番号 33）のアミノ酸配列を有し、第 6 のペプチドリンカーは、K T H T C P P C P（配列番号 32）のアミノ酸配列を有する。一実施形態では、第 5 のペプチドリンカーは、配列番号 32、配列番号 56、配列番号 54、配列番号 33、配列番号 106 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、第 6 のペプチドリンカーは、配列番号 32 のアミノ酸配列を有する。

30

【0065】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子の第 2 及び第 4 のペプチドリンカーは、2 つ以上の鎖間ジスルフィド架橋を介して連結される。一実施形態において、第 2 の抗原結合分子の第 2 及び第 4 のペプチドリンカーは、第 2 のペプチドリンカーと第 4 のペプチドリンカーの間に 1 つ又は複数の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする 1 つ又は複数のシステイン残基を含む。一実施形態において、第 2 及び第 4 のペプチドリンカーは、第 2 及び第 4 のペプチドリンカー間に 1 つ又は複数の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする 1 つ又は複数のシステイン残基を含み、これにより、ジスルフィド架橋安定化二量体ペプチドリンカーが得られる。一実施形態において、第 2 及び第 4 のペプチドリンカーは、免疫グロブリンヒンジ配列を含み、これは、好ましくは I g G ヒンジ、好ましくはヒト I g G ヒンジ、好ましくはその断片のヒト I g G 1 ヒンジに由来する。

40

【0066】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子の第 2 のターゲティング部分と第 1 の F c 領域サブユニットとの融合は、I g G ヒンジ又はその部分若しくは断片を含むペプチドリンカーを介して起こる。一実施形態において、第 2 のペプチドリンカーは、5 ～ 20 アミノ酸残基、好ましくは 15 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第 2 のペプチドリンカーは、15 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第 2 のペプチドリンカーは、以下：E P K S C D K T H T C P P C P（配列番号 34）のアミ

50

ノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、DKTHTCPPCP（配列番号46）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、KTHTCPPCP（配列番号32）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）のアミノ酸配列を含む。

【0067】

一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基、好ましくは9～15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、9アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、アミノ酸配列：KTHTCPPCP（配列番号32）を含む。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、DKTHTCPPCP（配列番号46）のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、第4のペプチドリンカーは、EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）のアミノ酸配列を含む。

10

【0068】

一実施形態において、第2及び第4のペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基、好ましくは15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第2及び第4のペプチドリンカーは同一である。一実施形態において、第2及び／又は第4のペプチドは、DKTHTCPPCP（配列番号46）、EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）及びKTHTCPPCP（配列番号32）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0069】

一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有し、第4のペプチドリンカーは、9アミノ酸残基又は15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、10アミノ酸残基の長さを有し、第4のペプチドリンカーは、9アミノ酸残基又は15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、5～15アミノ酸残基の長さを有し、第4のペプチドリンカーは、9～15アミノ酸残基の長さを有する。

【0070】

一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）のアミノ酸配列を有し、第4のペプチドリンカーは、KTHTCPPCP（配列番号32）のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、第2のペプチドリンカーは、DKTHTCPPCP（配列番号46）のアミノ酸配列を有し、第4のペプチドリンカーは、KTHTCPPCP（配列番号32）のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、第2のペプチドリンカー及び第4のペプチドリンカーは、EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、第2のペプチドリンカー及び第4のペプチドリンカーは、DKTHTCPPCP（配列番号34）のアミノ酸配列を有する。

30

【0071】

本開示の一実施形態において、第2の結合部位の相補的VH又はVLドメインと第2の抗原結合分子の第1のFc領域サブユニットとの融合は、第3のペプチドリンカーを介して行われる。一実施形態において、第3のペプチドリンカーは、以下：GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGS（配列番号16）のアミノ酸配列を含む。

40

【0072】

本開示の一実施形態において、第1のペプチドリンカーは、5～45アミノ酸残基の長さを有し、第3のペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基の長さを有し、第5のペプチドリンカーは、9～49アミノ酸残基の長さを有し、第2、第4及び第6のペプチドリンカーは、それぞれ5～20アミノ酸残基の長さを有する。

【0073】

本開示の一実施形態において、第1、第2及び／又は第3の結合部位は、抗体Fv領域

50

を含む。一実施形態において、第1、第2及び／又は第3の結合部位は、抗体Fv領域である。本開示の一実施形態において、第2の結合部位は、抗体Fv領域である。本開示の一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインである。

【0074】

本開示の一実施形態において、第1の結合部位と第2の結合部位の間の距離は、30 Å～130 Å、好ましくは45 Å～110 Åである。一実施形態において、第1の結合部位と第2の結合部位の間の距離は、約30 Å、約35 Å、約40 Å、約45 Å、約50 Å、約55 Å、約60 Å、約65 Å、約70 Å、約75 Å、約80 Å、約90 Å、約100 Å、約105 Å、約110 Å、約115 Å、約120 Å、約125 Å、又は約130 Åである。

10

【0075】

一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1の結合部位とVH又はVLドメインのいずれかの間の距離は、30 Å～130 Å、好ましくは45 Å～110 Åである。一実施形態において、第1の結合部位と第1の抗原結合分子のVH又はVLのいずれかの間の距離は、約30 Å、約35 Å、約40 Å、約45 Å、約50 Å、約55 Å、約60 Å、約65 Å、約70 Å、約75 Å、約80 Å、約90 Å、約100 Å、約105 Å、約110 Å、約115 Å、約120 Å、約125 Å、又は約130 Åである。

【0076】

一実施形態において、第3の結合部位と第2の結合部位の間の距離は、120 Å～200 Å、好ましくは120 Å～170 Åである。一実施形態では、第1の結合部位と第2の結合部位との間の距離は、約120 Å、約125 Å、約130 Å、約135 Å、約140 Å、約145 Å、約150 Å、約155 Å、約160 Å、約165 Å、約170 Å、約175 Å、約180 Å、約190 Å、又は約200 Åである。

20

【0077】

一実施形態において、第2の抗原結合分子の第3の結合部位と相補的VH又はVLドメインの間の距離は、120 Å～200 Å、好ましくは120 Å～170 Åである。一実施形態において、第2の抗原結合分子の第3の結合部位と相補的VH又はVLドメインの間の距離は、約120 Å、約125 Å、約130 Å、約135 Å、約140 Å、約145 Å、約150 Å、約155 Å、約160 Å、約165 Å、約170 Å、約175 Å、約180 Å、約190 Å、又は約200 Åである。

30

【0078】

一実施形態において、第1の結合部位と第2の結合部位の間の距離は、30 Å～130 Å、好ましくは45 Å～110 Åであり、第3の結合部位と第2の結合部位の間の距離は、120 Å～200 Å、好ましくは120 Å～170 Åである。一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1の結合部位とVH又はVLドメインのいずれかの間の距離は、30 Å～130 Å、好ましくは45 Å～110 Åであり、第2の抗原結合分子の第3の結合部位と相補的VH又はVLドメインの間の距離は、120 Å～200 Å、好ましくは120 Å～170 Åである。

【0079】

本開示の一実施形態において、第2の抗原は免疫細胞上に発現される。一実施形態において、第2の抗原は、T細胞受容体複合体のメンバーである。一実施形態において、T細胞受容体複合体のメンバーは、CD3である。一実施形態において、第2の抗原は、ヒトCD3である。一実施形態において、第2の抗原は、ヒトCD3εである。一実施形態において、第2の抗原は、配列番号57のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

40

【0080】

本開示の一実施形態において、第2の結合部位は、抗体Fv領域である。本開示の一実施形態において、第2の結合部位は、CD3に対して特異性を備える抗体Fv領域である。一実施形態において、第2の結合部位は、CD3に対して特異的である。一実施形態において、第2の結合部位は、ヒトCD3εに対して特異的である。

【0081】

50

本開示の実施形態において、CD3に対して特異的な第2の結合部位のVHドメインは、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含む。本開示の一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインは、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含む。

【0082】

一実施形態において、(i)第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVHドメインは、配列番号1若しくは配列番号59のアミノ酸配列を含み、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VLドメインは、配列番号2若しくは配列番号60のアミノ酸配列を含むか、又は(ii)第1の抗原結合分子の第2の結合部位のVLドメインは、配列番号2若しくは配列番号60のアミノ酸配列を含み、第2の抗原結合分子の第2の結合部位の相補的VHドメインは、配列番号1若しくは配列番号59のアミノ酸配列を含む。

10

【0083】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインは、配列番号1のアミノ酸配列を含み、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含むか、又はCD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインは、配列番号59のアミノ酸配列を含み、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインは、配列番号60のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含むVLドメインとを有する。

【0084】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含むVHドメインと配列番号2のアミノ酸配列を含むVLドメイン、又は(ii)配列番号59のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号60のアミノ酸配列を含むVLドメインを有する。一実施形態において、CD3に特異的なFv領域は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号2若しくは配列番号60のアミノ酸配列を含むVLドメインを有する。一実施形態において、CD3に特異的なFv領域は、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号2のアミノ酸配列を含むVLドメイン、又は(ii)配列番号59のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号60のアミノ酸配列を含むVLドメインを有する。

20

【0085】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域からなるVHドメインを有するVHドメイン、又は(ii)配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を有するVHドメインを含む。一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、(i)配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を有するVLドメイン、又は(ii)配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を有するVLドメインを含む。

30

【0086】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、以下：

- a) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域；
- b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域；
- c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域；
- d) 配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域；
- e) 配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域；及び
- f) 配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域

を有するVHドメイン及びVLドメインを含む。

40

50

【0087】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、以下：

- a) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域；
- b) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域
- c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域
- d) 配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域
- e) 配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域；及び
- f) 配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域

を有するVHドメイン及びVLドメインを含む。

【0088】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、以下：(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を有するVHドメインと、配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を有するVL、又は(ii) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を有するVHドメインと、配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を有するLCDR3領域を含むVLドメインを含む。

【0089】

一実施形態において、CD3に特異的なFv領域は、以下：(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を有するVHドメインと、配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を有するVL、又は(ii) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を有するVHドメインと、配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を有するLCDR3領域を含むVLドメインを含む。

【0090】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVHドメインを含む。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVLドメインを含む。本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVHドメインを含む。本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVLドメインを含む。

【0091】

本開示の一実施形態において、(i) 第1の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVHドメインを含み、第2の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域の相補的VLドメインを含むか、又は(ii) 第1の抗原結合分子は、配列番号2若しくは配列番号60のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域のVLドメインを含み、第2の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCD3に特異的な抗体Fv領域の相補的VHドメインを含む。

【0092】

本開示の一実施形態において、第1の抗原と第3の抗原は、同じ細胞上に存在する。一

実施形態において、前記細胞は腫瘍細胞である。一実施形態において、第1の抗原及び第3の抗原は、腫瘍関連抗原である。一実施形態において、第1の抗原と第3の抗原は、同じ細胞上に存在し、第2の抗原は、異なる細胞上に存在する。一実施形態において、第1の抗原と第3の抗原は、腫瘍細胞上に存在し、第2の抗原は免疫細胞上に存在する。一実施形態において、第2の抗原は、T細胞上に存在する。一実施形態において、第2の抗原は、CD3である。一実施形態において、第2の抗原は、CD3εである。一実施形態において、第1の抗原と第2の抗原は同一である。一実施形態において、第1の抗原と第3の抗原は同一である。一実施形態において、第1の抗原と第2の抗原は異なる。一実施形態において、第1の抗原、第2の抗原、及び第3の抗原は異なる。

【0093】

10

本開示の一実施形態において、第1の抗原は、第1の抗原エピトープを含む。一実施形態において、第2の抗原は、第2の抗原エピトープを含む。一実施形態において、第3の抗原は、第3の抗原エピトープを含む。本開示の一実施形態において、第1の抗原エピトープと第2の抗原エピトープは、同一である。本開示の一実施形態において、第1の抗原エピトープと第3の抗原エピトープは、同一である。本開示の一実施形態において、第1の抗原エピトープと第2の抗原エピトープは異なる。本開示の一実施形態において、第1の抗原エピトープと第3の抗原エピトープは異なる。本開示の一実施形態において、第1の抗原エピトープ、第2の抗原エピトープ、及び第3の抗原エピトープは異なる。

【0094】

一実施形態において、第1の抗原エピトープは、第2の抗原エピトープよりも細胞表面に近い。一実施形態において、第1の抗原エピトープは、第3の抗原エピトープよりも細胞表面に近い。一実施形態において、第2の抗原エピトープは、第1の抗原エピトープよりも細胞表面に近い。一実施形態において、第3の抗原エピトープは、第1の抗原エピトープよりも細胞表面に近い。一実施形態において、第1の抗原エピトープは、第2の抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い。一実施形態において、第1の抗原エピトープは、第3の抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い。一実施形態において、第2の抗原エピトープは、第1の抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い。一実施形態において、第3の抗原エピトープは、第1の抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い。

【0095】

20

一実施形態において、第1及び第2の抗原エピトープは、細胞表面までの距離が等しい。一実施形態において、第1及び第3の抗原エピトープは、細胞表面までの距離が等しい。一実施形態において、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い。一実施形態において、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第3の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い。一実施形態において、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い。実施形態において、第3の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い。

【0096】

30

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分は、第2の抗原結合分子の第2のターゲティング部分が結合する抗原エピトープよりも細胞表面に近い抗原エピトープに結合する。一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分は、第2の抗原結合分子の第2のターゲティング部分が結合する抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い抗原エピトープに結合する。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分は、細胞表面上の膜近位抗原エピトープに結合し、第2の抗原結合分子は、細胞表面上の膜遠位抗原エピトープに結合する。

【0097】

40

一実施形態において、第2の抗原結合分子の第2のターゲティング部分は、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分が結合する第1の抗原エピトープよりも細胞表面に

50

近い第3の抗原エピトープに結合する。一実施形態において、第2の抗原結合分子の第2のターゲティング部分は、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分が結合する第1の抗原エピトープよりも細胞表面に少なくとも15 Å近い第3の抗原エピトープに結合する。本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子の第1のターゲティング部分は、細胞表面上の膜遠位抗原エピトープに結合し、第2の抗原結合分子は、細胞表面の膜近位抗原エピトープに結合する。

【0098】

本開示の一実施形態において、第1及び／又は第2のFc領域は、第1及び第2のFc領域サブユニット、並びに第3及び第4のFc領域サブユニットの結合を促進する1つ又は複数のアミノ酸修飾を含む。本開示の一実施形態において、各FcドメインサブユニットのCH3ドメインは、第1及び第2のFc領域サブユニット、並びに第3及び第4のFc領域サブユニットの結合を促進するアミノ酸修飾を含む。本開示の一実施形態において、第1及び第2のFcドメインサブユニットの各CH3ドメイン、並びに第3及び第4のFcドメインサブユニットの各CH3ドメインは、それぞれ、第1及び第2のFc領域サブユニット、並びに第3及び第4のFc領域サブユニットの結合を促進するアミノ酸修飾を含む。一実施形態において、第1及び第2のFcドメインサブユニットのCH3ドメイン、並びに第3及び第4のFcドメインサブユニットのCH3ドメインは、それぞれ、第1及び第2のFc領域サブユニット、並びに第3及び第4のFc領域サブユニットの結合を促進するアミノ酸修飾を含む。

【0099】

本開示の一実施形態では、第1及び第2のFc領域サブユニットの結合を促進する1つ又は複数のアミノ酸修飾を含む第1及び第2のFc領域サブユニットを提供する。本開示の一実施形態では、第3及び第4のFc領域サブユニットの結合を促進する1つ又は複数のアミノ酸修飾を含む第3及び第4のFc領域サブユニットを提供する。

【0100】

一実施形態では、第1及び／又は第3のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、EUインデックスに従う番号付けを用いて、366位のトレオニン残基がトリプトファン残基で置換され（T366W）、354位のセリン残基がシステイン残基で置換され（S354C）、さらに、第2及び／又は第4のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、407位のチロシン残基がバリン残基で置換され（Y407V）、366位のトレオニン残基が、セリン残基で置換され（T366S）、368位のロイシン残基がアラニン残基で置換され（L368A）、349位のチロシン残基がシステイン残基により置換される（Y349C）。

【0101】

本開示の一実施形態では、第1及び／若しくは第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対して改変された結合親和性を有するように、且つ／又は改変されたエフェクター機能を有するように操作される。一実施形態において、第1及び／若しくは第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対する結合親和性が高く、且つ／又はエフェクター機能が増加している。一実施形態において、第1及び／若しくは第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対する結合親和性が低く、且つ／又はエフェクター機能が低下している。一実施形態において、第1及び／若しくは第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対する結合親和性が実質的になく、且つ／又はエフェクター機能が実質的でない。一実施形態において、第1及び／若しくは第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対する結合親和性がなく、且つ／又はエフェクター機能がない。

【0102】

本開示の一実施形態では、第1及び第2並びに／又は第3及び第4のFc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1でのEUインデックスに従う番号付けを用いて、L234位、L235位、G237位、A330位、P331位に対応する位置の5つのアミノ酸残

基の少なくとも1つが変異している。一実施形態では、第1及び第2並びに／又は第3及び第4のFc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1でのEUインデックスに従う番号付けを用いて、L234位、L235位、G237位、A330位、P331位に対応する位置の5つのアミノ酸残基の少なくとも1つが変異しており、この場合、第1及び／若しくは第2のFc領域が、野生型ヒトIgG1 Fc領域と比較して、Fc受容体及び／若しくはC1qに対する結合親和性が実質的になく、且つ／又はエフェクター機能が実質的にない。一実施形態では、第1及び第2並びに／又は第3及び第4のFc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1でのEUインデックスに従う番号付けを用いて、L234位、L235位、G237位、A330位、P331位に対応する位置の5つのアミノ酸残基の少なくとも1つが、それぞれA、E、A、S、及びSに変異している。一実施形態では、第1及び第2並びに／又は第3及び第4のFc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1でのEUインデックスに従う番号付けを用いて、L234位、L235位、G237位、A330位、P331位に対応する位置の5つのアミノ酸残基の少なくとも1つが、それぞれ、A、E、A、S、及びSに変異しており、この場合、第1及び／又は第2のFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／又はC1qに対する結合親和性が実質的になく、且つ／又はエフェクター機能が実質的にない。一実施形態では、第1及び第2並びに／又は第3及び第4のFc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1でのEUインデックスに従う番号付けを用いて、L234位、L235位、G237位、A330位、P331位に対応する位置の少なくとも5つのアミノ酸残基が、それぞれ、A、E、A、S、及びSに変異しており、この場合、操作されたFc領域は、野生型Fc領域と比較して、Fc受容体及び／又はC1qに対する結合親和性が実質的になく、且つ／又はエフェクター機能が実質的にない。

10

20

30

40

50

【0103】

一実施形態において、本開示は、医薬品として使用するための、本開示による第1及び第2の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子のセットを提供する。一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセットから構成される多特异性抗体を提供する。一実施形態において、本開示は、本開示による第1及び第2抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子のセットを含むキットを提供する。一実施形態において、本開示は、本開示による第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物、及び本開示による第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を提供する。一実施形態において、本開示は、本開示による第1及び第2の医薬組成物を含むキットを提供する。

【0104】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットに含まれる抗原結合分子は、単離された抗原結合分子である。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットに含まれる抗原結合分子は、組換え抗原結合分子である。一実施形態では、前記抗原結合分子は、単離された組換え抗原結合分子である。

【0105】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、本開示の核酸組成物によってコードされる。一実施形態において、本開示は、本開示の抗原結合分子をコードする核酸組成物を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を提供する。一実施形態において、本開示は、本開示のベクター組成物又は本開示の抗原結合分子をコードする核酸組成物を含む宿主細胞に提供する。一実施形態において、本開示は、本開示の核酸組成物又は本開示の抗原結合分子をコードする本開示のベクター組成物を含む宿主細胞を提供する。一実施形態において、本開示は、宿主細胞を提供し、ここで、宿主細胞は、真核細胞、特に哺乳動物細胞である。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】本開示による(1 1/2)抗原結合分子の設計を示す。

【図1A】本開示による(1 1/2) B027抗原結合分子の構造を示す。この構造は、ターゲティング部分としてN末端Fabを含む。C末端1/2 Fvドメインは、不對VH又はVL抗体ドメインのいずれかによって提供される(図1Aは、不對VLドメインを描く)。不對可変ドメインは、例えば、短いペプチドリンカーを介してFab重鎖のC末端に融合される。

【図1B】本開示によるB036 (Fc-KiH) 1 1/2抗原結合分子の構造を示す。B036フォーマットの基本構造は、B027フォーマットに基づくが、そのC末端に半減期延長部位として組み込まれた二量体Fc領域が追加されている点異なる。B036フォーマットの構造は、ターゲティング部分としてのN末端Fabと、それに続く抗体Fvドメインの不對VH又はVLドメインのいずれかを含む(図1Bは、不對VLドメインを描く)。不對可変ドメインは、そのN末端で、例えば短いペプチドリンカーを介してFab重鎖のC末端に融合され、そのC末端で2つのFc領域サブユニットのうち一方のN末端に融合されている。各Fc領域サブユニットのN末端に存在する2つのペプチドリンカーは、安定化ジスルフィド架橋の形成を可能にする鎖間システインを含んでもよい。2つのFc領域サブユニットを形成するポリペプチド鎖のヘテロ二量体化は、ジスルフィド安定化及びノブ-イントゥ-ホール(knob-into-holes)技術(KiH)の手法による各Fc領域サブユニットのCH3ドメインの修飾によって促進される。

【図1C】本開示による(1 1/2) B038 (Fc-KiH)抗原結合分子の構造を示す。B038フォーマットは、B036フォーマットの代替実施形態を提供する。この場合、全Fc領域が、N末端Fabと抗体Fvドメインの不對VH又はVLドメインの間に組み込まれる(図1Cは、不對VLドメインを描く)。全Fc領域は、Fabと1/2 Fvドメインの間のスペーサとして機能し、また、分子の血清安定性も高める。このフォーマットでは、Fab重鎖は、C末端で、ノブ変異を担持する2つのFc領域サブユニットのうち一方のN末端と融合され、そのC末端で、不對VH又はVLドメインと融合される。各Fc領域サブユニットのN末端に存在する2つのペプチドリンカーは、鎖間システインを含み、2つのリンカー間の安定化ジスルフィド架橋の形成を可能にする。2つのFc領域サブユニットを形成する2つのポリペプチド鎖のヘテロ二量体化は、ジスルフィド安定化及びノブ-イントゥ-ホール技術(KiH)の手法による各Fc領域サブユニットのCH3ドメインの修飾によって促進される。

【図2】本開示のB027、B036及びB038フォーマットの抗原結合分子を組み合わせる様々な例示的可能性を示す。2つの抗原結合分子の機能性組合せを提供するためには、一方の抗原結合分子が、抗体Fvドメインの不對VHドメインを担持すると共に、第2の抗原結合分子が、同じ抗体Fvドメインの相補的な不對VLドメインを担持する必要がある。VH及びVLドメインの非共有結合によって、2つの抗原結合分子がターゲティング部分を介してそれらの標的抗原に結合すると、抗体Fvドメインの機能的相補性及びその形成が達成される。

【図2A】半減期延長部分がないB027フォーマットでの2つの抗原結合分子の組合せを示す。この組合せによって、対称と思われる三重特異性抗体のオンセル形成が起こる。従って、2つのFabターゲティング部分の各々と、新たに形成された抗体Fvドメイン(CD3特異的Fvドメインなど)の間の距離はほぼ同一である。2つのFabは各々、同じ標的細胞上の異なる抗原又は抗原エピトープをターゲティングし得る。新たに形成された抗体FvドメインのCD3結合により、T細胞を標的細胞へとリダイレクトすることができる。2つの抗原結合分子のサイズが小さく、しかも、ターゲティングドメインと新たに形成されたCD3特異的Fvドメインとの間の距離が近いこと、標的細胞と細胞傷害性T細胞との間に狭い免疫シナプスを形成することが可能になり、これは、最適な標的細胞殺傷のための前提条件である。加えて、膜近位エピトープのターゲティングは、従来のIgGフォーマットベースの抗体フォーマットのような、サイズが大きく嵩高い抗体と比

10

20

30

40

50

較して、小さなサイズの分子の方が有利となり得る。

【図 2 B】各々が、半減期延長部分を組み込んだ B 0 3 6 フォーマットの 2 つの抗原結合分子の組合せを示す。この組合せによって、対称と思われる三重特異性抗体のオンセル形成が起こる。従って、2 つの F a b ターゲティング部分の各々と、新たに形成された抗体 F v ドメイン（C D 3 特異的 F v ドメインなど）の間の距離はほぼ同一である。この組合せは、ターゲティングドメインと C D 3 F v 結合ドメイン間の短い距離という点からの最小限 B 0 2 7 フォーマットの利点と、2 つの全 F c 領域の存在による血清安定性の延長を兼ね備える。

【図 2 C】各々が、半減期延長部分を組み込んだ B 0 3 8 における 2 つの抗原結合分子の組合せを示す。この組合せでも、やはり対称と思われる三重特異性抗体のオンセル形成が起こる。従って、2 つの F a b ターゲティング部分の各々と、新たに形成された抗体 F v ドメイン（C D 3 特異的 F v ドメインなど）の間の距離はほぼ同一である。この組合せも、2 つの抗原結合分子の各々に全 F c 領域が存在するため、血清安定性の延長をもたらす。しかし、B 0 2 7 又は B 0 3 6 の組合せと比較して、F a b と新たに形成された（C D 3 特異的な）F v ドメインとの間の距離は大きいいため、標的細胞と細胞傷害性 T 細胞との間に、より広範な免疫シナプスが形成されることになる。

【図 2 D】B 0 2 7 フォーマットの 1 つの抗原結合分子と B 0 3 6 フォーマットの 1 つの抗原結合分子の組合せを示す。この組合せによって、2 つの分子は同一ではないものの、外観はほぼ対称の三重特異性抗体が形成される。しかし、2 つの F a b ターゲティング部分の各々と、新たに形成された抗体 F v ドメイン（C D 3 特異的 F v ドメインなど）の間の距離は同じ範囲内にある（図 2 D は、B 0 3 6 フォーマットの不对 V L ドメインと、B 0 2 7 フォーマットの不对 V H ドメインを描く。しかし、2 つのドメインは、2 つのフォーマット内で交換される可能性もある）。オンセル形成された三重特異性抗体には全 I g G F c 領域が 1 つしか存在しないため、抗体は、従来の I g G 分子と同様の形状に見える。B 0 2 7 と B 0 3 6 フォーマットの組合せにより、B 0 3 6 フォーマットの抗原結合分子の血清安定性が延長される。対照的に、B 0 2 7 フォーマットの分子は、血液から比較的早く排出される。この組合せも、F a b ターゲティング部分と、新たに形成された（C D 3 特異的）F v ドメインの間の距離を短くすることができるため、標的細胞と免疫細胞の間に狭い免疫シナプスが形成される。

【図 2 E】B 0 2 7 フォーマットの 1 つの抗原結合分子と B 0 3 8 フォーマットの 1 つの抗原結合分子の組合せを示す。この組合せによって、非対称と思われる三重特異性抗体のオンセル細胞形成が起こる。これに関して、2 つの F a b ターゲティング部分の各々と、新たに形成された抗体 F v ドメイン（C D 3 特異的 F v ドメインなど）の間の距離はかなり異なっている。この具体的な組合せによって、細胞表面までの距離が異なるエピトープの最適なターゲティングが可能になる（図 2 E は、B 0 3 8 フォーマットの抗原結合分子の不对 V L ドメインと、B 0 2 7 フォーマットの抗原結合分子の不对 V H ドメインを描く。しかし、2 つのドメインは、2 つのフォーマット内で交換される可能性もある）。B 0 3 8 フォーマットの F c 担持抗原結合分子は、より膜近位のエピトープをターゲティングするように選択されることが好ましいのに対し、B 0 2 7 フォーマットで F c を含まない抗原結合分子は、標的細胞上のより膜遠位のエピトープをターゲティングするように選択されることが好ましい。この設定では、B 0 3 8 フォーマットの F c 部分は、その不对可変ドメインを B 0 2 7 フォーマットの抗原結合分子の相補的可変ドメインに接近させるための延長部又はストークとして作用する。

【図 2 F】B 0 3 6 フォーマットの 1 つの抗原結合分子と B 0 3 8 フォーマットの 1 つの抗原結合分子の組合せを示す（図 2 F は、B 0 3 6 フォーマットの抗原結合分子の不对 V L ドメインと、B 0 3 8 フォーマットの抗原結合分子の不对 V H ドメインを描く）。しかし、2 つのドメインは、2 つのフォーマット内で交換される可能性もある）。この組合せによって、非対称と思われる三重特異性抗体のオンセル細胞形成が起こる。従って、2 つの F a b 標的部位の各々と、新たに形成された抗体 F v ドメイン（C D 3 特異的 F v ドメインなど）の間の距離は同じではなく、かなり異なる。この組合せも、細胞表面までの距

10

20

30

40

50

離が異なる2つの異なるエピトープの最適なターゲティングを可能にする。この設定では、B038フォーマットの抗原結合分子が、より膜近位のエピトープをターゲティングするように選択されるのに対し、B036フォーマットの抗原結合分子は、標的細胞上のより膜遠位のエピトープをターゲティングするように選択される。B038フォーマットのFc部分は、その不対可変ドメインをB036フォーマットの抗原結合分子の相補的可変ドメインに近接させるための延長部又はストークとして作用する。

【図3】右パネル：セツキシマブ（アービタックス（Erbitux））のFabフラグメントと複合した上皮成長因子受容体の細胞外ドメインの結晶構造を示す。この構造は、タンパク質構造データバンク（Protein Data Bank）からPDB ID 1YY9で取得した。この構造は、細胞膜に対するその相対的な位置で配向されている。点線の円は、EGFR上のセツキシマブの膜遠位結合領域／エピトープを示す。左側パネル：トラスツズマブ（ハーセプチン（Herceptin））のFabフラグメントと複合したHER2の細胞外ドメインの結晶構造を示す。この構造は、タンパク質構造データバンク（Protein Data Bank）からPDB ID 1N8Zで取得した。この構造は、細胞膜に対するその相対的な位置で配向されている。点線の円は、HER2上のトラスツズマブの膜近位結合領域／エピトープを示す。

【図4】本開示による（21/2）B064（Fc-KiH）抗原結合分子の構造、並びにB064フォーマットの抗原結合分子をB064、B027及びB036フォーマットの抗原結合分子と組み合わせる様々な例示的な可能性を示す。

【図4A】本開示による（21/2）B064（Fc-KiH）抗原結合分子の構造を示す。B064フォーマットは、二価腫瘍ターゲティングが唯一異なるB038フォーマットの代替実施形態を提供する。従って、第2のFab（第1のFc領域サブユニットに融合された第1のFabと同一であるが、そのCHドメインにノブ（knob）変異を有する）が、ホール（hole）変異を有する第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。

【図4B-4D】B064フォーマットの抗原結合分子を、B064フォーマット（図4B）、B027フォーマット（図4C）又はB036フォーマット（図4D）の抗原結合分子と組み合わせる様々な可能性を示す。不対抗体可変ドメインは、抗原結合分子の間で交換される可能性もある。B038フォーマットと同様に、B064フォーマットとB027フォーマット又はB036フォーマットを組み合わせると、非対称と思われる三重特異性抗体のオンセル形成が起こる。この具体的な組合せもやはり、細胞表面までの距離が異なるエピトープの最適なターゲティングを可能にし、例えば、この場合、B064フォーマットの抗原結合分子は、より膜近位のエピトープをターゲティングするように選択され、B027又はB036フォーマットの抗原結合分子は、より膜遠位のエピトープをターゲティングするように選択される。

【発明を実施するための形態】

【0107】

定義

本明細書で使用される「抗原」又は「標的抗原」という用語は、本開示の抗原結合分子に存在する結合部位の1つに結合することができる任意の目的の分子を指す。典型的に、抗原は、ペプチド、タンパク質又は他のタンパク質性分子である。或いは、抗原は、他の有機分子又は無機分子、例えば、炭水化物、脂肪酸、脂質、染料又は蛍光色素であってもよい。

【0108】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指し、特定の長さの生成物を指すものではない。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び非天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。特に指示がない限り、ポリペプチドの特定のアミノ酸配列は、その保存的に修飾された変異体（例えば、或るアミノ酸残基を、類似の構造的及び／又は化学的性質を有する別のアミノ酸残基で置換することにより）も暗黙のうちに包含する。ポリペプチドは、天然の生物由来のものであっても、組換

え技術によって生産されたものであってもよいが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されたものである必要はない。ポリペプチドは、化学合成を含む任意の方法で生成される。

【0109】

本明細書で使用される「抗原結合分子」という用語は、広義には、少なくとも1つの抗原に特異的に結合するタンパク質性分子を指す。抗原結合分子は、1つ以上のポリペプチドから構成され得る。抗原結合分子の例は、免疫グロブリン及びその誘導体及び／又は断片である。本開示による抗原結合分子は、通常の免疫グロブリン（例えばIgG）ベース、特に半IgG分子からなるものであってよい。本明細書に開示されるような抗原結合分子は、少なくとも1つのターゲティング部分（抗体Fabフラグメントなど）と、抗体Fvドメインの付加的なVH又はVLドメインのいずれかとから構成され、ここで、VH又はVLドメインのいずれも、単独ではその抗原に結合することができない。従って、本開示による抗原結合分子は、半Fvドメイン（1／2Fvドメイン）又は半分の結合部位と、1つ若しくは2つのFvドメイン又は全結合部位を組み込んでいるため、1 + 1／2又は1 1／2抗原又は2 + 1／2又は2 1／2抗原結合分子とも表記され得る。

10

【0110】

本明細書で使用される用語「ターゲティング部分」は、抗原に特異的に結合することができる任意のポリペプチド又はタンパク質を指す。本開示による抗原結合分子で使用するすることができるターゲティング部分の非限定的な例としては、抗体又は抗体フラグメント、サイトカイン、又は受容体に対するリガンドがある。

20

【0111】

本明細書で使用される場合、「結合部位」又は「抗原結合部位」という用語は、抗原に結合又は特異的に結合することができるタンパク質によって形成される構造を指す。結合部位は、一連の連続したアミノ酸である必要はなく、単一のポリペプチド鎖中のアミノ酸であってもよい。例えば、2つの異なるポリペプチド鎖から産生されるFvでは、結合部位は、抗原と相互作用するVL及びVHの一連のアミノ酸から構成されるが、一般に、各可変領域の1つ又は複数のCDRにそれらが常にあるわけではない。特定の実施形態において、結合部位は、相補的抗体可変重鎖（VH）及び軽鎖（VL）対であるか、又はこれを含むか、或いはこれによって形成される。結合部位を形成するVH及びVLは、単一のポリペプチド鎖又は異なるポリペプチド鎖のいずれにも存在し得る。好ましい実施形態において、結合部位は、本開示による第1の抗原結合分子上に存在するVHと、本開示による第2の抗原結合分子上に存在する相補的VL、若しくはその逆であるか、又はそれらを含むか、或いはそれらによって形成される。一部の実施形態において、結合部位は、1つのVHと1つのVLを有する。特定の実施形態において、結合部位は、抗体の1つ以上のCDRからなる。他の実施形態において、結合部位は、例えば、アフィボディ分子、アルファボディ、アンチカリン、アビマー、DARPin、フィノマー、クニツドメインペプチド、ヘリックスターン-ヘリックスペプチド、又はモノボディなどの抗体ミメティクに由来する。

30

【0112】

本明細書で使用される「抗体」分子又は「免疫グロブリン」（Ig）分子という用語は、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含み、抗原と相互作用するタンパク質を指す。各重鎖（HC）は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略記する）及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、CH1、CH2、CH3の3つのドメインから構成される。各軽鎖（LC）は、軽鎖可変ドメイン（本明細書ではVLと略記）と軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから構成される。VH及びVLドメインは、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化され、その間に、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる高度に保存された領域が点在している。各VH及びVLは、3つのCDRと4つのFRから構成され、それらは、N末端からC末端まで、以下の順序で配列されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4。重鎖及び

40

50

軽鎖の可変ドメイン（VH及びVL）は、抗原と選択的に相互作用するか、又は結合する「結合部位」若しくは「抗原結合部位」を含むか、又はそれを形成する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1の成分（Clq）をはじめとする、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。「抗体」という用語には、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体が含まれる。抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスのものであり得る。軽鎖及び重鎖のいずれも、構造的及び機能的に相同性の領域に分けられる。

【0113】

本明細書で使用される「抗体フラグメント」という用語は、抗原と特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、空間分布の安定化によって）能力を保持する抗体の1つ以上の部分を指す。抗体フラグメントの例としては、限定されないが、VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価フラグメントであるFabが挙げられ、ここで、Fab重鎖（HC）は、VH及びCH1ドメイン（VH-CH1）により形成され、Fab軽鎖は、相補的なVL及びCLドメイン（VL-CL）によって形成される。従って、Fab重鎖とFab軽鎖は、互いに対して相補的である；F(ab)₂、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabを含む二価フラグメント；VHとCH1ドメインから成るFdフラグメント；1つのVLと1つのVHドメインの二量体から成るFvフラグメント又はFv領域又はFvドメイン。従って、Fvフラグメント又はFv領域のVH及びVLドメインは、互いに対して相補的である；VHドメインから成るdAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546）；及び単離された相補性決定領域（CDR）。さらに、Fvフラグメント又はFv領域の2つの可変ドメインは、個別の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を用い、合成リンカーにより結合することができ、上記合成リンカーは、上記ドメインが、VL領域及びVH領域が対合して、一価分子を形成する単一タンパク質鎖（本明細書中で「単鎖Fv」又は「scFv」と称される；例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426；及びHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883）として作製されるのを可能にする。このような一本鎖抗体も「抗体フラグメント」という用語に包含されることが意図される。抗体フラグメントは、当業者には周知の従来の技術を用いて得られ、インタクトな抗体と同様の方法で、有用性についてスクリーニングされる。抗体フラグメントは、シングルドメイン抗体、マキシボディ（maxibody）、ミニボディ（minibody）、細胞内抗体（intrabodies）、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ（triabody）、テトラボディ（tetraabodies）、v-NAR及びビス-scFvに組み込むこともできる（例えば、Hollinger and Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136を参照）。抗体フラグメントは、フィブロネクチンIII型（Fn3）などのポリペプチドに基づくスカフォールド中に移植することができる（フィブロネクチンポリペプチドモノボディについて記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。抗体フラグメントは、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合部位のペアを形成するタンデムFvセグメントのペア（VH-CH1-VH-CH1）を含む一本鎖分子に組み込むことができる（Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8: 1057-1062；及び米国特許第5,641,870号明細書）。

【0114】

本明細書で使用される免疫グロブリン（Ig）「ヒンジ」という用語は、免疫グロブリンの二量体「ヒンジ領域」を形成する2つのポリペプチドのうちの1つを指す。ヒンジは、CH1ドメインをCH2ドメインに結合させる免疫グロブリン重鎖の部分を含む。従って、天然に存在する免疫グロブリンは、2つの同一のヒンジから構成され、これらのヒン

10

20

30

40

50

ジは、2つのヒンジに存在する鎖間システインによって形成される1つ又は複数のジスルフィド架橋を介して連結される。言い換えれば、天然に存在する免疫グロブリンは、免疫グロブリンの2本のFabアームをFc領域に結合させる、二量体ジスルフィド安定化ヒンジ領域から構成される。ヒンジは、3つの異なるドメイン、即ち、上ヒンジ、中ヒンジ、下ヒンジにさらに区分することができる(Roux et al., J. Immunol. 1998 161:4083)。

【0115】

本明細書で使用される「Fc領域」という用語は、互いに安定に会合し、それにより、免疫グロブリンの二量体C末端領域を形成することができる2つのFc領域サブユニットを意味する。従って、2つのFc領域サブユニットは互いに相補的である。通常のIgG分子又は本開示による抗原結合分子のFc領域は二量体として存在し、その各サブユニットはCH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む。Fc領域の2つのサブユニットは、互いに安定な結合が可能である。

10

【0116】

本明細書で使用される「Fc領域サブユニット」とは、本開示による免疫グロブリン又は抗原結合分子の二量体Fc領域を形成する2つのポリペプチドのうちの1つを指す。(即ち、安定な自己会合が可能な、免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチド)。従って、二量体Fc領域を形成する2つのFc領域サブユニットは、互いに相補的である。例えば、IgG Fc領域サブユニットは、IgG CH2及びIgG CH3定常ドメインを含む。この用語は、ネイティブ又は野生型配列Fc領域サブユニットと、変異型又は改変Fc領域サブユニットを包含する。IgG重鎖のFc領域サブユニットの境界は若干変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域サブユニットは通常、Cys226から、又はPro230から、重鎖のC末端まで延在すると定義される。しかし、Fc領域サブユニットのC末端リジン(Lys447)は存在してしなくてもよい。本明細書で特に指定されない限り、Fc領域のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EU番号付けシステム(EUインデックスとも呼ばれる)に従う。

20

30

【0117】

多重特異性という用語は、抗体又は抗原結合分子が、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。一般的に、多重特異性抗体又は抗原結合分子は、2つ以上の抗原結合部位を含み、各々が異なる抗原又はエピトープに対して特異的である。「二重特異性」という用語は、抗体又は抗原結合分子が、2つの異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。通常、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原結合部位を有し、各々が異なる抗原又はエピトープに対して特異的である。

【0118】

本明細書で使用される用語「に特異的に結合する」、「に特異的に結合する」、「に対して／について特異的である」、又は「特異的に認識する」などは、標的抗原と本明細書に開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子との結合のような、測定可能で再現可能な相互作用を指し、これは、生物学的分子を含む分子の不均質な集団の存在下で標的抗原の存在を決定するものである。例えば、標的抗原(抗原又は抗原のエピトープであり得る)に特異的に結合する、本明細書に開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、他の標的抗原に結合するよりも高い親和性、結合活性で、より容易に、且つ／又はより長い持続時間で、この標的に結合する抗体、抗体フラグメント若しくは抗原結合分子である。特定の実施形態において、抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、異なる種由来のタンパク質間で保存されているタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、必要とするわけではない。本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、抗原に特異的に

40

50

結合する。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、標準的なE L I S Aアッセイが挙げられる。スコアリングは、標準的な発色現象（例えば、西洋ワサビペルオキシドを用いた二次抗体及び過酸化水素を用いたテトラメチルベンジジン）によって実施することができる。特定のウェルでの反応は、例えば450nmでの、光学濃度によってスコアリングされる。典型的なバックグラウンド（＝陰性反応）は、0.1ODであってよく；典型的な陽性反応は、1ODであってよい。このことは、陽性／陰性の差が5倍を超え得ることを意味する。一般に、通常、結合特異性の決定は、単一の参照抗原ではなく、粉乳、B S A、トランスフェリンなどの、3～5種類の非関連抗原のセットを用いて実施する。

【0119】

「エピトープ」又は「抗原エピトープ」という用語は、本明細書に開示する抗体、抗体フラグメント若しくは抗原結合分子、又はT細胞受容体によって特異的に認識されるか、或いはそうでなければ1分子と相互作用する、ポリペプチド又はタンパク質上の1部位（例えば、アミノ酸の連続した区間、又は非連続アミノ酸残基の異なる領域からなる立体構造的配置）を指す。一般に、エピトープは、アミノ酸又は炭水化物若しくは糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面集団に属し、概して、特定の三次元構造特性、並びに特定の電荷特性を有し得る。当業者には理解されるように、抗体又は抗原結合分子が特異的に結合できるものであれば、実質的にあらゆるものがエピトープとなり得る。エピトープは、抗体又は抗原結合分子が結合する残基を含むことができ、「線状」又は「立体構造的」のいずれであってもよい。「線状エピトープ」とは、タンパク質と相互作用分子（抗体など）との相互作用の地点がすべて、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って線状（連続的）に存在するエピトープを指す。「立体構造エピトープ」とは、不連続なアミノ酸残基が三次元的な空間配置で集合したエピトープを指す。立体構造エピトープの場合、相互作用の地点は、互いに離れたタンパク質上のアミノ酸残基全体に存在する。例えば、エピトープは、ペプチドマッピング又はH D Xにより示されるようなアミノ酸残基の区間内の1若しくは複数のアミノ酸残基、或いはX線結晶構造解析により示されるような1若しくは複数の個別のアミノ酸残基であり得る。「同じエピトープに結合する」とは、抗体又は抗原結合分子を比較するために同じエピトープマッピング技術を用いた場合に、抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子が特定の抗原に結合し、例示される抗体又は抗原結合分子と同じエピトープに結合する能力を意味する。例示される抗体、抗原結合分子、他の抗体及び抗原結合分子のエピトープは、エピトープマッピング技術を用いて決定することができる。エピトープマッピング技術は、当技術分野でよく知られている。例えば、立体構造エピトープは、例えば、水素／重水素交換、X線結晶学及び二次元核磁気共鳴などによって、アミノ酸の空間配置を決定することにより容易に同定される。

【0120】

本明細書で使用される「操作（された）」又は「修飾（された）」という用語は、合成手段（例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、ペプチドの酵素的若しくは化学的カップリング、又はこれらの技術のいくつかの組合せ）による核酸又はポリペプチドの操作を含む。好ましくは、本開示による抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、抗原結合、安定性、半減期、エフェクター機能、免疫原性、安全性などの1つ又は複数の特性を改善するように操作又は修飾される。

【0121】

本明細書で使用される「価」という用語は、抗原結合分子中の規定数の抗原結合部位の存在を示す。

【0122】

本明細書で使用される場合、F a b領域及び／若しくはF v領域、F c領域、F c領域サブユニット、ペプチドリンカー、スペーサ又はポリペプチドなどに関して「第1」、「第2」、「第3」、「第4」、「第5」、並びに「第6」及び「第7」という用語は、各タイプの成分が2つ以上存在する際に、識別するために使用される。これらの用語の使用は、明示的に記載されていない限り、抗原結合分子内に特定の順序又は配向を付与するこ

10

20

30

40

50

とを意図するものではない。

【0123】

「第1及び第2のFc領域サブユニットの結合を促進する修飾」とは、Fc領域サブユニットを含むポリペプチドと同一のポリペプチドとが結合して、ホモ二量体を形成するのを低減又は防止する、Fc領域サブユニットのポリペプチド骨格又は翻訳後修飾の操作である。本明細書で使用される結合を促進する修飾は、特に、結合することが望まれる2つのFc領域サブユニット（即ち、第1及び第2のFc領域サブユニット）の各々に施される個別の修飾を含み、ここで、修飾は、2つのFc領域サブユニットの結合を促進するように互いに相補的である。例えば、結合を促進する修飾は、Fc領域サブユニットの一方若しくは両方の構造又は電荷を改変して、それらの結合をそれぞれ立体的又は静電的に好ましくすることができる。従って、第1のFc領域サブユニットを含むポリペプチドと、第2のFc領域サブユニットを含むポリペプチドとの間でヘテロ二量体化が起こるが、これらは、サブユニットの各々に融合した別の成分（例えば、Fab、Fv）が同じではないという意味で同一ではないと考えられる。

10

【0124】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸残基」又は「アミノ酸」は、そのフルネーム、又は標準的な3文字若しくは1文字のアミノ酸コードのいずれかによって示される。「天然に存在するアミノ酸」とは、以下のアミノ酸を意味する：

【0125】

20

30

40

50

【表 1】

表 1: 天然に存在するアミノ酸

アミノ酸	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【0126】

本明細書で使用する「アミノ酸変異」という用語は、アミノ酸の置換、欠失、挿入、及び修飾を包含することを意味する。最終構築物が所望の特性、例えば、Fc受容体への結合の低減、又は別のペプチドとの結合の増大などを有する限り、置換、欠失、挿入及び修飾の任意の組合せを行うことができる。アミノ酸配列の欠失及び挿入には、アミノ酸残基のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端の欠失及び挿入が含まれる。具体的なアミノ酸変異は、アミノ酸置換である。アミノ酸置換としては、天然に存在しないアミノ酸による置換、又は20の標準アミノ酸の天然に存在するアミノ酸誘導体による置換が挙げられる。アミノ酸変異は、当技術分野で公知の遺伝学的又は化学的方法を用いて生成することができる。遺伝学的方法としては、部位特異的突然変異誘発、PCR、遺伝子合成などが挙げられる。遺伝子工学以外の方法、例えば、化学修飾によって、アミノ酸残基の側鎖基を改変する方法もまた有用であると考えられる。本明細書では、同じアミノ酸変異を示すのに

様々な呼称が使用され得る。例えば、Fc領域の327位のグリンス (glynce) からアラニンへの置換は、237A、G337、G337A、又はGly329Alaとして表示され得る。

【0127】

「医薬組成物」という用語は、その中に含有される有効成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であり、しかも、その製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒な追加成分を含まない製剤を指す。

【0128】

本明細書で使用される「処置（治療）」、「処置（治療）する」又は「処置（治療）する（こと）」などは、処置される個体の疾患の自然な経過を変化させようとする臨床的介入を意味し、予防の目的で、又は臨床病理の経過中に実施することができる。処置の望ましい効果としては、限定されないが、疾患の発生又は再発の防止、症状の緩和、疾患の直接的若しくは間接的な病理学的結果の軽減、転移の阻止、疾患の進行速度の低下、病態の改善又は緩和、並びに寛解又は予後の改善が挙げられる。一部の実施形態において、本開示による抗原結合分子は、疾患の発症を遅らせるため、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0129】

用語「エフェクター機能」は、本開示による抗体又は抗原結合分子のFc領域に起因する生物学的活性を指し、これは、抗体のアイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害性 (CDC) ; Fc受容体結合及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (ADCC) ; 食作用 ; 細胞表面受容体 (例えば、B細胞受容体) の下方制御 ; 並びにB細胞の活性化が挙げられる。

【0130】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又は「ADCC」とは、細胞傷害性の形態を指し、この場合、特定の細胞傷害性細胞 (例えば、NK細胞、好中球、及びマクロファージ) 上に存在するFc受容体 (FcR) に結合した本開示の抗体又は抗原結合分子は、こうした細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原担持標的細胞に特異的に結合した後、細胞毒素で標的細胞を殺傷することを可能にする。ADCCを媒介する主要細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。

【0131】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」とは、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系の第1成分 (C1q) が、(適切なサブクラスの) 抗体又は本開示の抗原結合分子に結合することによって開始される。

【0132】

「抗体依存性細胞貪食」又は「ADCP」とは、マクロファージ又は樹状細胞などの貪食細胞による内在化によって、抗体被覆標的細胞又は抗原結合分子被覆標的細胞を排除するメカニズムを指す。

【0133】

用語「阻害」若しくは「阻害する」又は「低減（抑制）」若しくは「低減（抑制）する」又は「中和」若しくは「中和する」は、任意の表現型特性 (結合、生物学的活性若しくは機能など) の減少又は停止、或いはその特性の発生率、程度、若しくは可能性の減少又は停止を意味する。「阻害」、「低減」又は「中和」は、適切なアッセイを用いて検出可能である限り、完全である必要はない。一部の実施形態では、「低減する」又は「阻害する」とは、20%以上の減少をもたらす能力を意味する。別の実施形態において、「低減する」又は「阻害する」とは、50%以上の減少をもたらす能力を意味する。さらに別の実施形態では、「低減する」又は「阻害する」とは、75%、85%、90%、95%、又はそれ以上の全体的な減少をもたらす能力を意味する。

【0134】

本明細書で使用される「ヒト抗体」又は「ヒト抗体フラグメント」は、フレームワーク

10

20

30

40

50

及びCDR領域の両方が、ヒト由来の配列に由来する可変領域を有する抗体及び抗体フラグメントを含む。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域もそのような配列に由来する。ヒト起源としては、例えば、ヒト生殖細胞系列配列、又はヒト生殖細胞系列配列の変異バージョン、又は、例えば、Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86)に記載されているようなヒトフレームワーク配列解析から得られたコンセンサスフレームワーク配列を含む抗体が挙げられる。免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDRの構造及び位置は、周知の番号付けスキーム、例えば、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキーム、又はKabatとChothiaの組合せを用いて定義することができる(例えば、以下を参照されたい: Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U. S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; 並びにAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948。ヒト抗体及びヒト可変領域は、合成ライブラリー又はトランスジェニックマウス(例えば、ゼノマウス)から単離することも可能であるが、但し、その場合、それぞれの系が、フレームワーク及びCDR領域のいずれもヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を産生することが条件となる。

10

20

30

40

50

【0135】

「キメラ抗体」又は「キメラ抗体フラグメント」という用語は、本明細書において、或る種に存在する配列に由来するか、又はそれに対応する定常抗体領域と、他の種に由来する可変抗体領域とを有する抗体として定義される。好ましくは、定常抗体領域はヒトに存在する配列に由来するか、又はそれに対応し、可変抗体領域(例えばVH、VL、CDR若しくはFR領域)は、ヒト以外の動物、例えばマウス、ラット、ウサギ又はハムスターに存在する配列に由来する。

【0136】

「ヒト化抗体」又は「ヒト化抗体フラグメント」とは、本明細書では、ヒト起源の配列に由来する定常抗体領域と、可変抗体領域若しくはその部分を有するか、或いは、CDRのみが別の生物種に由来する抗体分子として定義される。ヒト化は、限定はされないが、以下：(a) 非ヒト(例えば、ドナー抗体) CDRをヒト(例えば、レシピエント抗体) フレームワーク及び定常領域に、重要なフレームワーク残基(例えば、良好な抗原結合親和性若しくは抗体機能を保持するのに重要な残基)を保持したまま、又は保持せずに移植すること、(b) 非ヒト特異性決定領域(SDR若しくはa-CDR; 抗体-抗原相互作用に重要な残基)のみをヒトフレームワーク及び定常領域に移植する、又は(c) 非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によりヒト様セクションでそれらを「覆う」ことを含め、様々な方法で達成することができる。ヒト化抗体及びその作製法については、例えば、Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)に概説されており、さらに、例えば以下の文献にも記載されている: Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); 米国特許第5, 821, 337号明細書、同第7, 527, 791号明細書、同第6, 982, 321号明細書、及び同第7, 087, 409号明細書; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl

Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al, Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31 (3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (SDR(a-CDR) 移植について記載する); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (「リサーフェイシング」について記載する); Dall'Acqua et al, Methods 36, 43-60 (2005) (「FRシャフリング」について記載する); 並びに Osbourn et al, Methods 36, 61-68 (2005) 及び Klimka et al, Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (FRシャフリングのための「誘導選択 (guided selection)」を記載する)。

10

【0137】

「単離された」という用語は、異なる抗原特異性を有する他の抗体、抗体フラグメント、又は抗原結合分子を実質的に含まない、抗体、抗体フラグメント、又は抗原結合分子などの化合物を指す。さらに、単離抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まないものであってもよい。従って、一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、異なる特異性を有する抗体又は抗原結合分子から分離された、単離抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子である。単離抗体又は抗原結合分子は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子であってもよい。単離抗体、抗体断片又は抗原結合分子は、組換えモノクローナル抗体、抗体断片又は抗原結合分子であってもよい。但し、標的のエピトープ、アイソフォーム又は変異体に特異的に結合する単離抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、他の関連抗原、例えば、他の種由来の抗原（例えば、種のホモログ）に対して交差反応性を有する場合がある。

20

【0138】

「組換え抗体」、「組換え抗体フラグメント」又は「組換え抗原結合分子」という用語は、本明細書で使用される場合、自然界に存在しない手段によって調製、発現、作製又は分離された、本開示によるあらゆる抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子を含む。例えば、抗体又は抗原結合分子を発現するように形質転換された宿主細胞から単離された抗体又は抗原結合分子、組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから選択及び単離された抗体、並びにヒト免疫グロブリン遺伝子、配列の全部又は一部を他のDNA配列にスプライシングすることを含むいずれか他の手段によって調製、発現、作製若しくは単離された抗体、或いはヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニック若しくは染色体改変 (transchromosomal) である動物（例えば、マウス）又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体。好ましくは、このような組換え抗体又は抗原結合分子は、フレームワーク及びCDR領域がヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、特定の実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（又は、ヒトIg配列のトランスジェニック動物が使用される場合は、インビボ体細胞変異誘発）に付すことができ、従って、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列のVH及びVL配列に由来し、それに関連しているものの、インビボでヒト抗体生殖細胞系列レパトア内に天然には存在しないと考えられる配列である。組換え抗体又は抗原結合分子は、組換えモノクローナル抗体又は組換えモノクローナル抗原結合分子であってもよい。一実施形態では、本明細書に開示される抗体及び抗体フラグメントは、米国特許第13/321,564号明細書又は同第13/299,367号明細書に開示されるYlantia（登録商標）抗体ライブラリーから単離される。

30

40

【0139】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」、「モノクローナル抗体フラグメント」又は「モノクローナル抗原結合分子」という用語は、任意の真核生物、原核生物、

50

又はファージクローンを含む単一のクローンに由来する、本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント、又は抗原結合分子を指し、それが生産される方法ではない。モノクローナル抗体又は抗体フラグメントは、Kohler et al.; Nature, 256: 495 (1975)に記載されているようにハイブリドーマ法によって作製することもできるし、又はファージライブラリーから単離することもできる。クローン細胞株並びにそれによって発現される本明細書に開示されるモノクローナル抗体又は抗原結合分子を調製する他の方法は、当技術分野で公知である（例えば、Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New Yorkを参照されたい）。

10

【0140】

薬剤、例えば医薬組成物の「治療有効量」又は「有効量」とは、所望の治療又は予防上の結果を達成するのに必要な投与量及び期間で有効な量を指す。治療有効量の薬剤は、例えば、疾患の副作用を排除し、低減し、遅延させ、最小化するか、又は予防する。

【0141】

「投与される」又は「投与」は、例えば、静脈内、筋肉内、皮内若しくは皮下経路又は粘膜経路などの注射可能な形態、例えば、吸入用の鼻腔スプレー又はエアロゾルとして、又は摂取可能な溶液、カプセル若しくは錠剤としての薬剤の送達を含むが、これらに限定されない。好ましくは、投与は注射可能な形態である。

【0142】

「薬学的に許容される担体」という用語は、有効成分以外の医薬組成物中の成分であって、対象に対して無毒であるものを指す。薬学的に許容される担体としては、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存料が挙げられる。

20

【0143】

「対象」若しくは「種」又はこの文脈で使用されるものは、マウス又はラットなどのげっ歯類、及びカニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル (*Macaca mulatta*) 又はヒト (*Homo sapiens*) などの霊長類を含む任意の哺乳類を指す。好ましくは、対象は、霊長類であり、最も好ましくはヒトである。

【0144】

「野生型」タンパク質とは、自然界に存在するタンパク質のバージョン又は変異体である。野生型タンパク質のアミノ酸配列、例えばヒトIgG1抗体のFc領域は、自然界に存在するタンパク質のアミノ酸配列である。アロタイプの違いにより、1野生型タンパク質のアミノ酸配列は、2つ以上存在する可能性がある。例えば、天然に存在するヒトIgG1重鎖定常領域にはいくつかのアロタイプが存在する（例えば、Jeffries et al. (2009) mAbs 1:1参照）。

30

【0145】

本明細書で使用される「IC₅₀」という用語は、アッセイにおいて最大応答とベースラインの中間で応答を阻害する抗原結合分子セットの濃度を指す。これは、所与の応答を50%抑制する上記抗原結合分子セットの濃度を表している。

40

【0146】

本明細書で使用される場合、「非共有結合」とは、原子間結合を伴わない分子間相互作用を指す。非共有結合性相互作用は、例えば、イオン結合、水素結合、疎水性相互作用、及びファンデルワールス力を含む。

【0147】

本明細書で使用される場合、「共有結合」とは、電子の共有を特徴とする原子間結合を指す。

【0148】

本明細書で使用されるように、用語「約」は、具体的な記載の数値に関連して使用される場合、その値が言及された値からわずか1%ほど変動し得ることを意味する。例えば、

50

本明細書では、「約 100」という表現は、99と101、及びその間のすべての値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4など）を含む。

【0149】

実施形態

本明細書には、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子の組合せ又はセットが提供され、ここで、2つの抗原結合分子の各々は、T細胞抗原、例えば、CD3に特異的な抗体Fvドメインの不對VL又はVHドメインのいずれかに、ペプチドリッカーを介して融合した、標的抗原若しくは抗原エпитープに対して特異性を有するターゲティング部分から構成される。2つの抗原結合分子の各々に存在する不對（若しくは分断）VL又はVHドメインは、T細胞抗原に単独では結合することができない。しかし、両抗原結合分子が、それらのターゲティング部分を介して、1細胞の表面に発現したそれらの抗原若しくは抗原エпитープに結合すると、不對VL及びVHドメインが接近し、互いに相互作用して、元の抗体Fvドメインを再構成する。このようにしてオンセル形成された三重特異性ヘテロ二量体抗体分子は、再集合又は新しく形成されたFvドメインがCD3に特異的である場合、標的細胞の破壊のためにT細胞を誘導及び刺激することができる。

10

【0150】

一実施形態では、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1のターゲティング部分

20

ii. 第1のペプチドリッカー、及び

iii. 第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープに特異的な抗体FvドメインのVH若しくはVLドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは抗原エпитープに特異的な第2のターゲティング部分、

ii. 第2のペプチドリッカー、及び

iii. 第2の抗原若しくは抗原エпитープに特異的な抗体Fvドメインの相補的VH若しくはVLドメイン

から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子

30

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットを提供する。

【0151】

一実施形態では、第1及び第2抗原結合分子は、共有結合的に結合されていない。一実施形態では、第1抗原結合分子と第2抗原結合分子は、共有結合によって結合されていない。

【0152】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子の抗体FvドメインのVH又はVLドメインのいずれかと、第2の抗原結合分子の相補的VH又はVLドメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第2の抗原又は第2の抗原エпитープに特異的な抗体Fvドメインを形成する。一実施形態において、前記VH及びVLドメインの非共有結合は、第2の抗原又は第2の抗原エпитープに特異的な抗体Fvドメインの機能的相補性をもたらす。一実施形態において、前記VH及びVLドメインの非共有結合は、第2の抗原又は第2の抗原エпитープに特異的な抗体Fvドメインの形成をもたらす。一実施形態において、前記抗体Fvドメインは、CD3に特異的である。一実施形態において、前記第2の抗原は、CD3であり、好ましくはCD3εである。

40

【0153】

本開示の一本開示の実施形態において、VHドメインとVLドメインの非共有結合、及び／又は第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープに特異的な抗体Fvドメインの形成は、好ましくは、第1及び第2の抗原結合分子が同じ細胞上のそれらの標的抗原に結合し、相補的なVL及びVHドメインが接近すると、起こる。本開示の一実施形態において、V

50

H及びV Lドメインの前記非共有結合は、第1の抗原又は第1の抗原エпитープ及び第3の抗原又は第3の抗原エпитープを発現する細胞が存在する場合に選択的に起こる。一実施形態において、V H及びV Lドメインの前記非共有結合は、第1の抗原又は第1の抗原エпитープ及び第3の抗原又は第3の抗原エпитープを発現する細胞が存在し、且つ、両抗原結合分子が上記細胞上の抗原又は抗原エпитープに結合している場合に選択的に起こる。一実施形態では、前記非共有結合的結合により、第1抗原結合分子及び第3抗原結合分子が二量体化され、三重特異性ヘテロマー抗体が形成される。

【0154】

一実施形態において、前記三重特異性ヘテロマー抗体分子の形成は、細胞上で起こる。
一実施形態において、前記三重特異性ヘテロマー抗体分子の形成は、インビボで起こる。
一実施形態において、前記三重特異性ヘテロマー抗体分子の形成は、インビトロで起こる。
一実施形態において、前記三重特異性ヘテロマー抗体分子の形成は、前記第1の抗原又は第1の抗原エпитープ及び前記第3の抗原又は第3の抗原エпитープが存在すると、起こる。

10

【0155】

一実施形態において、前記オンセル形成された三重特異性ヘテロ二量体抗体は、第1の抗原又は第1の抗原エпитープに対する一価結合、第3の抗原又は第3の抗原エпитープに対する一価結合、及び第2の抗原又は第2の抗原エпитープに対する一価結合を有する。

【0156】

一実施形態において、前記オンセル形成三重特異性ヘテロ二量体抗体は、第1の抗原又は第1の抗原エпитープに対する一価結合、第3の抗原又は第3のエピトープに対する二価結合、及び第2の抗原又は第2の抗原エピトープに対する一価の結合を有する。

20

【0157】

本開示の一実施形態では、オンセル形成された三重特異性ヘテロ二量体抗体は、標的細胞の破壊のために、細胞傷害性T細胞を誘導及び刺激することができる。一実施形態において、オンセル形成三重特異性抗体は、標的細胞と、CD3を発現する細胞傷害性T細胞との間の免疫シナプスの形成を可能にする。一実施形態において、オンセル形成三重特異性抗体は、第1及び第3の抗原又は抗原エピトープをそれぞれ発現する標的細胞とT細胞を架橋し、それにより免疫シナプスが形成されて、細胞傷害性T細胞が標的細胞を殺傷することを可能にする。一実施形態において、標的細胞とT細胞の間に形成される免疫シナプスの幅は、約200 Å、約190 Å、約180 Å、約170 Å、約160 Å、約150 Å、約140 Å、約130 Å、約120 Å、約110 Å、約100 Å、約90 Å、約80 Å、約70 Å、約60 Å、約50 Å、約40 Å、約30 Å、約20 Å、又は約10 Åである。

30

【0158】

一実施形態において、前記免疫シナプスは、本開示による抗原結合分子のセットに含まれる第1及び第2の抗原結合分子の存在によって形成される。本開示の一実施形態では、標的細胞の殺傷の媒介に関するオンセル形成三重特異性抗体の効力は、形成された免疫シナプスの幅に依存する。一実施形態において、標的細胞の殺傷の媒介に関するオンセル三重特異性抗体の効力は、形成された免疫シナプスの幅に反比例して増加する。

40

【0159】

従って、一実施形態では、標的細胞の殺傷の媒介に関するオンセル形成三重特異性抗体の効力は、新たに形成された抗体Fvドメインの結合部位までの第1のターゲティング部分の結合部位の距離、及び新たに形成された抗体Fvドメインの結合部位までの第2のターゲティング部分の結合部位の距離に依存する。

【0160】

さらなる実施形態において、標的細胞の殺傷の媒介に関するオンセル形成三重特異性抗体の効力は、第1の抗原又は第1の抗原エピトープ及び第2の抗原又は第2の抗原エピトープに依存する。

50

【0161】

特定の実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1及び第2の抗原結合分子は、第1の抗原又は第1の抗原エピトープ及び第2の抗原又は第2の抗原エピトープに基づいて、特に、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離及び第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離、並びに／又は第1の抗原若しくは抗原エピトープから第2の抗原若しくは抗原エピトープまでの距離に基づいて選択される。

【0162】

(1 1 / 2) B027フォーマットの抗原結合分子及びそれらの組合せ

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1のターゲティング部分、

b) ペプチドリンカー、及び

c) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む抗原結合分子であって、

ターゲティング部分が、ペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されている、抗原結合分子に関する。

【0163】

一実施形態において、ターゲティング部分は、ペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、ターゲティング部分は、ペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVLドメインのN末端に融合されている。

【0164】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fabである。

【0165】

一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインである。一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインから成る。一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインに含まれる。一実施形態において、第2の結合部位は、Fvドメインを含む。一実施形態において、抗原結合分子は、第2の結合部位のVHドメイン又はVLドメインのいずれかを含むが、第2の結合部位の両方の可変ドメインは含まない。一実施形態において、抗原結合分子が第2の結合部位のVHドメインを含む場合、それは、第2の結合部位のVLドメインを含まないか、又は抗原結合分子が第2の結合部位のVLドメインを含む場合、それは、第2の結合部位のVHドメインを含まない。一実施形態では、第2の結合部位のVHドメイン及びVLドメインは、Fvドメインを形成する。

【0166】

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原又は第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含むFab、

b) ペプチドリンカー、及び

c) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む抗原結合分子であって、

Fab重鎖のC末端が、ペプチドリンカーを介して第2の結合部位のVH又はVLドメインのいずれかのN末端に融合している、抗原結合分子に関する。

【0167】

一実施形態において、Fab重鎖のC末端は、ペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、Fab重鎖のC末端は、ペプチドリンカーを介して第2の結合部位のVLドメインのN末端に融合されている。

【0168】

本開示の一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、図 1 A に描かれるような構造を有する。

【0169】

本開示の一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、2つのポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i . F a b の重鎖、

i i . ペプチドリンカー、及び

i i i . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV Hドメイン若しくはV Lドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む。

【0170】

本開示の一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i . 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、

i i . 第1のペプチドリンカー、及び

i i i . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子であって、

ターゲティング部分が、第1のペプチドリンカーを介して第2の結合部位のV H若しくはV LドメインのいずれかのN末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i . 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

i i . 第2のペプチドリンカー、

i i i . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的V H若しくはV Lドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子であって、

第2のターゲティング部分が、第2のペプチドリンカーを介して第2の結合部位の相補的V H若しくはV LドメインのN末端に融合されている、第2の抗原結合分子から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0171】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV HドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV LドメインのN末端に融合されている。

【0172】

一実施形態において、第2のターゲティング部分は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V HドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第2のターゲティング部分は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V LドメインのN末端に融合される。

【0173】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及びV H Hからなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は、F a bである。

【0174】

10

20

30

40

50

本開示の一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子であって、

第1のFab重鎖のC末端が、第1のペプチドリンカーを介して第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第2のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子であって、

第2のFab重鎖のC末端が、第2のペプチドリンカーを介して第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端に融合されている、第2の抗原結合分子から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0175】

一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合されている。

【0176】

一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端に融合されている。

【0177】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1及び第2のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のFabの軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のFabの重鎖、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH又はVLドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む。

【0178】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第3及び第4のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第3のポリペプチドは、第2のFabの軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のFabの重鎖、

ii. 第2のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む。

【0179】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第2の結合のVH及びVLドメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。

【0180】

一実施形態において、本開示は、図1Aに描かれているような構造を有する第1の抗原結合分子と、図1Aに描かれるような構造を有する第2の抗原結合分子から成るか、又はそれを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【0181】

(1 1 / 2) B036 Fc-KiHフォーマットの抗原結合分子及びその組合せ

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含むターゲティング部分、

b) 第1のペプチドリンカー、

c) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

d) 第2のペプチドリンカー、及び

e) 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれを含む抗原結合分子において、

ターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位領域のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、抗原結合分子に関する。

【0182】

一実施形態において、ターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、ターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVLドメインのN末端に融合されている。

【0183】

一実施形態において、第2の結合部位のVHドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。一実施形態において、第2の結合部位のVLドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0184】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fabである。

【0185】

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含むFab、

b) 第1のペプチドリンカー、

c) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

d) 第2のペプチドリンカー、並びに

e) 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域

10

20

30

40

50

から成るか、又はそれを含む抗原結合分子において、

F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の結合部位領域の V H 若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端は、第 3 のペプチドリンカーに融合されている、抗原結合分子に関する。

【0186】

一実施形態において、F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H ドメインの N 末端に融合されている。一実施形態において、F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V L ドメインの N 末端に融合されている。

10

【0187】

一実施形態において、第 2 の結合部位の V H ドメインの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されている。一実施形態において、第 2 の結合部位の V L ドメインの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されている。

【0188】

本開示の一実施形態において、抗原結合分子は、3 つのポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

20

a) 第 1 のポリペプチドは、F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . F a b の重鎖、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれか、

i v . 第 2 のペプチドリンカー及び

v . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 1 の F c 領域サブユニット

から成るか、又はそれらを含み、さらに

30

c) 第 3 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 3 のペプチドリンカー及び

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニット

から成る。

【0189】

一実施形態では、抗原結合分子は、図 1 B に描かれているような構造を有する。

【0190】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

40

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エпитープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれか、

i v . 第 2 のペプチドリンカー、

v . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域から成るか、又はそれを含む第 1 の抗原結合分子において、

ターゲティング部分は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の結合部位の V H 若し

50

くはV LドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のV H若しくはV LドメインいずれかのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のF c領域サブユニットのN末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i . 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

i i . 第4のペプチドリンカー、

i i i . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的V H若しくはV Lドメイン、

i v . 第5のペプチドリンカー、

v . 第3及び第4のF c領域サブユニットから構成される第2のF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成される、第2のF c領域から成るか、又はそれを含む第2の抗原結合分子において、

第2のターゲティング部分が、第4のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のV H若しくはV LドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的V H若しくはV LドメインのC末端が、第5のペプチドリンカーを介して、第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のF c領域サブユニットのN末端が、第6のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0191】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV HドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV LドメインのN末端に融合される。

【0192】

一実施形態において、第2のターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V HドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第2のターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V LドメインのN末端に融合されている。

【0193】

一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV HドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。一実施形態では、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV LドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0194】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V HドメインのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V LドメインのC末端は、第6のペプチドリンカーを介して、第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0195】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態では、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及び単ドメイン抗体からなる群より選択される。一実施形態では、ターゲティング部分は、F a bである。

10

20

30

40

50

【0196】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

iv. 第2のペプチドリンカー、並びに

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第4のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

iv. 第5のペプチドリンカー、並びに

v. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第2のFc領域から成るか、又はそれを含む第2の抗原結合分子において、

第2のFab重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端は、第6のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0197】

一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合されている。

【0198】

一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端に融合されている。

【0199】

一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される

。一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV LドメインのC末端は、第2のペプチドリinkerを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合される。

【0200】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V HドメインのC末端は、第5のペプチドリinkerを介して第3のF c領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V LドメインのC末端は、第5のペプチドリinkerを介して第3のF c領域サブユニットのN末端に融合される。

【0201】

本開示の一実施形態において、抗原結合分子は、第1、第2及び第3のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のF a bの重鎖、

i i. 第1のペプチドリinker、

i i i. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれか、

i v. 第2のペプチドリinker、並びに

v. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第1のF c領域サブユニット

から成るか、又はそれらを含み、さらに

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第3のペプチドリinker、並びに

i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第2のF c領域サブユニット

から成る。

【0202】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第4、第5及び第6のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第6のペプチドリinker、並びに

i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第4のF c領域サブユニット

から成るか、又はそれらを含み、

b) 第5のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のF a bの重鎖、

i i. 第4のペプチドリinker、

i i i. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的V H若しくはV Lドメインのいずれか、

i v. 第5のペプチドリinker、並びに

v. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第3のF c領域サブユニット

から成るか、又はそれらを含み、

c) 第6のポリペプチドは、第2のF a bの軽鎖を含む。

【0203】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第2の結合部位のV Hドメイン及びV Lドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第2の結合部位を形成する。

10

20

30

40

50

【0204】

一実施形態において、本開示は、図1Bに描かれているような構造を有する第1の抗原結合分子と、図1Bに描かれているような構造を有する第2の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【0205】

(1 1 / 2) B038 Fc-KiHフォーマットの抗原結合分子及びその組合せ

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含むターゲティング部分、

b) 第1のペプチドリンカー、

c) 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成されるFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成されるFc領域、

d) 第2のペプチドリンカー、並びに

e) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む抗原結合分子であって、

ターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、抗原結合分子に関する。

【0206】

一実施形態において、第1のFc領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第1のFc領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVLドメインのN末端に融合されている。

【0207】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態では、ターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。一実施形態では、ターゲティング部分はFabである。

【0208】

一実施形態において、本開示は、そのN末端からC末端に、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含むFab、

b) 第1のペプチドリンカー、

c) 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成されるFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成されるFc領域、

d) 第2のペプチドリンカー、及び

e) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む抗原結合分子において、

Fab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、抗原結合分子に関する。

【0209】

一実施形態において、第1のFc領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のVHドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第

1 の F c 領域サブユニットは、第 2 のペプチドリンカーを介して第 2 の結合部位の V L ドメインの N 末端に融合されている。

【0210】

本開示の一実施形態において、抗原結合分子は、3つのポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1の F a b の軽鎖から成り、

b) 第2のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第1の F a b の重鎖、

i i . 第1のペプチドリンカー、

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第1の F c 領域サブユニット、

i v . 第2のペプチドリンカー、並びに

v . 第2の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成り、

c) 第3のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第3のペプチドリンカー、並びに

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第2の F c 領域サブユニットから成る。

【0211】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、図 1 C に描かれているような構造を有する。

【0212】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) 下記：

i . 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、

i i . 第1のペプチドリンカー、

i i i . 第1及び第2の F c 領域サブユニットから構成される第1の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第1の F c 領域、

i v . 第2のペプチドリンカー、並びに

v . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

ターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第1の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第2の結合部位の V H 若しくは V L ドメインの N 末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されており、

第2の F c 領域サブユニットの N 末端は、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) 下記：

i . 第3の抗原若しくは第3の抗原エпитープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

i i . 第4のペプチドリンカー、

i i i . 第3及び第4の F c 領域サブユニットから構成される第2の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第2の F c 領域、

i v . 第5のペプチドリンカー、

v . 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

ターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して、第3 F c 領域サブユニット

10

20

30

40

50

の N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されており、さらに

第 4 の F c 領域サブユニットの N 末端は、第 6 のペプチドリンカーに融合されている、第 2 の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0213】

一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合されている。一実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合されている。

10

【0214】

一実施形態において、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端に融合されている。一実施形態において、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合されている。

【0215】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態では、第 2 の結合の V H ドメイン及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第 2 の結合部位を形成する。

20

【0216】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態では、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及び V H H からなる群より選択される。一実施形態では、ターゲティング部分は F a b である。

【0217】

一実施形態において、本開示は、以下：

30

a) 下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 の F a b、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、

i i i . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域、

i v . 第 2 のペプチドリンカー、並びに

v . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子において、

40

第 1 の F a b 重鎖の C 末端が、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の V H 若しくは V L いずれかの N 末端が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されており、

第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 3 のペプチドリンカーに融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) 下記：

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 の F a b、

i i . 第 4 のペプチドリンカー、

50

i i i . 第 3 及び第 4 の F c 領域サブユニットから構成される第 2 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 2 の F c 領域、

i v . 第 5 のペプチドリンカー、

v . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインから成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 の F a b 重鎖の C 末端が、第 4 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端が、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されており、さらに

第 4 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 6 のペプチドリンカーに融合されている、第 2 の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【 0 2 1 8 】

一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合されている。一実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合されている。

【 0 2 1 9 】

一実施形態において、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端に融合されている。一実施形態において、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合されている。

【 0 2 2 0 】

本開示の一実施形態において、第 1 の抗原結合分子は、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a . 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖から成り、

b . 第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 1 の F a b の重鎖、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 1 の F c 領域サブユニット、

i v . 第 2 のペプチドリンカー、及び

v . 第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成り、

c . 第 3 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 3 のペプチドリンカー、並びに

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニット

から成る。

【 0 2 2 1 】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 4、第 5 及び第 6 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a . 第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 6 のペプチドリンカー、並びに

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 4 の F c 領域サブユニット

から成り、

10

20

30

40

50

- b. 第5のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：
- i. 第2のF a bの重鎖、
 - i i. 第4のペプチドリンカー、
 - i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第3のF c領域サブユニット、
 - i v. 第5のペプチドリンカー、並びに
 - v. 第2の結合部位の相補的V H若しくはV Lドメインのいずれか
- から成り、
- c. 第6のポリペプチドは、第2のF a bの軽鎖から成るか、又はそれを含む。

【0222】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第2の結合部位のV H及びV Lドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第2の結合部位を形成する。

【0223】

一実施形態において、本開示は、図1Cに描かれているような構造を有する第1の抗原結合分子と、図1Cに描かれているような構造を有する第2の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【0224】

(2 1 / 2) B 0 6 4 F c - K i Hフォーマットの抗原結合分子及びその組合せ

一実施形態において、本開示は、以下：

- a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、
- b) 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、
- c) 第1のペプチドリンカー、
- d) 第3のペプチドリンカー、
- e) 第1及び第2のF c領域サブユニットから構成されるF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成されるF c領域、
- f) 第2のペプチドリンカー、並びに
- g) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子であって、

第1のターゲティング部分が、第1のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2のターゲティング部分が、第3のペプチドリンカーを介して、第2のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のV H若しくはV LドメインのいずれかのN末端が、第2のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのC末端に融合されている、抗原結合分子に関する。

【0225】

一実施形態において、第1のF c領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV HドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第1のF c領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV LドメインのN末端に融合されている。

【0226】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、そのC末端で、第1のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合され、第2のターゲティング部分は、そのC末端で、第3のペプチドリンカーを介して、第2のF c領域サブユニットのN末端に融合されている。

【0227】

10

20

30

40

50

一実施形態において、第1のターゲティング部分と第2のターゲティング部分は、同一である。

【0228】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態では、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及びV H Hからなる群より選択される。一実施形態では、ターゲティング部分はF a bである。一実施形態では、第1のペプチドリンカーと第2のペプチドリンカーは同一である。

【0229】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のF a b、

b) 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のF a b、

c) 第1のペプチドリンカー、

d) 第3のペプチドリンカー、

c) 第1及び第2のF c領域サブユニットから構成されるF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成されるF c領域、

d) 第2のペプチドリンカー、並びに

e) 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む抗原結合分子であって、

第1のF a b重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2のF a b重鎖のC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第2のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のV H若しくはV LドメインいずれかのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のF c領域サブユニットのC末端に融合されている、抗原結合分子に関する。

【0230】

一実施形態において、第1のF c領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のV HドメインのN末端に融合されている。一実施形態において、第1のF c領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して第2の結合部位のV LドメインのN末端に融合されている。

【0231】

本開示の一実施形態において、抗原結合分子は、3つのポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のF a bの重鎖、

i i. 第1のペプチドリンカー、

i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第1のF c領域サブユニット、

i v. 第2のペプチドリンカー、並びに

v. 第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれかから成り、

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のF a bの重鎖、

i i. 第3のペプチドリンカー、並びに

i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第2のF c領域サブユニットから成り、

d) 第4のポリペプチドは、第2のFabの軽鎖から成るか、又はそれを含む。

【0232】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子は、図4Aに描かれているような構造を有する。

【0233】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) 下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、

ii. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

iii. 第1のペプチドリンカー、

iv. 第3のペプチドリンカー、

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成されるFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、Fc領域、

vi. 第2のペプチドリンカー、並びに

vii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVL若しくはVHドメインのいずれか

から成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2のターゲティング部分は、第3のペプチドリンカーを介して、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのC末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) 下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第4の結合部位を含む第3のターゲティング部分、

ii. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第5の結合部位を含む第4のターゲティング部分、

iii. 第4のペプチドリンカー、

iv. 第6のペプチドリンカー、

v. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、第2のFc領域、

vi. 第5のペプチドリンカー、

vii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

第3のターゲティング部分は、第4のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のターゲティング部分は、第6のペプチドリンカーを介して、第4のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0234】

一実施形態において、第1のFc領域サブユニットのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメイン

のN末端に融合されている。一実施形態では、第1のFc領域サブユニットは、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合されている。

【0235】

一実施形態において、第3のFc領域サブユニットのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第3のFc領域サブユニットのC末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合されている。

【0236】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、そのC末端で、第1のペプチドリンカーを介して第1のFc領域サブユニットのN末端に融合され、第2のターゲティング部分は、そのC末端で、第3のペプチドリンカーを介して第2のFc領域サブユニットのN末端に融合され、第3のターゲティング部分は、そのC末端で、第4のペプチドリンカーを介して第3のFc領域サブユニットのN末端に融合され、第4のターゲティング部分は、そのC末端で、第6のペプチドリンカーを介して第4のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

【0237】

一実施形態において、第1のターゲティング部分と第2のターゲティング部分は同一である。一実施形態において、第3のターゲティング部分と第4のターゲティング部分は同一である。一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fab、scFab、Fab'、scFv、dsFv、及びVHHからなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は、Fabである。

【0238】

本開示の実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されない。本開示の実施形態において、第2の結合のVHドメインとVLドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第2の結合部位を形成する。

【0239】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) 下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

iii. 第1のペプチドリンカー、

iv. 第3のペプチドリンカー、

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成されるFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、Fc領域、

vi. 第2のペプチドリンカー、並びに

vii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVL若しくはVHドメインのいずれか

から成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2のFab重鎖のC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのC末端に融合されている、第1の抗原結合

10

20

30

40

50

分子と、

b) 下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第4の結合部位を含む第3のF a b、

i i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第5の結合部位を含む第4のF a b、

i i i. 第4のペプチドリンカー、

i v. 第6のペプチドリンカー、

v. 第3及び第4のF c領域サブユニットから構成される第2のF c領域であって、各F c領域サブユニットが、C H 2及びC H 3ドメインから構成される、第2のF c領域、

v i. 第5のペプチドリンカー、

v i i. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的V H若しくはV Lドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

第3のF a b重鎖のC末端は、第4のペプチドリンカーを介して、第3のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第4のF a b重鎖のC末端は、第6のペプチドリンカーを介して、第4のF c領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位のV H若しくはV LドメインいずれかのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のF c領域サブユニットのC末端に融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0240】

一実施形態において、第1のF c領域サブユニットは、そのC末端で、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV HドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第1のF c領域サブユニットは、そのC末端で、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のV LドメインのN末端に融合されている。

【0241】

一実施形態において、第3のF c領域サブユニットは、そのC末端で、第5のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的V HドメインのN末端に融合されている。一実施形態では、第3のF c領域サブユニットは、そのC末端で、第5のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子のV LドメインのN末端に融合されている。

【0242】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1、第2、第3及び第4のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のF a bの重鎖、

i i. 第1のペプチドリンカー、

i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第1のF c領域サブユニット、

i v. 第2のペプチドリンカー、並びに

v. 第2の結合部位のV H若しくはV Lドメインのいずれかから成り、

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のF a bの重鎖、

i i. 第3のペプチドリンカー、並びに

i i i. そのN末端からC末端に、C H 2及びC H 3ドメインから構成される第2の

F c 領域サブユニットから成り、

d) 第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含む。

【 0 2 4 3 】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 4、第 5、第 6 及び第 7 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで

a) 第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 4 の F a b の重鎖、

i i . 第 6 のペプチドリンカー、並びに

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 4 の F c 領域サブユニット

10

を含み、

b) 第 5 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 3 の F a b の重鎖、

i i . 第 4 のペプチドリンカー、

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 3 の F c 領域サブユニット、

i v . 第 5 のペプチドリンカー、並びに

v . 第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメイン

を含み、

c) 第 6 のポリペプチドは、第 3 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

20

d) 第 7 のポリペプチドは、第 4 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれらを含む。

【 0 2 4 4 】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第 2 の結合の V H 及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第 2 の結合部位を形成する。

【 0 2 4 5 】

一実施形態において、本開示は、図 4 A に描かれているような構造を有する第 1 の抗原結合分子と、図 4 A に描かれているような構造を有する第 2 の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

30

【 0 2 4 6 】

(1 1 / 2) B 0 2 7 フォーマット及び (1 1 / 2) B 0 3 6 F c - K i H フォーマットの抗原結合分子のセット

一実施形態において、本開示は、以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、及び

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれか

40

から成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子であって、

第 1 のターゲティング部分が、第 1 のペプチドリンカーを介して第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 のターゲティング部分、

i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメイン、

i v . 第 3 のペプチドリンカー、

50

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

第2のターゲティング部分が、第2のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのC末端が、第3のペプチドリンカーを介して第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第4のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

10

【0247】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合される。一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合される。

【0248】

一実施形態において、第2のターゲティング部分は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端に融合される。一実施形態では、第2のターゲティング部分は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端に融合される。

20

【0249】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態では、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

【0250】

一実施形態において、本開示は、以下：

30

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子であって、

第1のFab重鎖のC末端が、第1のペプチドリンカーを介して第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されている、第1の抗原結合分子と、

40

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エピトープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第2のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメイン、

i. 第3のペプチドリンカー、

ii. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットが、CH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域

から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

50

第2のFab重鎖のC末端が、第2のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのC末端が、第3のペプチドリンカーを介して第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第4のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0251】

本開示の実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合される。一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合される。

10

【0252】

一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端に融合される。一実施形態において、第2のFab重鎖のC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第2の抗原に特異的な第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端に融合される。

【0253】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのC末端は、第3のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

20

【0254】

一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1及び第2のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のFabの軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のFabの重鎖、

ii. 第1のペプチドリンカー、及び

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれ

か

から成るか、又はそれらを含む。

30

【0255】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第3、第4及び第5のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第3のポリペプチドは、第2のFabの軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

b) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のFabの重鎖、

ii. 第2のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインの

いずれか

iv. 第3のペプチドリンカー、並びに

v. そのN末端からC末端に、CH2及びCH3ドメインから構成される第1のFc領域サブユニット

から成るか、又はそれらを含み、

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第4のペプチドリンカー、並びに

40

50

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニットを含む。

【 0 2 5 6 】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第 2 の結合の V H 及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより第 2 の結合部位を形成する。

【 0 2 5 7 】

一実施形態において、本開示は、図 1 A に描かれるような構造を有する第 1 の抗原結合分子と、図 1 B に描かれるような構造を有する第 2 の抗原結合分子から成るか、又はそれを含む、抗原結合分子のセットに関する。

10

【 0 2 5 8 】

(1 1 / 2 B 0 2 7) フォーマット及び (1 1 / 2) B 0 3 8 F c - K i H フォーマットの抗原結合分子のセット

一実施形態において、本開示は、以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、及び

20

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の V H 若しくは V L ドメインのいずれか

から成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子であって、

第 1 のターゲティング部分が、第 1 のペプチドリンカーを介して第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 のターゲティング部分、

i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i i i . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、F c 領域、

30

i v . 第 3 のペプチドリンカー、及び

v . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインから成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 のターゲティング部分が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの C 末端が、第 3 のペプチドリンカーを介して第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 4 のペプチドリンカーに融合されている、第 2 の抗原結合分子

40

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【 0 2 5 9 】

一実施形態において、第 1 のターゲティング部分は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 のターゲティング部分は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第

50

2 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。

【0260】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及び V H H からなる群から選択されるか、又はそれらを含む。一実施形態において、ターゲティング部分は、F a b である。

【0261】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) 下記：

i. 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エпитープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 の F a b、

ii. 第 1 のペプチドリンカー、及び

iii. 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子であって、

第 1 の F a b 重鎖の C 末端が、第 1 のペプチドリンカーを介して第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) 下記：

I. 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エпитープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 の F a b、

II. 第 2 のペプチドリンカー、

III. 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、F c 領域、

IV. 第 3 のペプチドリンカー、並びに

V. 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインから成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 の F a b 重鎖の C 末端が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの C 末端が、第 3 のペプチドリンカーを介して第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 4 のペプチドリンカーに融合されている、第 2 の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0262】

一実施形態において、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。

【0263】

一実施形態において、第 1 の抗原結合分子は、第 1 及び第 2 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 1 の F a b の重鎖、

ii. 第 1 のペプチドリンカー、及び

10

20

30

40

50

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成る。

【 0 2 6 4 】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 3、第 4 及び第 5 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第 3 のポリペプチドは、第 2 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i . 第 2 の F a b の重鎖、

i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 1 の F c 領域サブユニット、

i v . 第 3 のペプチドリンカー、並びに

v . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成り、

c) 第 5 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i i i . 第 4 のペプチドリンカー、並びに

i v . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニット

を含む。

【 0 2 6 5 】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第 2 の結合の V H 及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それにより、第 2 の結合部位を形成する。

【 0 2 6 6 】

一実施形態において、本開示は、図 1 A に描かれるような構造を有する第 1 の抗原結合分子と、図 1 C に描かれるような構造を有する第 2 の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【 0 2 6 7 】

(1 1 / 2) B 0 2 7 フォーマット及び (2 1 / 2) B 0 6 4 F c - K i H フォーマットの抗原結合分子のセット

一実施形態において、本開示は、以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、及び

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれかから成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子であって、

第 1 のターゲティング部分が、第 1 のペプチドリンカーを介して第 2 の結合部位の V H

若しくは V L ドメインのいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) 下記：

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 のターゲティング部分、

i i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 4 の結合部位を含む第 3 のターゲティング部分、

i i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i v . 第 4 のペプチドリンカー、

v . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、

各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域
v i . 第 3 のペプチドリンカー、

v i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメイン
から成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 のターゲティング部分が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブ
ユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 3 のターゲティング部分が、第 4 のペプチドリンカーを介して、第 2 の F c 領域サブ
ユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端が、第 3 のペプチドリンカー
を介して第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されている、第 2 の抗原結合分子
から成るか、或いはそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

10

【 0 2 6 8 】

一実施形態において、第 1 のターゲティング部分は、第 1 のペプチドリンカーを介して
、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に
融合される。一実施形態では、第 1 のターゲティング部分は、第 1 のペプチドリンカーを
介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N
末端に融合される。

【 0 2 6 9 】

一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介し
て、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの
N 末端に融合される。一実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチド
リンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の V L ド
メインの N 末端に融合される。

20

【 0 2 7 0 】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実
施形態において、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d
s F v、及び V H H からなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部
分は F a b である。

【 0 2 7 1 】

一実施形態において、本開示は、以下：

30

a) 下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1
の F a b、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、及び

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれ
か

から成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子であって、

第 1 の F a b 重鎖の C 末端が、第 1 のペプチドリンカーを介して第 2 の結合部位の V H
若しくは V L ドメインいずれかの N 末端に融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) 下記：

40

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2
の F a b、

i i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 4 の結合部位を含む第
3 の F a b、

i i i . 第 2 のペプチドリンカー、

i v . 第 4 のペプチドリンカー、

v . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、
各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域

v i . 第 3 のペプチドリンカー、

v i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメイン

50

から成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 の F a b 重鎖の C 末端が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 3 の F a b 重鎖の C 末端が、第 4 のペプチドリンカーを介して、第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端が、第 3 のペプチドリンカーを介して第 1 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されている、第 2 の抗原結合分子から成るか、或いはそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【0272】

一実施形態において、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態では、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。

10

【0273】

一実施形態において、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットは、第 3 のペプチドリンカーを介して、第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。

20

【0274】

一実施形態において、ターゲティング部分は、抗体又は抗体フラグメントである。一実施形態において、ターゲティング部分は、F a b、s c F a b、F a b'、s c F v、d s F v、及び V H H からなる群より選択される。一実施形態において、ターゲティング部分は F a b である。

【0275】

一実施形態において、第 1 の抗原結合分子は、第 1 及び第 2 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 1 の F a b の重鎖、

i i. 第 1 のペプチドリンカー、及び

i i i. 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれ

か

から成る。

30

【0276】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 3、第 4、第 5 及び第 6 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第 3 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 3 の F a b の重鎖、

i i. 第 4 のペプチドリンカー、

i i i. その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニット

を含み、

b) 第 4 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 2 の F a b の重鎖、

i i. 第 2 のペプチドリンカー、

i i i. その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 1 の F c 領域サブユニット、

i v. 第 3 のペプチドリンカー、

40

50

v. 第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのいずれかを含み、

c) 第5のポリペプチドは、第2のFabの軽鎖を含み、さらに

d) 第6のポリペプチドは、第3のFabの軽鎖を含む。

【0277】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子と第2の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第2の結合のVH及びVLドメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第2の結合部位を形成する。

【0278】

一実施形態において、本開示は、図1Aに描かれるような構造を有する第1の抗原結合分子と、図4Aに描かれるような構造を有する第2の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。本開示の一実施形態では、抗原結合分子のセットは、図4Cに描かれているような構造を有する。

【0279】

(1 1 / 2) B036 Fc-KiHフォーマット及び(1 1 / 2) B038 Fc-KiHフォーマットの抗原結合分子のセット

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含む第1のターゲティング部分、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

iv. 第2のペプチドリンカー、

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

第1のターゲティング部分が、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位領域のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのC末端が、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エпитープに特異的な第3の結合部位を含む第2のターゲティング部分、

ii. 第4のペプチドリンカー、

iii. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第2のFc領域、

iv. 第5のペプチドリンカー、

v. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれを含む第2の抗原結合分子において、

第2のターゲティング部分のC末端が、第4のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端が、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第4のFc領域サブユニットのN末端が、第6のペプチドリンカーに融合されている、第2の抗原結合分子

10

20

30

40

50

から成るか、又はそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0280】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合される。一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位領域の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合される。

【0281】

一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態では、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

10

【0282】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。

【0283】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

20

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

iv. 第2のペプチドリンカー、

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれを含む第1の抗原結合分子において、

第1のFab重鎖のC末端が、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれかのN末端に融合されており、

30

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのC末端が、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エпитープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第4のペプチドリンカー、

iii. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第2のFc領域、

40

iv. 第5のペプチドリンカー、

v. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれを含む第2の抗原結合分子において、

第2のFab重鎖のC末端が、第4のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端が、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第6のペプチドリンカーに融合されている、

50

第 2 の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0284】

一実施形態において、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの N 末端に融合される。一実施形態では、第 1 の F a b 重鎖の C 末端は、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の結合部位領域の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの N 末端に融合される。

【0285】

一実施形態において、第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V H ドメインの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合される。一実施形態では、第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の V L ドメインの C 末端は、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合される。

【0286】

一実施形態において、第 2 の結合部位の第 2 の抗原結合分子の相補的 V H ドメインの N 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合される。一実施形態では、第 2 の結合部位の第 1 の抗原結合分子の相補的 V L ドメインの N 末端は、第 5 のペプチドリンカーを介して第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合される。

【0287】

本開示の一実施形態において、第 1 の抗原結合分子は、第 1、第 2、及び第 3 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖から成るか、又はそれを含み、

b) 第 2 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 1 の F a b の重鎖、

i i. 第 1 のペプチドリンカー、

i i i. 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれか、

i v. 第 2 のペプチドリンカー、並びに

v. その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 1 の F c 領域サブユニット

を含み、

c) 第 3 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 3 のペプチドリンカー、並びに

i i. その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 2 の F c 領域サブユニット

を含む。

【0288】

本開示の一実施形態において、第 2 の抗原結合分子は、第 4、第 5、及び第 6 のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a. 第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の軽鎖を含み、

b. 第 5 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 2 の F a b の重鎖、

i i. 第 4 のペプチドリンカー、

i i i. その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 3 の F c 領域サブユニット、

i v. 第 5 のペプチドリンカー、並びに

v. 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメイン

を含み、

c. 第 6 のポリペプチドは、その N 末端から C 末端に、以下：

i. 第 6 のペプチドリンカー、

i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 4 の F c 領域サブユニットを含む。

【 0 2 8 9 】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されていない。本開示の一実施形態において、第 2 の結合の V H 及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第 2 の結合部位を形成する。

【 0 2 9 0 】

一実施形態において、本開示は、図 1 B に描かれているような構造を有する第 1 の抗原結合分子と、図 1 C に描かれているような構造を有する第 2 の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。

【 0 2 9 1 】

(1 1 / 2) B 0 3 6 F c - K i H フォーマット及び (2 1 / 2) B 0 6 4 F c - K i H フォーマットの抗原結合分子のセット

一実施形態において、本開示は、以下：

a) その N 末端から C 末端に、下記：

i . 第 1 の抗原若しくは第 1 の抗原エピトープに特異的な第 1 の結合部位を含む第 1 のターゲティング部分、

i i . 第 1 のペプチドリンカー、

i i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインのいずれか、

i v . 第 2 のペプチドリンカー、並びに

v . 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットから構成される第 1 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 1 の F c 領域から成るか、又はそれらを含む第 1 の抗原結合分子において、

第 1 のターゲティング部分が、第 1 のペプチドリンカーを介して、第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインいずれかの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の V H 若しくは V L ドメインいずれかの C 末端が、第 2 のペプチドリンカーを介して、第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、さらに

第 2 の F c 領域サブユニットの N 末端が、第 3 のペプチドリンカーに融合されている、第 1 の抗原結合分子と、

b) 下記：

i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 3 の結合部位を含む第 2 のターゲティング部分、

i i . 第 3 の抗原若しくは第 3 の抗原エピトープに特異的な第 4 の結合部位を含む第 3 のターゲティング部分、

i i i . 第 4 のペプチドリンカー、

i v . 第 6 のペプチドリンカー、

v . 第 3 及び第 4 の F c 領域サブユニットから構成される第 2 の F c 領域であって、各 F c 領域サブユニットが C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される、第 2 の F c 領域、

v i . 第 5 のペプチドリンカー、

v i i . 第 2 の抗原に特異的な第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインから成るか、又はそれらを含む第 2 の抗原結合分子において、

第 2 のターゲティング部分が、第 4 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 3 のターゲティング部分が、第 6 のペプチドリンカーを介して、第 4 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の結合部位の相補的 V H 若しくは V L ドメインの N 末端が、第 5 のペプチドリンカーを介して、第 3 の F c 領域サブユニットの C 末端に融合されている、第 2 の抗原結合分

10

20

30

40

50

子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0292】

一実施形態において、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合される。一実施形態では、第1のターゲティング部分は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位領域の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合される。

【0293】

一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態では、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

【0294】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。

【0295】

一実施形態において、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1の結合部位を含む第1のFab、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

iv. 第2のペプチドリンカー、

v. 第1及び第2のFc領域サブユニットから構成される第1のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第1のFc領域から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子において、

第1のFab重鎖のC末端が、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのN末端に融合されており、

第2の結合部位のVH若しくはVLドメインいずれかのC末端が、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、さらに

第2のFc領域サブユニットのN末端が、第3のペプチドリンカーに融合されている、第1の抗原結合分子と、

b) 下記：

i. 第3の抗原若しくは第3の抗原エпитープに特異的な第3の結合部位を含む第2のFab、

ii. 第3の抗原若しくは第3の抗原エпитープに特異的な第4の結合部位を含む第3のFab、

iii. 第4のペプチドリンカー、

iv. 第6のペプチドリンカー、

v. 第3及び第4のFc領域サブユニットから構成される第2のFc領域であって、各Fc領域サブユニットがCH2及びCH3ドメインから構成される、第2のFc領域、

vi. 第5のペプチドリンカー、

vii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインから成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子において、

第2のFab重鎖のC末端が、第4のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

10

20

30

40

50

第3のFab重鎖のC末端が、第6のペプチドリンカーを介して、第4のFc領域サブユニットのN末端に融合されており、

第2の結合部位の相補的VH若しくはVLドメインのN末端が、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合されている、第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットに関する。

【0296】

一実施形態において、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのN末端に融合される。一実施形態では、第1のFab重鎖のC末端は、第1のペプチドリンカーを介して、第2の結合部位領域の第1の抗原結合分子のVLドメインのN末端に融合される。

10

【0297】

一実施形態において、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVHドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。一実施形態では、第2の結合部位の第1の抗原結合分子のVLドメインのC末端は、第2のペプチドリンカーを介して、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。

【0298】

一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VHドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。一実施形態において、第2の結合部位の第2の抗原結合分子の相補的VLドメインのN末端は、第5のペプチドリンカーを介して、第3のFc領域サブユニットのC末端に融合される。

20

【0299】

本開示の一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1、第2、及び第3のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第1のポリペプチドは、第1のFabの軽鎖から成るか、又はそれらを含み、

b) 第2のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第1のFabの重鎖、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第2の抗原に特異的な第2の結合部位のVH若しくはVLドメインのいずれか、

30

iv. 第2のペプチドリンカー、並びに

v. そのN末端からC末端に、CH₂及びCH₃ドメインから構成される第1のFc領域サブユニット

を含み、

c) 第3のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第3のペプチドリンカー、並びに

ii. そのN末端からC末端に、CH₂及びCH₃ドメインから構成される第2のFc領域サブユニット

を含む。

40

【0300】

本開示の一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第4、第5、第6及び第7のポリペプチドから成るか、又はそれらを含み、ここで、

a) 第4のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第3のFabの重鎖、

ii. 第6のペプチドリンカー、

iii. そのN末端からC末端に、CH₂及びCH₃ドメインから構成される第4のFc領域サブユニットを含み、

b) 第5のポリペプチドは、そのN末端からC末端に、以下：

i. 第2のFabの重鎖、

50

- i i . 第 4 のペプチドリンカー、
 - i i i . その N 末端から C 末端に、C H 2 及び C H 3 ドメインから構成される第 3 の F c 領域サブユニット、
 - i v . 第 5 のペプチドリンカー、
 - v . 第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメイン
- を含み、
- c) 第 6 のポリペプチドは、第 2 の F a b の軽鎖を含み、さらに
 - d) 第 7 のポリペプチドは、第 3 の F a b の軽鎖を含む。

【0301】

本開示の一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第 1 の抗原結合分子と第 2 の抗原結合分子は、共有結合によって連結されない。本開示の一実施形態において、第 2 の結合の V H 及び V L ドメインは、非共有結合的に結合することができ、それによって第 2 の結合部位を形成する。

【0302】

一実施形態において、本開示は、図 1 B に描かれているような構造を有する第 1 の抗原結合分子と、図 4 A に描かれているような構造を有する第 2 の抗原結合分子から成るか、又はそれらを含む、抗原結合分子のセットに関する。本開示の一実施形態では、抗原結合分子のセットは、図 4 D に描かれているような構造を有する。

【0303】

抗体

本開示による抗原結合分子に使用される抗体又は抗体フラグメント、並びに V H 及び V L ドメインは、マウス、ラット、ヒト又は非ヒト霊長類などの任意の動物種由来であってよい。好ましくは、起源はヒトであるか、又はヒト化アプローチによって取得することもできる。

【0304】

リンカー

本開示による抗原結合分子は、その個々の構成要素（ターゲティング部分又は不對 V H 及び V L ドメインなど）が、互いに直接的に、又はリンカーを介して間接的に融合するように設計することができる。

【0305】

特定の実施形態では、本開示による抗原結合分子の個々の構成要素は、互いに遺伝的に融合される。このような融合は、いくつかの戦略によって達成することができ、そうしたものとして、限定されないが、ペプチド又はポリペプチドの N 末端と C 末端の間のペプチド又はポリペプチド融合、ジスルフィド結合を介した融合、及び化学架橋試薬を介した融合が挙げられる。

【0306】

リンカーの組成及び長さは、当技術分野で公知の方法に従って決定することができ、それらを有効性について試験することができる。好ましくは、リンカーは、非免疫原性である。本明細書で使用される非免疫原性ペプチドリンカーは、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び他の柔軟なペプチドリンカーを含み得る。一実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーである。一実施形態では、リンカーは、当技術分野で公知のペプチド結合によって結合された、1 つ又は複数のアミノ酸残基を含むペプチドリンカーである。ペプチドリンカーは、2 つの成分が所望の活性若しくは機能性を保持又は獲得するように、互いに対して正しい立体配置をとるように、上記 2 つの成分を融合するのに適切な長さを有するべきである。

【0307】

ペプチドリンカーは、次のアミノ酸残基：G l y、S e r、A l a、又は T h r を含み得る。好適な非免疫原性ペプチドリンカーは、グリシン-セリンポリマー、例えば、(G S)_n（配列番号 36）、(G 4 S)_n（配列番号 37）、(S G 4)_n（配列番号 38）、(G S G G S)_n（配列番号 39）、(G G G S)_n（配列番号 40）又は G 4 (S

10

20

30

40

50

G₄)_n (配列番号 41) を含み、ここで、n は、1～10、典型的には 2～4 の整数である。一実施形態では、ペプチドリンカーは、限定はされないが、QPKAAP (配列番号 42)、ASTKGP (配列番号 43)、(G₄S)₃ (配列番号 44)、(GGS)₃ (配列番号 45)、DKTHTCPCP (配列番号 46)、QPKAAPDKTHTCPCP (配列番号 47)、及び ASTKGPDKTHTCPCP (配列番号 48) からなる群より選択される。

【0308】

ペプチドリンカーはまた、CL κ 若しくは CL λ ドメイン又は CH1 ドメインなどの免疫グロブリン軽鎖若しくは重鎖定常ドメインに由来し得るが、そのような定常ドメインの全ての残基というわけではなく、例えば、最初の 5～12 アミノ酸残基のみである。一実施形態において、ペプチドリンカーは、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖定常ドメインではない。一実施形態では、ペプチドリンカーは、CL κ 、CL λ 、CH1、CH2 又は CH3 ドメインではない。抗原結合分子において使用され得る例示的なペプチドリンカーは、免疫グロブリン軽鎖若しくは重鎖定常ドメインに由来し、QPKAAP (配列番号 49) 又は ASTKGP (配列番号 50) である。

【0309】

ペプチドリンカーはまた、免疫グロブリンヒンジ (例えば、ヒト IgG1 ヒンジ若しくはその一部) 又はそのようなヒンジに由来する任意のペプチドを含み得る。好ましくは、免疫グロブリンヒンジの一部又は部分のみが使用される場合、切断されたヒンジは、その鎖間システムの 1 つ又は複数を依然として含み得る。鎖間システムが存在すると、このようなヒンジペプチドリンカーが 2 つ使用される状況で、ジスルフィド架橋による二量体ペプチドリンカー (又はヒンジ領域) の形成が可能になる。二量体ペプチドリンカー又はヒンジ領域が存在すると、本開示による抗原結合分子に存在し得る 2 つの Fc 領域サブユニットの二量体化をさらに促進し、安定化する。二量体化に適した例示的なヒト IgG ヒンジ由来のペプチドリンカーは、DKTHTCPCP (配列番号 46)、KTHTCPCP (配列番号 32) 又は EPKSCDKTHTCPCP (配列番号 34) である。

【0310】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセット中に存在するペプチドリンカーは、同一である。一実施形態において、ペプチドリンカーは、異なる。一実施形態において、ペプチドリンカーは、同一の長さである。一実施形態において、ペプチドリンカーは、異なる長さである。

【0311】

一実施形態において、本開示によるペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基のみから構成される。一実施形態では、ペプチドリンカーは、システインを除いて、天然に存在するアミノ酸残基のみから構成される。一実施形態では、本開示によるペプチドリンカーは、アミノ酸残基 A、Q、D、P、H、G、S、E、T、K、及び C から構成される。一実施形態において、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは、少なくとも 5 アミノ酸残基の長さを有する。

【0312】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは、5～50 アミノ酸残基、好ましくは 5～29 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは、5～50 アミノ酸残基、5～45 アミノ酸残基、5～40 アミノ酸残基、5～35 アミノ酸残基、5～30 アミノ酸残基、5～25 アミノ酸残基、5～20 アミノ酸残基、5～15 アミノ酸残基、又は 5～10 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは、5～49 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、5～40 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、9～29 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、5～29 アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは

、以下：５アミノ酸残基、９アミノ酸残基、１０アミノ酸残基、１５アミノ酸残基、２０アミノ酸残基、２９アミノ酸残基、４０アミノ酸残基、及び４９アミノ酸残基から選択される長さを有する。

【０３１３】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のペプチドリンカーは、５アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、９アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、１０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、１５アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、１９アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、２０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、２５アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、２９アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、ペプチドリンカーは、４０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、４５アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、４９アミノ酸残基の長さを有する。

10

【０３１４】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、５～４０アミノ酸残基、好ましくは５～２０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、５～４０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、ＩｇＧＦｃ領域を含まない。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基のみから構成される。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、Ｃを除く天然に存在するアミノ酸残基のみから構成される。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、Ａ、Ｑ、Ｄ、Ｐ、Ｈ、Ｇ、Ｓ及びＥの群から選択されるアミノ酸残基から構成される。

20

【０３１５】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、５、１０、２０又は４０アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、５アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、１０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、２０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、４０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本発明による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、５～４０アミノ酸残基、５～３５アミノ酸残基、５～３０アミノ酸残基、５～２５アミノ酸残基、５～２０アミノ酸残基、５～１５アミノ酸残基又は５～１０アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本発明による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、５～２０アミノ酸残基の長さを有する。

30

40

【０３１６】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第２の結合部位のＶＨ又はＶＬドメインのＮ末端にターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、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、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、若しくは４０アミノ酸残基、好ましくは５～２０アミノ酸残基、好ましくは５若しくは２０アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。

【０３１７】

一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、５アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、１０アミノ酸残基の長さを有する

50

ものから選択される。一実施形態では、ペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、ペプチドリンカーは、40アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。

【0318】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、5～45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、10～45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、10～45アミノ酸残基、好ましくは10～25アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、10アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、25アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、45アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、10、15、25又は45アミノ酸残基の長さを有する。

10

【0319】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、配列番号16、配列番号31、配列番号35、配列番号51、配列番号52、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104及び配列番号105からなる群より選択される。

【0320】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにFc領域サブユニットを融合させるペプチドリンカーは、5～50アミノ酸残基、5～45アミノ酸残基、5～40アミノ酸残基、5～35アミノ酸残基、5～30アミノ酸残基、5～25アミノ酸残基の長さを有する。

20

【0321】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにFc領域サブユニットを融合させるペプチドリンカーは、20～50アミノ酸残基、20～45アミノ酸残基、20～40アミノ酸残基、20～35アミノ酸残基、20～30アミノ酸残基、又は20～25アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにFc領域サブユニットを融合させるペプチドリンカーは、5～29アミノ酸残基の長さを有する。

30

【0322】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにFc領域サブユニットを融合させるペプチドリンカーは、5、9、10、20、29、40又は49アミノ酸残基の長さを有するものの中から選択される。

【0323】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLにFc領域サブユニットを融合させるペプチドリンカーは、5、9、10、20、29、40又は49アミノ酸残基の長さを有する。

【0324】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLドメインのC末端に、Fc領域サブユニットのN末端を融合させるペプチドリンカーは、9～49アミノ酸残基の長さを有する。

40

【0325】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLドメインのC末端に、Fc領域サブユニットのN末端を融合させるペプチドリンカーは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、若しくは49アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、本開示による抗原結

50

合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのC末端に、Fc領域サブユニットのN末端を融合させるペプチドリンカーは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49アミノ酸残基、好ましくは29又は49アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。

【0326】

一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、29アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、40アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、49アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、9アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、29アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、49アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、天然に存在するアミノ酸残基のみから構成される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、A、Q、D、P、H、G、S、E、T、K、及びCの群から選択されるアミノ酸残基から構成される。

10

【0327】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのC末端に、Fc領域サブユニットのN末端を融合させるペプチドリンカーは、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号106、配列番号54、配列番号56、及び配列番号46からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0328】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域サブユニットのN末端にターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、9～15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、配列番号34、配列番号46及び配列番号32からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する。

【0329】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域サブユニットのN末端にターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20アミノ酸残基、好ましくは15アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、15アミノ酸残基の長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、E、P、K、S、C、D、T、及びHの群から選択されるアミノ酸残基で構成される。

30

【0330】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのN末端に、Fc領域サブユニットのC末端を融合させるペプチドリンカーは、以下：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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、若しくは40アミノ酸残基、好ましくは20アミノ酸残基の長さを有するものから選択されるか、又はその長さを有する。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有するものから選択される。一実施形態では、上記ペプチドリンカーは、20アミノ酸残基の長さを有する。

40

【0331】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2の結合部位のVH又はVLDメインのN末端に、Fc領域サブユニットのC末端を融合させるペプチドリンカーは、5～40アミノ酸残基、5～35、5～30、5～25、5～20、5～15、若しくは5～10アミノ酸残基の長さを有するものから選択されるか、又はその長さを有する。一実施形態

50

では、上記ペプチドリンカーは、5～20アミノ酸残基の長さを有する。

【0332】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子に使用される好ましいペプチドリンカーは、以下：GQPSG（配列番号35）、GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG（配列番号16）、AQPAAPAPAE（配列番号51）、AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS（配列番号31）、AQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGSKTHTCP（配列番号33）、AQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPAQGS（配列番号52）、DQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGS（配列番号53）、DQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGSKTHTCP（配列番号54）、DQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPAQGS（配列番号55）、DQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCP（配列番号56）、KTHTCP（配列番号107）、KTHTCP（配列番号32）、及びEPKSCDKTHTCP（配列番号34）からなる群より選択される。

10

【0333】

一実施形態では、第2の結合部位のVH又はVLドメインのいずれかにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、以下：GQPSG（配列番号35）、GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG（配列番号16）、AQPAAPAPAE（配列番号51）、AQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGS（配列番号31）及びAQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGS（配列番号52）からなる群より選択される。

20

【0334】

一実施形態では、第2の結合部位のVH又はVLドメインのいずれかにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、以下：配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、及び配列番号106からなる群から選択される。一実施形態では、Fc領域サブユニットのN末端に第2の結合部位のVH又はVLドメインのC末端を融合させるペプチドリンカーは、以下：KTHTCP（配列番号32）、AQPAAPAPAEKTHTCP（配列番号106）、AQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGSKTHTCP（配列番号33）、DQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGSKTHTCP（配列番号54）、及びDQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPAPAQGSKTHTCP（配列番号56）からなる群より選択される。

30

【0335】

一実施形態では、Fc領域サブユニットのC末端に第2の結合部位のVH又はVLドメインのN末端を融合させるペプチドリンカーは、GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG（配列番号16）である。一実施形態では、Fc領域サブユニットにターゲティング部分を融合させるペプチドリンカーは、EPKSCDKTHTCP（配列番号34）である。一実施形態では、Fc領域サブユニットのN末端に融合するペプチドリンカーは、KTHTCP（配列番号32）である。一実施形態では、Fc領域サブユニットのN末端に存在するペプチドリンカーは、KTHTCP（配列番号32）である。

40

【0336】

本明細書で使用されるペプチドリンカーは、前述の例示されたペプチドリンカーの1つだけに限定されるわけではなく、互いに融合された2つ以上のそうしたリンカーの任意の組合せを含み得ることが理解される。例えば、本明細書で使用されるペプチドリンカーは、グリシン-セリンポリマー及び免疫グロブリンヒンジ由来の配列から構築されていてもよく、全IgGFc領域をさらに含んでもよい。

【0337】

スパーサ

標的細胞の殺傷の媒介における、本明細書で開示される抗原結合分子のセットの効力及

50

び有効性は、中でも、標的抗原又は標的抗原エピトープ（例えば、互いの距離及び／又は細胞表面までの各々の距離など）、並びにそれらのターゲティング部分からそれらの不對VH又はVLドメインまでの距離、又はターゲティング部分各々からオンセル形成三重特異性抗体の新しく形成されたFvドメインまでの距離に応じて変動し得る。

【0338】

従って、標的細胞の殺傷の媒介における抗原結合分子のこのようなセットの効力は、各ターゲティング部分とその不對VH又はVLドメインとの間の距離を変化させることによって最適化され得る。これは、本明細書に開示の抗原結合分子の不對VH又はVLドメインにターゲティング部分を連結させる、スペーサの長さを適切に選択することによって達成され得る。

【0339】

この意味で、本開示による抗原結合分子のセットに存在する抗原結合分子の各スペーサの長さは、2つの抗原結合分子の不對VH及びVLドメインの最適な非共有結合を可能にし、これにより、2つの抗原結合分子が、標的細胞上のそれらの標的抗原又は抗原エピトープに結合されると、機能性抗体Fvドメインの形成を可能にするように選択される。

【0340】

本明細書で使用される「スペーサ」とは、当技術分野で公知のペプチド結合によって結合された1つ若しくは複数のアミノ酸残基を含む、ペプチド又はポリペプチドなどの任意のタンパク質性部分を指し、これは、抗原結合分子のセット中に存在する抗原結合分子の二量体化を抗原結合分子がそれ自体で促進しない限り、本開示による抗原結合分子の不對VH又はVLドメインにターゲティング部分を連結する。このようなスペーサは、本明細書に開示されるペプチドリンカーのいずれか並びにそれらの組合せを含有、包含するか、含むか、又はそれらから構成され得る。本開示による抗原結合分子の不對VH又はVLドメインにターゲティング部分を連結させるのに使用するための好適なスペーサは、ペプチド及び／又はタンパク質を連結するために当技術分野で使用される任意のスペーサであってよい。いくつかの好適なスペーサとして、例えば、限定されないが、グリシンスペーサ、セリンスペーサ、グリシン／セリン混合スペーサ、グリシン及びセリンリッチペーサ、大部分が極性ポリペプチド断片から構成されるスペーサ、又はランダムコイル構造を形成するアミノ酸配列を含むスペーサなどのポリペプチドスペーサが挙げられる。好適なスペーサは、CH1、CH2又はCH3ドメインなどの免疫グロブリンの定常ドメイン、並びにそれらの断片若しくは部分又は組合せをさらに含み得る。好適なスペーサ領域はまた、IgGのIgG領域サブユニットのペアから構成される全IgG Fc領域、又は血清アルブミンのような他のタンパク質性半減期延長部分も含み得る。

【0341】

従って、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エピトープに特異的な第1のターゲティング部分

、

ii. 第1のペプチドリンカー、

iii. 第1のスペーサ、

iv. CD3に特異的な抗体FvドメインのVH若しくはVLドメインのいずれか、

v. 任意に、第3のペプチドリンカー、並びに

vi. 任意に、Fc領域

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子と、

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第2の抗原若しくは第2の抗原エピトープに特異的な第2のターゲティング部分

、

ii. 第2のペプチドリンカー、

iii. 第2のスペーサ、及び

iv. CD3に特異的な抗体Fvドメインの相補的VH若しくはVLドメイン、

10

20

30

40

50

v. 任意に、第3のペプチドリンカー、並びに

vi. 任意に、Fc領域

から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットを提供し、

ここで、前記第1の抗原結合分子と前記第2の抗原結合分子は、共有結合により連結されておらず、

第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープと第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープは、同じ細胞上に存在し、第1及び第2のスペーサの長さは、第1の抗原若しくは第1抗原エпитープから第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープまでの距離に基づいて、且つ／又は第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離及び第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離に基づいて選択される。

10

【0342】

一実施形態では、本開示は、以下：

a) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープに特異的な第1のターゲティング部分

、

ii. 第1のスペーサ、

iii. CD3に特異的な抗体FvドメインのVH若しくはVLドメインのいずれか、並びに

iv. 任意に、Fc領域

から成るか、又はそれらを含む第1の抗原結合分子と、

20

b) そのN末端からC末端に、下記：

i. 第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープに特異的な第2のターゲティング部分

、

ii. 第2のスペーサ、及び

iii. CD3に特異的な抗体Fvドメインの相補的VH若しくはVLドメイン、

iv. 任意に、Fc領域

から成るか、又はそれらを含む第2の抗原結合分子

から成るか、或いはそれらを含む抗原結合分子のセットを提供し、

ここで、前記第1の抗原結合分子と前記第2の抗原結合分子は、共有結合により連結されておらず、第1の抗原若しくは第1の抗原エпитープと第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープは、同じ細胞上に存在し、第1及び第2のスペーサの長さは、第1の抗原若しくは第1抗原エпитープから第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープまでの距離に基づいて、且つ／又は第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離と第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離の両方に基づいて選択される。

30

【0343】

一実施形態において、第2の抗原結合分子は、任意に、第2のスペーサのN末端に任意にペプチドリンカーを介して融合した、第2の抗原若しくは第2の抗原エпитープに特異的な第3のターゲティング部分からさらに成るか、又はそれを含む。一実施形態では、第1、第2、第3及び／又は第4のターゲティング部分は、Fab又はscFvである。

40

【0344】

一実施形態において、Fab重鎖のC末端は、第1のスペーサ若しくは第2のスペーサのN末端、又は第1のペプチドリンカー若しくは第2のペプチドリンカーに融合される。一実施形態では、第1の抗原又は第1の抗原エпитープと、第2の抗原又は第2の抗原エпитープは同一である。一実施形態では、第1の抗原又は第1の抗原エпитープと、第2の抗原又は第2の抗原エпитープは異なる。一実施形態では、第1の抗原エпитープと第2の抗原エпитープは、同一の抗原上に存在する。一実施形態では、第1の抗原エпитープと第2の抗原エпитープは、異なる抗原上に存在する。一実施形態では、第1及び第2の抗原又は抗原エпитープは、同一の細胞上に存在する。一実施形態では、第1の抗原及び第2の抗原は、腫瘍関連抗原である。一実施形態において、前記細胞は、腫瘍細胞であ

50

る。

【0345】

本開示の一実施形態において、第1及び第2のスペーサの長さは、第1の抗原エピトープから第2の抗原エピトープまでの距離に基づいて選択される。一実施形態では、第1及び／又は第2のスペーサの長さは、第1の抗原エピトープから第2の抗原エピトープまでの距離に対応する。一実施形態では、第1及び第2のスペーサの長さの合計は、第1の抗原エピトープから第2の抗原エピトープまでの距離に対応する。

【0346】

一実施形態において、第1の抗原エピトープから第2の抗原エピトープまでの距離は、約15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、200 Å、225 Å、250 Å、275 Å、300 Å、350 Å、400 Å、450 Å、500 Å、600 Å、700 Å、800 Å、900 Å、又は約1000 Åである。

10

【0347】

本明細書で使用する場合、1オングストローム [Å] は、約0.1ナノメートル [nm] に相当する。

【0348】

例えば、第1の抗原エピトープから第2の抗原エピトープまでの距離が約100 Åである場合、第1のスペーサ及び第2のスペーサは、それぞれ50 Åの長さを有するものを選択することができる。或いは、第1のスペーサを30 Åの長さのものを選択し、続いて第2のスペーサを70 Åの長さのものを選択してもよく、又はその逆であってもよい。

20

【0349】

しかし、例えば、第1の抗原結合分子が、より細胞表面近位のエピトープをターゲティングし、第2の抗原結合分子が、より細胞表面遠位のエピトープをターゲティングする場合、第2の抗原結合分子のスペーサを最小限か、又は可能な限り短く維持することが好ましい。例えば、第1抗原エピトープから第2抗原エピトープまでの距離が約100 Åであり、第2抗原結合分子が、より細胞表面遠位のエピトープをターゲティングする場合、長さが約83 Åの第1スペーサを選択すると共に、長さが約17 Åの第2スペーサを選択することが好ましい。このシナリオでは、第1のスペーサは、不対可変ドメインを第2の抗原エピトープと同じレベルにするか、又はそれに近接させることにより、ストークとして作用することになる。短い、又は最小限の第2スペーサが存在することで、VH及びVLドメインの結合と機能的相補性を可能にするのに十分な柔軟性が確保される。このような最小限のスペーサは、約5～20アミノ酸残基、好ましくは5アミノ酸残基の長さを有するものが選択される。或いは、そうした最小スペーサは、約17.5 Å～70 Å、好ましくは約17.5 Åの長さを有するものから選択される。

30

【0350】

本明細書で使用するペプチドリンカー又はスペーサの長さは、例えば、5、6、又は7アミノ酸残基などのアミノ酸残基数として記載され得る。或いは、本明細書で 사용되는ペプチドリンカー又はスペーサの長さは、オングストローム [Å] で表示される場合もあり、ここで、ペプチド結合により連結された2つのアミノ酸残基の理論的距離は、約3.5 Åに相当する。このように、5アミノ酸残基の無構造ペプチドリンカー又は直鎖ペプチドリンカーの理論的最大長さは、約17.5 Åに相当し、10アミノ酸残基の直鎖ペプチドリンカーは、約35 Åに相当し、20アミノ酸残基は、約70 Åに相当し、40アミノ酸残基は、約140 Åに相当する。

40

【0351】

別の実施形態において、IgG Fc領域の長さは、約65 Åである。一実施形態では、抗体Fabフラグメントの長さは約60 Åである。一実施形態では、抗体Fvドメインの長さは、約30 Åである。このような長さは、本開示によるスペーサの適切な長さを選択する際にも考慮することができる。

50

【0352】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットにおける、第1の抗原結合分子の第1のスペーサの長さ、第2の抗原結合分子の第2のスペーサの長さの合計は、約15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、200 Å、225 Å、250 Å、275 Å、300 Å、350 Å、400 Å、450 Å、500 Å、600 Å、700 Å、800 Å、900 Å、又は約1000 Å、好ましくは15 Å～200 Åの長さを有するものから選択される。

【0353】

10

一実施形態において、本開示による第1の抗原結合分子の第1のスペーサの長さ又は第2の抗原結合分子の第2のスペーサの長さは、約15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、若しくは約200 Åの長さを有するものから選択される。

【0354】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットにおける第1の抗原結合分子の第1のスペーサの長さ及び第2の抗原結合分子の第2のスペーサの長さは、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離と、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離の差に基づいて選択される。

20

【0355】

一実施形態において、第1及び第2のスペーサの長さの合計は、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離と、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離の差に対応する。

【0356】

一実施形態では、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離は、約10 Å、15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、200 Å、225 Å、250 Å、275 Å、300 Å、350 Å、400 Å、450 Å、500 Å、600 Å、700 Å、800 Å、900 Å、1000 Åである。

30

【0357】

一実施形態では、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離は、約10 Å、15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、200 Å、225 Å、250 Å、275 Å、300 Å、350 Å、400 Å、450 Å、500 Å、600 Å、700 Å、800 Å、900 Å、又は約1000 Åである。

【0358】

一実施形態では、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離と、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離は等しい。これに関連して使用される「等しい」とは、距離の差が15 Å以下であることを意味する。一実施形態では、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離と、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離は異なる。これに関連して使用される「異なる」とは、距離の差が15 Åを超えることを意味する。

40

【0359】

一実施形態では、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離は、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離よりも短い。これに関連して使用される「より短い」とは、第1の抗原エпитープが第2の抗原エпитープと比較して細胞表面に少なくとも15 Å近いことを意味する。一実施形態では、第2の抗原エпитープから細胞表面までの距離は、第1の抗原エпитープから細胞表面までの距離よりも短い。これに関連して使用される「

50

より短い」とは、第2の抗原エピトープが第2の抗原エピトープと比較して細胞表面に少なくとも15 Å近いことを意味する。

【0360】

一実施形態では、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも大きい。これに関連して使用される「より大きい」とは、第1の抗原エピトープが第2の抗原エピトープと比較して細胞表面から少なくとも15 Å離れていることを意味する。

【0361】

一実施形態では、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも大きい。これに関連して使用される「より大きい」とは、第2の抗原エピトープが第1の抗原エピトープと比較して細胞表面から少なくとも15 Å離れていることを意味する。

【0362】

一実施形態において、第1の抗原エピトープは、細胞表面近位エピトープであり、第2の抗原エピトープは細胞表面遠位エピトープである。一実施形態において、第1の抗原エピトープは、細胞表面遠位エピトープであり、第2の抗原エピトープは、細胞表面近位エピトープである。本明細書で用いられる「細胞表面近位エピトープ」とは、細胞表面までの距離が15 Å以下の抗原エピトープを指す。本明細書で用いられる「細胞表面遠位エピトープ」とは、細胞表面までの距離が30 Å以上の抗原エピトープを指す。

【0363】

一実施形態において、本開示の抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子は、細胞表面近位の第1の抗原エピトープに結合し、第2の抗原結合分子は、細胞表面遠位の第2の抗原エピトープに結合する。別の実施形態では、第1の抗原結合分子は、細胞表面遠位の第1の抗原エピトープに結合し、第2の抗原結合分子は、細胞表面近位の第2の抗原エピトープに結合する。

【0364】

一実施形態において、第1の抗原結合分子は、第1の抗原エピトープに結合し、第2の抗原結合分子は、第2の抗原エピトープに結合し、ここで、細胞表面までの第1の抗原エピトープ及び第2の抗原エピトープの距離は、ほぼ等しい。

【0365】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離が、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い場合、第1の抗原結合分子の第1のスペーサの長さは、第2の抗原結合分子の第2のスペーサの長さよりも長いものが選択される。

【0366】

一実施形態では、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離が、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも短い場合、第1の抗原結合分子の第1スペーサの長さは、第1の抗原エピトープから細胞膜までの距離と第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離の算出された差の絶対値に対応するように選択される。このような実施形態では、第2の抗原結合分子の第2スペーサは存在しないか、又は5～20アミノ酸残基、好ましくは5アミノ酸残基の長さのものが選択される。

【0367】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離が、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも大きい場合、第1の抗原結合分子の第1のスペーサの長さは、第2の抗原結合分子の第2のスペーサの長さよりも短いものが選択される。

【0368】

一実施形態では、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離が、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離よりも大きい場合、第2の抗原結合分子の第2スペーサの長さは、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離と、第2の抗原エピトープから細胞

10

20

30

40

50

表面までの距離の算出された差の値に対応するように選択される。このような実施形態では、第1の抗原結合分子の第1スぺーサは存在しないか、又は5～20アミノ酸残基、好ましくは5アミノ酸残基の長さを有するように選択される。

【0369】

一実施形態において、第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離が、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離と等しい場合、第1スぺーサ及び第2スぺーサの両方とも存在しないか、又はいずれも5～20アミノ酸残基の長さを有するものが選択される。

【0370】

一実施形態において、第1の抗原エピトープ及び第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離は、ターゲティング部分と複合体化した抗原の細胞外領域の3D構造のコンピュータ支援モデリングを用いて決定される。

【0371】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセット中の抗原結合分子に使用されるスぺーサの長さを選択するための方法を提供し、ここで、本方法は、以下のステップを含む：

- a) 第1の抗原エピトープから細胞表面までの距離を決定するステップ、
- b) 第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離を決定するステップ、
- c) ステップa) で決定された距離を、ステップb) で決定された距離から減算するステップ、

d) ステップc) から算出された絶対値が15 Å以上である場合、ステップc) から算出された絶対値に応じて、細胞表面により近い抗原エピトープに結合する抗原結合分子のスぺーサの長さを選択し、細胞表面からより遠い抗原エピトープをターゲティングする抗原結合分子のペプチドスぺーサを選択しないステップ；或いは

ステップc) から算出された絶対値が15 Å以下である場合、第1及び第2の抗原結合分子の第1及び第2のスぺーサを選択しないステップ。

【0372】

一実施形態において、第1の抗原エピトープから細胞膜までの距離と、第2の抗原エピトープから細胞表面までの距離の算出された差の絶対値は、約15 Å、20 Å、30 Å、40 Å、50 Å、60 Å、65 Å、70 Å、75 Å、80 Å、85 Å、90 Å、95 Å、100 Å、110 Å、120 Å、130 Å、140 Å、150 Å、160 Å、170 Å、180 Å、190 Å、200 Å、225 Å、250 Å、275 Å、300 Å、350 Å、400 Å、450 Å、500 Å、600 Å、700 Å、800 Å、又は約900 Åである。

【0373】

抗原エピトープから細胞表面までの相対的な位置及び／又は距離は、ターゲティング部分と複合体化した抗原の細胞外領域の3次元構造のコンピュータ支援モデリングなど、当技術分野で公知の様々な方法によって決定することができる。目的のタンパク質／抗原の3次元構造は、Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Base (<https://www.rcsb.org/>) などの一般に入手可能なソースから検索することができる。このような3D構造は、PyMOLなどの分子可視化ソフトウェアにより解析することができる。

【0374】

或いは、抗体Fabフラグメントなどの標的部位との複合体形成の有無にかかわらず、X線タンパク質結晶構造解析による3Dタンパク質構造のde novoモデリングを使用してもよい。後者の共結晶化手法により、目的の抗原上の標的化エピトープの正確な位置を決定することができる。しかし、共結晶化はあらゆる場合に適用できるわけではない。そのため、エピトープマッピングのための代替アプローチを適用することができ、これは、アレイベースのオリゴペプチドスクリーニング、部位特異的変異誘発マッピング、ハイスループットショットガン変異誘発エピトープマッピング、水素重水素交換 (HDX)、

架橋結合質量分析など、当技術分野で公知である。こうして決定されたエピトープは、X線タンパク質結晶構造解析から得られた目的のタンパク質の3D構造モデル上にマッピングすることができ、前述したような計算手法によって目的の距離を決定することができる。

【0375】

標的抗原

本開示による個々の抗原結合分子は、様々な抗原をターゲティングするのに適している。従って、本開示による抗原結合分子のセット又は組合せは、同じ標的細胞上に存在する異なる抗原及び／又は抗原エピトープをターゲティングするのに特に適している。

【0376】

本開示による抗原結合分子が、標的抗原に特異的に結合する能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）又は当業者に周知の他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴技術（BIA CORE T100システムで分析）（Liljebladet al Glyco J 17, 323-329 (2000)）、及び伝統的な結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）のいずれかによって測定することができる。

【0377】

競合アッセイは、特定の抗原又はエピトープへの結合について参照抗体と交差競合する抗体、抗体フラグメント、抗原結合分子、又はターゲティング部分を同定するために使用され得る。

【0378】

従って、本開示による抗原結合分子のターゲティング部分は、1つの抗原又は抗原エピトープをターゲティングする。しかし、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、2つのターゲティング部分の各々は、好ましくは、それらのターゲティング部分を介して異なる抗原をターゲティングする。2つの抗原は、癌細胞又は腫瘍細胞などの1つの細胞の表面上に選択的に発現される。本開示による抗原結合分子のセットにおける両方の抗原結合分子が、それらのターゲティング部分を介して各々の抗原又は抗原エピトープに結合すると、不對VL及びVHドメインが接近し、互いに相互作用して、元の抗体Fvドメインを再構成する。従って、このようにオンセル又はオンターゲット形成された三重特異性ヘテロマー抗体分子は、それぞれ一価若しくは二価で3つの異なる抗原をターゲティングすることができる。3つの異なる抗原を一価でターゲティングする能力は、本開示による抗原結合分子のセットの特に有用な特徴である。

【0379】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のターゲティング部分によって結合される第1及び／又は第2の抗原は、腫瘍細胞上、ウイルス感染細胞上に提示される抗原、又は炎症部位で発現される抗原など、病的状態に関連する抗原である。他の適切な抗原としては、細胞表面抗原（細胞表面受容体など）、血清中の遊離抗原、及び／又は細胞外マトリックス中の抗原が挙げられる。好ましくは、このような抗原は、腫瘍関連抗原である。

【0380】

一実施形態において、抗原は、ヒト抗原である。一実施形態において、第1及び／又は第2の抗原は、腫瘍関連抗原であり、具体的には腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞上に提示される抗原である。一実施形態では、第1の抗原は、HLA制限ペプチドである。一実施形態において、第一抗原は、ペプチド／HLA-A0201複合体である。

【0381】

（腫瘍関連）抗原の非限定的な例として、例えば、以下のような抗原が挙げられる：AR、AGR2、A1G1、AKAP1、AKAP2、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ANGPTL3、APOC1、ANGPTL4、AITGAV、AZGP1、BMP6、BRCA1、BAD、BAG1、BCL2、BL6R、BA2、BPAG1、CDK2、CD52、CD20、CD19、CD4、CD8、CD164、CDKN1A、

10

20

30

40

50

CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3
 、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CLDN3、CLN
 3、CYB5、CYC1、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL
 5、CXCL6、CXCL9、CHGB、CDH20、CDH7、CDH8、CDH9、
 CD44、CDH1、CDH10、CDH19、CDH20、CDH7、CDH9、CD
 H13、CDH18、CDH19、CANT1、CAV1、CDH12、CD164、C
 OL6A1、CCL2、CDH5、COL18A1、CHGA、CHGB、CLU、CO
 L1A1、COL6A1、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE
 2、COL6A1、CTNNB1、CTSB、CLDN7、CLU、CD44APC、C
 OL4A3、DSfHA、DAB2JP、DES、DNCL1、DD2、DL2、EL2
 4、EGF、E2F1、EGFR、ENO1、ERBB2、ESR1、ESR2、EL2
 、ESfHA、ELAC2、ENO2、ENO3、ERBB2、ESR1、ESR2、E
 DG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EPHB4、ESR1、ESR2、EG
 F、ERK8、EL12A、EL1A、EL24、ENHA、ELK、ECGF1、ER
 EG、EDG1、ENG、Eーカドヘリン、FGF1、FGF10、FGF11、FGF
 12、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、F
 GF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FG
 F5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FASN、FLJ12584、FLJ
 25530、F1GF、FLT1、FGFR3、F3、FOSL1、FLRT1、IL1
 2A、IL1A、IL1B、IL2、INHA、IGF1、IGF2、IL12A、IL
 1A、IL1B、IL2、INHA、IGF1R、IL2、IGFBP6、IL1A、I
 L1B、IGFBP3、IGFBP6、INSL4、IL6ST、ITGA6、IGF1
 、IGF2、INSL3、INSL4、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、
 IL6、IGFBP2、IL2RA、IL6、IGF1、IGF2、IGFBP3、IG
 FBP6、ITGA1、IGF1、ITGA6、ITGB4、INSL3、INSL4、
 IL29、IL8、ITGB3、GRP、GNRH1、GAGEB1、GAGEC1、G
 GT1、GSTP1、GATA3、GABRP、GNAS1、GSN、H1P1、HUM
 CYT2A、HGF、JAG1、JUN、LAMA5、S100A2、SCGB1D2、
 SCGB2A1、SCGB2A2、SPRR1B、SHBG、SERP1NA3、SHB
 G、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、SE
 RP1NF1、SERPINB5、SERPINE1、STAB1、TGFA、TGFB
 1、TGFB2、TGFB3、TNF、TNFSF10、TGFB1I1、TP53、T
 PM1、TPM2、TRPC6、TGFA、THBS、TEE、TNFRSF6、TNF
 SF6、TOP2A、TP53、THBS1、THBS2、THBS4、TNFAIP2
 、TP53、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB1R1、TGFA、T
 EV1P3、TGFB3、TNFA1P2、1TGB3、THBS1、THBS2、VE
 GF、VEGFC、ODZ1、PAWR、PLG、PAP、PCNA、PRKCQ、PR
 KD1、PRL、PECAM1、PF4、PROK2、PRL、PAP、PLAU、PR
 L、PSAP、PART1、PATE、PCA3、PIAS2、PGF、PGR、PLA
 U、PGR、PLXDC1、PTEN、PTGS2、PDGF、MYC、MMP2、MM
 P9、MSMB、MACMARCKS、MT3、MUC1、MAP2K7、MKi67、
 MTSS1、M1B1、MDK、NOX5、NR6A1、NR1H3、NR1I3、NR
 2F6、NR4A3、NR1H2、NR1H4、NR1I2、NR2C1、NR2C2、
 NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR3C1、NR3C2、NR4A
 1、NR4A2、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NROB1、NROB2、NR
 1D2、NR1D1、NTN4、NRP1、NRP2、NGFB、NGFR、NME1、
 KLK6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、
 KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、K6HF、KA2、KRT2A、KLK6、
 KLK3、KRT1、KDR、KLK5、KRT19、KLF5、KRT19、KRTH
 B6、RARB、RAC2、及びROBO2。

10

20

30

40

50

【0382】

一実施形態において、ターゲティング部分は、腫瘍関連抗原に結合する。一実施形態では、第1及び第2のターゲティング部分は、腫瘍関連抗原に結合する。一実施形態では、第1、第2、第3及び／又は第4のターゲティング部分は、腫瘍関連抗原に結合する。一実施形態では、第1、第2、第3及び／又は第4のターゲティング部分は、第1及び第2の腫瘍関連抗原に結合する。

【0383】

一実施形態において、第1、第2、第3及び／又は第4のターゲティング部分は、F a b又はs c F vである。一実施形態では、第1、第2、第3及び／又は第4のターゲティング部分は、F a bである。一実施形態では、第1及び／又は第2の抗原は、第1及び／又は第2の腫瘍関連抗原である。一実施形態では、第1及び／又は第3の抗原は、腫瘍関連抗原である。一実施形態では、第1及び／又は第2の抗原は、腫瘍関連抗原である。一実施形態では、第1及び第2のF a bは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する。一実施形態では、第1、第2、第3及び／又は第4のF a bは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する。

10

【0384】

一実施形態において、第1及び／又は第2の抗原は、H E R 2である。一実施形態では、第1及び／又は第2の抗原は、E G F Rである。一実施形態では、第1の抗原はH E R 2であり、第2の抗原はE G F Rである。一実施形態では、第1の抗原はE G F Rであり、第2の抗原はH E R 2である。

【0385】

一実施形態において、第1及び／又は第2のターゲティング部分は、ヒトH E R 2上のエピトープへの結合について、配列番号9のV H及び配列番号10のV Lを含む抗体と競合することができる。一実施形態では、第1及び／又は第2のターゲティング部分は、配列番号9と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるV Hドメインと、配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるV Lドメインを含む。

20

【0386】

一実施形態において、第1及び／又は第2のターゲティング部分は、ヒトE G F R上のエピトープへの結合について、配列番号11のV H及び配列番号12のV Lからなる抗体と競合することができる。一実施形態では、第1及び／又は第2のターゲティング部分は、配列番号11と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるV Hドメインと、配列番号12と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるV Lドメインを含む。

30

【0387】

一実施形態において、本開示の抗原結合分子のセットの第2の結合部位に結合する第2の抗原は、T細胞、より具体的には、細胞傷害性T細胞などの免疫細胞上に発現する抗原である。一実施形態では、第2の結合部位は、T細胞、より具体的には、細胞傷害性T細胞などの免疫細胞上に発現される抗原に結合する。一実施形態では、前記抗原はC D 3である。

40

【0388】

一実施形態において、第2の抗原は、C D 3である。一実施形態では、第2の抗原は、ヒトC D 3である。一実施形態では、第2の抗原は、C D 3 εである。一実施形態では、第2の抗原は、ヒトC D 3 εである。一実施形態では、C D 3は、本開示による抗原結合分子のセットにより一価で結合される。一実施形態では、本開示による第1及び第2の抗原結合分子のいずれも、C D 3に単独で結合しない。一実施形態では、本開示による第2の結合部位のV H及びV Lのいずれも、C D 3に単独で結合しない。

【0389】

一実施形態において、第2の結合部位は、C D 3、特にヒトC D 3に特異的である。一

50

実施形態では、抗体Fvドメインは、CD3、特にヒトCD3に特異的である。一実施形態では、第2の抗原は、配列番号57を含むヒトCD3εである。一実施形態では、第2の抗原は、配列番号58を含むヒトCD3εである。一実施形態では、第2の抗原は、配列番号57を含むヒトCD3εの細胞外領域である。

【0390】

一実施形態において、ヒトCD3εの細胞外領域は、アミノ酸配列：D G N E E M G G I T Q T P Y K V S I S G T T V I L T C P Q Y P G S E I L W Q H N D K N I G G D E D D K N I G S D E D H L S L K E F S E L E Q S G Y Y V C Y P R G S K P E D A N F Y L Y L R A R V C E N C M E M D（配列番号57）を有する。

シグナル配列を含むヒトCD3εは、UniProt P07766に従うアミノ酸配列：

【化1】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDNGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH
NDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENC
MEMDVMSVATIVIVDICITGLLLLVYYWSKNRKAKAPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPV
PNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRRI（配列番号58）

を有する。

【0391】

一実施形態において、第1及び第2の抗原結合分子の第2の結合部位は、CD3、とりわけヒトCD3、より具体的にはヒトCD3εに特異的に結合する。一実施形態では、本開示の抗原結合分子のセットにおける第1及び第2の抗原結合分子によって形成される第2の結合部位は、CD3、特にヒトCD3、より詳細にはヒトCD3εに特異的に結合する。一実施形態では、第2の結合部位は、抗体Fvドメインである。一実施形態では、抗体Fvドメインは、CD3に特異的である。一実施形態では、抗体Fvドメインは、CD3εに特異的である。一実施形態では、抗体Fvドメインは、ヒトCD3εに特異的である。

【0392】

一実施形態において、Fvドメインは、本開示の抗原結合分子のセットにおける、第1の抗原結合分子のVH又はVLドメインいずれかと第2の抗原結合分子の相補的VH又はVLドメインの非共有結合によって形成される。

【0393】

一実施形態において、CD3は、本開示による抗原結合分子のセットにより一価で結合される。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットは、CD3に一価で結合する。一実施形態では、第2の結合部位は、CD3のエピトープ、特にCD3εとの結合について、CD3に特異的なモノクローナル抗体と競合する。一実施形態では、第2の結合部位は、本出願に開示されるCD3に特異的な抗体のいずれか1つと競合し得る。一実施形態では、第2の結合部位は、その全体が本明細書に組み込まれる国際公開第2022/063819号パンフレットに開示されるCD3に特異的な抗体のいずれか1つと競合し得る。本開示の実施形態において、第2の結合部位は、国際公開第2022/063819号パンフレットに開示されるVH及び／又はVLドメインのいずれかを含む。

【0394】

一実施形態において、第2の結合部位は、CD3のエピトープとの結合について、本開示の表2又は表3に開示されるCD3に特異的な抗体のいずれか1つと競合し得る。

【0395】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットに存在する第2の結合部位は、CD3のエピトープとの結合について、配列番号1のVHドメイン及び配列番号2のVLドメインを含む抗体と競合し得る。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットに存在する第2の結合部位は、CD3のエピトープとの結合について、配列番号59の

VHドメイン及び配列番号60のVLドメインを含む抗体と競合し得る。

【0396】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインは、配列番号1のVHと配列番号2のVLを含む。一実施形態では、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインは、配列番号59のVHと配列番号60のVLを含む。

【0397】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、以下を含むVHとVLドメインを含む：

- a) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域；
- b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域；
- c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域；
- d) 配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域；
- e) 配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域；及び
- f) 配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域。

10

【0398】

一実施形態において、CD3に特異的な第2の結合部位は、以下を含むVHとVLドメインを含む：

- a) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域；
- b) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域；
- c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域；
- d) 配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域；
- e) 配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域；及び
- f) 配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域。

20

【0399】

一実施形態では、本開示による第1の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。一実施形態では、本開示による第2の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。

【0400】

一実施形態では、本開示による第1の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。一実施形態では、本開示による第2の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含む。

30

【0401】

一実施形態では、本開示による第1の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含み、本開示による第2の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含む。

【0402】

一実施形態では、本開示による第1の抗原結合分子は、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含み、本開示による第2の抗原結合分子は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。

40

【0403】

一実施形態において、本開示による第1の抗原結合分子は、以下：(a) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域、又は(b) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。

50

【0404】

一実施形態において、本開示による第1の抗原結合分子は、以下：（a）配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域；配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域、又は（b）配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含む。

【0405】

一実施形態において、本開示による第2の抗原結合分子は、以下：（a）配列番号3のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域、又は（b）配列番号61のアミノ酸配列を含むHCDR1領域、配列番号62のアミノ酸配列を含むHCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むHCDR3領域を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVHドメインを含む。

10

【0406】

一実施形態において、本開示による第2の抗原結合分子は、（a）配列番号6のアミノ酸配列を含むLCDR1領域；配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域、又は（b）配列番号63のアミノ酸配列を含むLCDR1領域、配列番号7のアミノ酸配列を含むLCDR2領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR3領域を含む、CD3に特異的な第2の結合部位のVLドメインを含む。

20

【0407】

一実施形態において、CD3に特異的なFv領域は、配列番号1又は配列番号59のアミノ酸配列を含むVHドメインと、配列番号2又は配列番号60のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む。

【0408】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットは、2つの標的細胞抗原、特に同じ癌細胞に発現する腫瘍関連抗原と、T細胞に発現するCD3に同時に結合することができる。このような一実施形態では、標的細胞は、二価結合し、T細胞は、一価結合する。

30

【0409】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットは、2つの標的細胞抗原とCD3に同時に結合することによって、T細胞と標的細胞を架橋することができる。一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットは、2つの異なる標的細胞抗原とCD3に同時に結合することによって、T細胞と標的細胞を架橋することができる。一実施形態において、このような同時結合は、標的細胞の溶解、特に腫瘍細胞の溶解をもたらす。一実施形態では、このような同時結合は、T細胞の活性化をもたらす。一実施形態において、同時結合は、以下：増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性エフェクター分子放出、細胞傷害活性、及び活性化マーカーの発現からなる群から選択される、Tリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球の細胞応答をもたらす。

40

【0410】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のセットは、抗原結合分子のセットが標的細胞上のそれらの標的抗原に結合すると、T細胞の細胞傷害活性を標的細胞にリダイレクトすることができる。本開示による実施形態のいずれかによるT細胞は、細胞傷害性T細胞である。一実施形態では、T細胞は、CD4+又はCD8+T細胞である。

【0411】

本開示による抗原結合分子のセットによって実現されるオンセル又はオンターゲット抗原形成3価又は4価の三重特異性抗体は、癌細胞などの標的細胞上に発現する第1及び第3の抗原への1価又は2価の結合、並びにT細胞上のCD3などの第2の抗原への1価の結合を可能にする。新たに形成された抗体は、第1及び第3の抗原に対する高い親和性結

50

合及び結合活性効果を併せ持ち、その結果、C D 3 及び標的抗原に対する結合親和性に有意な差が生じる。本開示による抗原結合分子のセットは、異なる標的抗原をターゲティングするのに特に適している。しかし、場合によっては、1つの標的抗原のみをターゲティングし、従って同じ抗原に対する特異性を有することが有益となり得る。

【0412】

F c 領域

本開示による抗原結合分子の F c 領域は、通常の免疫グロブリンの重鎖ドメインを含む一対のポリペプチドから成る。通常の I g G の F c 領域は、二量体として存在し、その各サブユニットは、C H 2 及び C H 3 I g G 重鎖定常ドメインを含む。2つの F c 領域サブユニットは、互いに安定な結合をすることができる。従って、一実施形態では、本開示による抗原結合分子の2つの F c 領域サブユニットは、互いに安定な結合が可能である。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、I g G F c 領域である。一実施形態では、F c 領域は、I g G 1 F c 領域である。一実施形態では、F c 領域は、ヒト由来である。一実施形態で、F c 領域は、ヒト I g G 1 F c 領域である。

10

【0413】

本開示による抗原結合分子の2つの F c 領域サブユニットは、典型的には、2つの非同ポリペプチド鎖から構成される。組換え生産における分子の収率及び純度を改善するために、F c 領域サブユニットを形成する2つの非同ポリペプチドの結合を促進する1つ又は複数の修飾を F c 領域に導入することが有利である。従って、特定の実施形態において、本開示は、自己集合して、ヘテロ二量体分子を形成する2つの異なる変異型 F c 領域サブユニットの使用に依るヘテロ二量体抗原結合分子を提供する。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、第1及び第2の F c 領域サブユニットの結合を促進する1つ若しくは複数の修飾を含む。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の第1及び第2の F c 領域サブユニット並びに／又は第3及び第4の F c 領域サブユニットは、第1及び第2の F c 領域サブユニット、並びに／又は第3及び第4の F c 領域サブユニットの結合を促進する1つ若しくは複数の修飾を含む。

20

【0414】

一実施形態において、第1の F c 領域サブユニット及び第2の F c 領域サブユニットは、同じ F c 領域サブユニットを含む2つの同一のポリペプチド鎖同士の高モ二量体化を低減するか、又は高モ二量体化を低減する1つ若しくは複数の修飾を含む。一実施形態では、第3の F c 領域サブユニット及び第4の F c 領域サブユニットは、同じ F c 領域サブユニットを含む2つの同一のポリペプチド鎖間の高モ二量体化を低減するか、又は高モ二量体化を低減する1つ若しくは複数の修飾を含む。

30

【0415】

一実施形態において、第1及び第2の F c 領域サブユニットは、ヘテロ二量体の第1の F c 領域が高モ二量体の F c 領域よりも安定であるように、異なるアミノ酸修飾を含む。一実施形態では、第3及び第4の F c 領域サブユニットは、ヘテロ二量体の第1の F c 領域が高モ二量体の F c 領域よりも安定であるように、異なるアミノ酸修飾を含む。

【0416】

一実施形態において、第1及び第2の F c 領域サブユニットは、第1及び第2の F c 領域サブユニットの結合が促進されるように、異なるアミノ酸修飾を含む。一実施形態では、第3及び第4の F c 領域サブユニットは、第3及び第4の F c 領域サブユニットの結合が促進されるように、異なるアミノ酸修飾を含む。一実施形態では、第1又は第2の F c 領域は、免疫グロブリン F c 領域である。一実施形態では、免疫グロブリン F c 領域は、I g G F c 領域である。一実施形態では、I g G F c 領域は、ヒト I g G F c 領域である。一実施形態では、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 領域である。

40

【0417】

第1の F c 領域サブユニット及び／又は第2の F c 領域サブユニットに修飾が存在してもよい。また、第3の F c 領域サブユニット及び／又は第4の F c 領域サブユニットにも修飾が存在してもよい。一実施形態では、そのような修飾は、第1及び第2の F c 領域サ

50

ブユニットに存在する。一実施形態では、そのような修飾は、第3及び第4のFc領域サブユニットに存在する。一実施形態では、そのような修飾は、第1及び第2のFc領域サブユニット、並びに第3及び第4のFc領域サブユニットに存在する。一実施形態では、そうした修飾は、各Fc領域サブユニットのCH3ドメインに存在する。修飾は、例えば、部位特異的変異誘発により、又はペプチド合成により、ポリペプチドをコードする核酸を改変することによって達成することができる。

【0418】

典型的には、当技術分野で知られているヘテロ二量体化アプローチでは、一方のポリペプチド鎖（例えば、免疫グロブリン重鎖）のCH3ドメインと、他方のポリペプチド鎖のCH3ドメインがいずれも相補的に操作されて、その結果、一方の操作されたCH3ドメインを含むポリペプチドは、同じ構造の別のポリペプチド鎖ともはやホモ二量形成することができないようになる。それにより、一方の操作CH3ドメインを含むポリペプチドは、相補的に操作されたCH3ドメインを含む他方のポリペプチドとヘテロ二量形成せざるを得なくなる。

【0419】

ヘテロ二量体化の促進を目的とするCH3修飾のためのいくつかの手法が、例えば、以下の文献に記載されている：国際公開第96/27011号パンフレット、同第98/050431号パンフレット、欧州特許第1870459号明細書、国際公開第2007/110205号パンフレット、同第2007/147901号パンフレット、同第2009/089004号パンフレット、同第2010/129304号パンフレット、同第2011/90754号パンフレット、同第2011/143545号パンフレット、同第2012/058768号パンフレット、同第2013/157954号パンフレット、同第2013/096291号パンフレットに記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0420】

当技術分野で公知であるこれらのヘテロ二量体化手法の1つは、いわゆる「ノブ-イントゥ-ホール（knobs-into-holes）」技術であり、これは、例えば、国際公開第96/027011号パンフレット、Ridgway, J. B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; Merchant, A. M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; 米国特許第5,731,168号明細書；同第7,695,936号明細書；国際公開第98/050431号パンフレット、Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)に記載されており、これらは参照により組み込まれる。「ノブ-イントゥ-ホール」技術は、広義には、以下：（1）各Fc領域サブユニットのCH3ドメインを変異させて、ヘテロ二量体化を促進するステップ；及び（2）ヘテロ二量体化を促進する条件下で、変異Fc領域サブユニットを結合させるステップを含む。「ノブ」即ち「突起」は、典型的には、親抗体の小さなアミノ酸をより大きなアミノ酸で置換することによって作製され（例えば、T366Y又はT366W）；「ホール」即ち「空隙」は、親抗体のより大きな残基をより小さなアミノ酸（例えば、Y407T、T366S、L368A及び／又はY407V）（EUIンデックスに従う番号付けを用いて）で置換することによって作製される。

【0421】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のFc領域に存在する修飾は、2つのFc領域サブユニットの一方における「ノブ変異」と、他方の相補的Fc領域サブユニットにおける「ホール変異」とを含む、「ノブ-イントゥ-ホール」修飾である。ノブ修飾及びホール修飾は、例えば、部位特異的変異誘発により、又はペプチド合成により、ポリペプチドをコードする核酸を改変することによって達成することができる。一実施形態では、各Fc領域サブユニットのCH3ドメインは、ノブ-イントゥ-ホール技術に従って修飾される。

【0422】

10

20

30

40

50

一実施形態では、E U インデックスに従う番号付けを用いて、第 1 及び／又は第 3 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、3 6 6 位のトレオニン残基がトリプトファン残基で置換され (T 3 6 6 W)、第 2 及び／又は第 4 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、4 0 7 位のチロシン残基がバリン残基で置換される (Y 4 0 7 V)。一実施形態では、第 2 及び／又は第 4 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、3 6 6 位のトレオニン残基がセリン残基で置換され (T 3 6 6 S)、3 6 8 位のロイシン残基がアラニン残基で置換される (L 3 6 8 A)。

【0 4 2 3】

一実施形態では、E U インデックスに基づく番号付けを用いて、第 1 及び／又は第 3 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、3 5 4 位のセリン残基が、システイン残基で置換され (S 3 5 4 C)、第 2 及び／又は第 4 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、3 4 9 位のチロシン残基が、システイン残基で置換される (Y 3 4 9 C)。これら 2 つのシステイン残基の導入により、2 つの F c 領域サブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、二量体がさらに安定化する (C a r t e r , J I m m u n o l M e t h o d s 2 4 8 , 7 - 1 5 (2 0 0 1)) 。

【0 4 2 4】

より具体的な実施形態において、本開示は、抗原結合分子を提供し、この場合、E U インデックスに従う番号付けを用いて、第 1 及び／又は第 3 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、3 6 6 位のトレオニン残基がトリプトファン残基で置換され (T 3 6 6 W)、3 5 4 位のセリン残基がシステイン残基で置換され (S 3 5 4 C)、第 2 及び／又は第 4 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインでは、4 0 7 位のチロシン残基がバリン残基で置換され (Y 4 0 7 V)、3 6 6 位のトレオニン残基が、セリン残基で置換され (T 3 6 6 S)、3 6 8 位のロイシン残基が、アラニン残基で置換され (L 3 6 8 A)、3 4 9 位のチロシン残基が、システイン残基で置換される (Y 3 4 9 C)。

【0 4 2 5】

本開示の一実施形態において、本開示は、抗原結合分子を提供し、この場合、第 2 の結合部位の V H ドメイン又は V L ドメインのいずれかと、ノブ変異を含む F c 領域サブユニットが、同じポリペプチド鎖上に存在する。

【0 4 2 6】

本開示の一実施形態において、本開示は、抗原結合分子を提供し、この場合、第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメインと、ノブ変異を含む F c 領域サブユニットが、同じポリペプチド鎖上に存在する。

【0 4 2 7】

一実施形態では、F a b 重鎖と、第 2 の結合部位の V H 又は V L ドメインのいずれかと、ノブ変異を含む F c 領域サブユニットが、同じポリペプチド鎖上に存在する。

【0 4 2 8】

一実施形態では、F a b 重鎖と、第 2 の結合部位の相補的 V H 又は V L ドメインと、ノブ変異を含む F c 領域サブユニットが、同じポリペプチド鎖上に存在する。

【0 4 2 9】

F c 結合

免疫グロブリンの F c 領域は一般に、抗体の有利な薬物動態学的特性、例えば、血清中での半減期の延長、並びに細胞上に発現される F c 受容体への結合を介してエフェクター機能を媒介する能力を付与する。他方で、F c 受容体への結合は、全身投与時に不要なサイトカイン放出及び重篤な副作用を招く特定の細胞表面受容体の望ましくない活性化ももたらし得る。

【0 4 3 0】

従って、特定の実施形態において、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、操作されていない F c 領域又は野生型 F c 領域と比較して、F c 受容体及び／若しくは C 1 q に対する改変された結合親和性を有するように、又は改変されたエフェクター機能を有するように、操作される。

【0431】

改変されたエフェクター機能としては、限定されないが、改変された補体依存性細胞傷害性（CDC）、改変された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、改変された抗体依存性細胞食作用（ADCP）の1つ又は複数を挙げることができる。特定の実施形態では、改変されたエフェクター機能は、CDC、ADCC及びADCPからなる群から選択される1つ又は複数である。一実施形態では、改変されたエフェクター機能は、ADCCである。一実施形態では、改変されたエフェクター機能は、CDCである。一実施形態では、改変されたエフェクター機能は、ADCPである。一実施形態では、改変されたエフェクター機能は、CDC、ADCC及びADCPである。

【0432】

改変されたエフェクター機能は、典型的には、野生型Fc領域サブユニットの少なくとも1つ、好ましくは両方を変異させることによって達成される。結合の減少と同様に、結合の増加をもたらす置換も有用である。Fc領域の結合特性を改変するためには、非保守的アミノ酸置換、即ち、あるアミノ酸を異なる構造及び／又は化学特性を備えた別のアミノ酸で置換することが好ましい。

【0433】

Fc受容体結合及び／又はエフェクター機能

特定の治療状況においては、Fc領域と、Fc受容体の1つ若しくは複数又は全部との正常な結合、及び／又はC1qなどの補体成分との結合を低減若しくは阻害することが望ましい場合がある。例えば、Fc領域と、Fcγ受容体（例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa）の1つ若しくは複数又は全部との結合を低減又は阻害することが望ましい場合がある。

【0434】

特に、本開示による抗原結合分子のセットが、免疫エフェクター細胞（TCRなど）の受容体と同時結合する場合、ADCC活性を排除又は有意に低下させるために、FcγRIIIa結合を阻止すること、且つ／又はCDC活性を排除又は有意に低下させるために、C1q結合を阻止することが望ましい。低下又は消失させたエフェクター機能としては、限定はしないが、低下させた補体依存性細胞傷害性（CDC）、低下又は消失させた抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、低下又は消失させた抗体依存性細胞食作用（ADCP）の1つ若しくは複数を挙げることができる。特定の実施形態において、低下又は消失させたエフェクター機能は、CDC、ADCC及びADCPからなる群から選択される1つ若しくは複数である。一実施形態では、低下又は消失させたエフェクター機能は、ADCCである。一実施形態では、低下又は消失させたエフェクター機能は、CDCである。一実施形態では、減少又は消失させたエフェクター機能はADCPである。実施形態において、低下又は消失させたエフェクター機能は、CDC、ADCC及びADCPである。

【0435】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較して、Fc受容体及び／又はC1qに対して低下した結合親和性を有し、且つ／又は低下したエフェクター機能を有するように操作される。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較して、低下したエフェクター機能を有するように操作される。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc受容体及び／又はC1qに対するFc領域の結合親和性を低下させ、且つ／又はエフェクター機能を低下させる、1つ若しくは複数のアミノ酸変異を含む。一般に、同じ1つ又は複数のアミノ酸変異が、Fc領域を形成する2つのFc領域サブユニットのそれぞれに存在する。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸変異は、Fc受容体に対するFc領域の結合親和性を低下させる。

【0436】

一実施形態において、操作Fc領域は、Fc受容体及び／又はC1qに実質的に結合せず、且つ／又はエフェクター機能を実質的に誘導しない。一実施形態では、Fc受容体は

10

20

30

40

50

、ヒト F c 受容体である。一実施形態では、F c 受容体は、活性化 F c 受容体である。一実施形態において、F c 受容体は、F c γ 受容体である。一実施形態において、F c 受容体は、活性化ヒト F c γ 受容体、より具体的には、ヒト F c γ R I I I a、F c γ R I 又は F c γ R I I a、最も具体的にはヒト F c γ R I I I a である。

【0437】

一実施形態において、補体成分に対する F c 領域の結合親和性、特に C 1 q に対する結合親和性を低下又は消失させる。一実施形態では、低下又は消失させたエフェクター機能は、低下又は消失させた C D C、低下又は消失させた A D C C、及び低下又は消失させた A D C P の群から選択される 1 つ若しくは複数である。特定の実施形態において、低下又は消失させたエフェクター機能は、低下した A D C C、C D C、及び A D C P である。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、F c 領域の F c 受容体及び／又は C 1 q に対する結合親和性を低下させ、且つ／又はエフェクター機能を低下させる、1 つ又は複数のアミノ酸変異を含む。

10

【0438】

一実施形態において、アミノ酸変異は、アミノ酸置換である。一実施形態では、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、F c 領域の F c 受容体に対する結合親和性、及び／又は C 1 q に対する結合親和性を低下させ、且つ／又はエフェクター機能を低下させる、1 つ若しくは複数のアミノ酸変異を含み、ここで、各 F c 領域サブユニットは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、234、235、237、330、及び 331 の群から選択される位置にアミノ酸置換を含む。

20

【0439】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子の各 F c 領域サブユニットは、L 234、L 235、及び G 237 (E U インデックスに従う番号付け) の群から選択される位置にアミノ酸置換を含む。一実施形態では、各 F c サブユニットは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、アミノ酸置換 L 234 A 及び L 235 E を含む。一実施形態では、各 F c 領域サブユニットは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、アミノ酸置換 L 234 A、L 235 E 及び G 237 A を含む。一実施形態では、各 F c 領域サブユニットは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、330 及び 331 の群から選択される位置にアミノ酸置換を含む。一実施形態では、各 F c 領域サブユニットは、E U インデックスに従う番号付けを用いて、330 及び 331 の位置にアミノ酸置換を含む。一実施形態において、アミノ酸置換は、A 330 S 又は P 331 S である。

30

【0440】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、各 F c 領域サブユニットに、F c 受容体及び／若しくは C 1 q に対する F c 領域の結合親和性を低下させ、且つ／又はエフェクター機能を低下させる 1 つ若しくは複数のアミノ酸変異を含み、ここで、前記 1 つ若しくは複数のアミノ酸変異は、L 234 A、L 235 E、G 237 A、A 330 S 及び P 331 S である。

【0441】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、F 各 F c 領域サブユニットに、F c 受容体及び／若しくは C 1 q に対する F c 領域の結合親和性を低下させ、且つ／又はエフェクター機能を低下させる 1 つ若しくは複数のアミノ酸変異から成り、ここで、上記 1 つ若しくは複数のアミノ酸変異は、L 234 A、L 235 E、G 237 A、A 330 S 及び P 331 S である。一実施形態において、F c 領域は、I g G 1 F c 領域、特にヒト I g G 1 F c 領域である。

40

【0442】

変異 F c 領域又は F c 領域サブユニットは、当技術分野で公知の遺伝学的若しくは化学的方法を用いた、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は修飾によって調製することができる。遺伝学的方法には、コード DNA 配列の部位特異的変異誘発、P C R、遺伝子合成などが含まれる。正しいヌクレオチドの変化は、例えば、シーケンシングによって確認することができる。

50

【0443】

機能性

本開示による抗原結合分子のセットは、目的の標的抗原が関与する生物学的経路によって媒介される疾患の予防及び治療に使用することができる。これは、好ましくは、標的抗原、好ましくはTAAを発現する細胞に、T細胞などの細胞傷害性免疫細胞を動員することによって達成され得る。

【0444】

本開示による抗原結合分子のセットの生物学的活性は、本明細書に開示される実施例2に記載されるものを含め、当技術分野で公知の様々なアッセイによって測定され得る。機能性活性をアッセイする方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光活性化細胞選別(FACS)などの結合アッセイ、及び当技術分野で公知の他の方法を使用することができる(以下を参照されたい: Hampton, R. et al. (1990; Serological Methods a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN) 及び Maddox, D. E. et al. (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216)。或いは、アッセイは、本開示による抗原結合分子のセットが、インビボ又はインビトロのいずれかで、生物学的標的抗原のセットとの結合により、生物学的応答を誘発する能力を調べることができる。生物学的活性としては、例えば、T細胞の増殖誘導、T細胞におけるシグナル伝達の誘導、T細胞における活性化マーカーの発現誘導、T細胞によるサイトカイン分泌の誘導、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞などの標的細胞におけるシグナル伝達の阻害、標的細胞の増殖の阻害、標的細胞の溶解の誘導、並びに腫瘍退縮の誘導及び/又は生存率の改善が挙げられる。

【0445】

一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞の溶解を誘導する方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で、前記細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞におけるシグナル伝達を阻害する方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞の増殖の阻害方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。一実施形態において、本開示は、細胞傷害性T細胞において細胞応答を誘導する方法であって、腫瘍細胞などの標的細胞の存在下で、前記細胞傷害性T細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。

【0446】

一実施形態において、前記細胞応答は、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性エフェクター分子放出、細胞傷害活性、及び活性化マーカーの発現からなる群より選択される。

【0447】

一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞の存在下で、ヒトT細胞の増殖を誘導する方法であって、T細胞の存在下で前記細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞の存在下で一次T細胞応答を刺激する方法であって、本開示による抗原結合分子のセットと前記T細胞の存在下で前記細胞を接触させることを含む方法を提供する。

【0448】

一実施形態において、本開示は、腫瘍細胞などの標的細胞に、T細胞の細胞傷害活性をリダイレクトする方法であって、前記T細胞の存在下で、前記癌細胞を本開示による抗原結合分子のセットと接触させることを含む方法を提供する。

【0449】

一実施形態において、本開示は、対象において少なくとも2つの腫瘍関連抗原(TAA

）について陽性である癌の処置のための、本開示による抗原結合分子のセットの使用を提供し、これは、以下：

- (a) 癌に罹患している対象を選択するステップ、
- (b) 上記対象から1つ又は複数の生体サンプルを採取するステップ、
- (c) 上記1つ又は複数のサンプル中の少なくとも2つの腫瘍関連抗原発現癌細胞を同定するステップ、並びに
- (d) 上記対象に、本開示による抗原結合分子のセットを有効量で投与するステップを含む。

【0450】

一実施形態において、前記癌細胞は、第1及び第2のTAAを発現する。好ましい実施形態において、前記第1及び第2のTAAは、異なる。一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子は、第1のTAAに結合し、第2の抗原結合分子は、第2のTAAに結合する。

【0451】

融合タンパク質

本開示による抗原結合分子は、1つ又は複数のさらに別の部位と融合していても、していなくてもよい。このような融合タンパク質は、遺伝学的又は化学的手法を含め、任意の適切な方法で調製され得る。前記連結部分は、分泌配列若しくはリーダー配列、検出、発現、分離若しくは精製を補助する配列、又は例えば、組換え生産中にタンパク質の安定性を高める配列を含み得る。有望な部分の非限定的な例としては、 β -ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、T7ポリメラーゼ断片、分泌シグナルペプチド、抗体若しくは抗体フラグメント、毒素、リポーター酵素、ポリヒスチジンタグのように金属イオンと結合することができる部分、検出及び／若しくは精製に適したタグ、ホモ若しくはヘテロ会合ドメイン、タンパク質の溶解度を増加させる部分、又は酵素的切断部位を含む部分が挙げられる。従って、本開示による抗原結合分子は、他の標的又は目的の標的タンパク質に結合する1つ若しくは複数のさらに別の部位を任意に含むことができる。このようなさらに別の部分は、本開示による抗原結合分子に機能性をさらに賦与してもしなくてもよく、本開示による抗原結合分子の特性を修飾してもしなくてもよいことは明らかであろう。本開示によるポリペプチドは、本明細書で定義されるように、ペプチドリンカー又はスペーサによって融合され得る。

【0452】

生産

本明細書に開示されるように本開示に従う抗原結合分子を製造する方法は、当技術分野で公知である（例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照）。本開示による抗原結合分子は、例えば、固体ペプチド合成又は組換え生産によって取得することができる。組換え生産の場合、本開示による抗原結合分子をコードする1つ若しくは複数の核酸配列を単離し、宿主細胞でのさらなるクローニング及び／又は発現のために1つ若しくは複数のベクターに挿入する。

【0453】

本開示による抗原結合分子のセットでは、各抗原結合分子は、個別に産生される。本開示の一実施形態において、各抗原結合分子は、個別に産生される。

【0454】

適切な転写／翻訳制御シグナルと一緒に、本開示による抗原結合分子のコード配列を含む発現ベクターを構築するために、当業者に周知の方法を使用することができる。このような方法としては、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ組換え／遺伝子組換えが挙げられる。例えば、以下に記載されている技術を参照されたい：Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及びAusubel et al., CURRENT PROTOC

OLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y (1989)。当技術分野で公知の方法（例えば、“Current Protocol in Molecular Biology”, Ausubel et al. (eds.), Greene Publishing Assoc. and John Wiley Interscience, New York, 1989 and 1992を参照）によって、原核（例えば、細菌）細胞又は真核（例えば、酵母若しくは哺乳動物）細胞などの適切な宿主細胞にベクターを導入することができる。多数のクローニングベクターが当業者に知られており、適切なクローニングベクターの選択は、随意にできる。コード配列は、プロモーター、リボソーム結合部位（細菌発現の場合）、及び任意にオペレーターの制御下に置くことができ、それにより、所望のタンパク質又はポリペプチドをコードするDNA配列が、この発現構築物を含む1ベクター又は複数のベクターによって形質転換された宿主細胞においてRNAに転写される。コード配列は、シグナルペプチド又はリーダー配列を含んでも含まなくてもよい。選択される発現系及び宿主細胞に応じて、本開示による抗原結合分子は、目的の抗原結合分子が発現される条件下で、前述の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を増殖させることによって生産される。次に、抗原結合分子を宿主細胞から単離し、精製する。発現系が抗原結合分子を増殖培地中に分泌すれば、培地からタンパク質を直接精製することができる。抗原結合分子が分泌されない場合、抗原結合分子を細胞溶解物から単離するか、又は細胞膜画分から回収する。適切な増殖条件及び回収方法の選択は、当業者が備える技能の範囲内にある。本開示による抗原結合分子は、天然に存在するタンパク質ではないことに留意すべきである。典型的には、本開示による抗原結合分子は、組換えタンパク質、合成タンパク質、又は半合成タンパク質である。

10

20

30

40

50

【0455】

一実施形態において、本開示による抗原結合分子を生産する方法が提供され、この方法は、本開示による抗原結合分子をコードする1核酸配列若しくは複数の核酸配列を含む1ベクター又は複数のベクターを含有するベクター組成物を含む宿主細胞を、抗原結合分子の発現に好適な条件下で培養するステップと、宿主細胞又は宿主細胞培養培地から抗原結合分子を回収するステップを包含する。

【0456】

複数の実施形態において、本開示による抗原結合分子の生産方法は、生産された抗原結合分子を宿主細胞又は培地から単離するステップをさらに含む。本明細書に記載のように回収された抗原結合分子は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど、当技術分野で公知の技術により精製され得る。特定のタンパク質を精製するために使用される条件は、一部には、正味電荷、疎水性、親水性などの要因に応じて変動し、それらは当業者には明らかであろう。アフィニティークロマトグラフィー精製の場合、抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体又は抗原を用いることができる。例えば、本開示による抗原結合分子のアフィニティークロマトグラフィー精製には、プロテインA又はプロテインGを有するマトリックスを使用することができる。抗原結合分子の純度は、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィーなどを含む様々な公知の分析法のいずれかによって決定することができる。

【0457】

治療方法

一実施形態において、本開示は、疾患を処置する方法を提供する。本開示による抗原結合分子のセットは、複数の治療方法に使用され得る。一実施形態では、本開示は、疾患を処置するための、本開示による抗原結合分子のセットを提供する。一実施形態では、本開示は、疾患の処置に使用するための、本開示による抗原結合分子のセットを提供する。本開示による抗原結合分子のセットは、癌の処置に使用され得る。一実施形態では、本開示は、それを必要とする対象の疾患の処置に使用するための、本開示による抗原結合分子のセットを提供する。一実施形態において、本開示は、医薬品の製造のための、本開示によ

る抗原結合分子のセットの使用を提供する。一実施形態では、本開示は、医薬品として使用するための、本開示による抗原結合分子のセットを提供する。一実施形態では、本開示は、それを必要とする対象の疾患の処置を目的とする医薬としての使用するための、本開示による抗原結合分子のセットを提供する。一実施形態では、疾患は、望ましくない抗原の存在に関連する。好ましい実施形態では、疾患は、望ましくない2つの抗原の存在に関連する。一実施形態では、処置される疾患は、増殖性疾患である。特定の実施形態では、疾患は、癌又は腫瘍である。

【0458】

癌の非限定的な例としては、膀胱癌、脳腫瘍、頭頸部癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前立腺癌、血液癌、皮膚癌、扁平上皮癌、骨癌、及び腎臓癌が挙げられる。

10

【0459】

一実施形態において、本開示は、疾患を有する対象を処置する方法に使用するための抗原結合分子のセットを提供し、この方法は、本開示による抗原結合分子のセットを治療有効量で対象に投与することを含む。一実施形態では、本方法は、治療有効量の少なくとも1つの別の治療薬を対象に投与することをさらに含む。処置を必要とする対象は、典型的には哺乳動物であり、より具体的にはヒトである。治療方法に使用するために、本開示による抗原結合分子のセットは、良質な医療のための原則に適う方法で製剤化、用量設定、並びに投与される。

【0460】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、2つの抗原結合分子は個別に投与される。一実施形態では、2つの抗原結合分子は、連続して投与される。一実施形態では、2つの抗原結合分子は、1つずつ投与される。一実施形態では、本開示は、癌を有する患者における腫瘍退縮を誘導するための方法であって、前記対象に、本開示による抗原結合分子のセットを治療有効量で投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、本開示は、癌を有する対象の生存率を改善するための方法であって、前記対象に、本開示による抗原結合分子のセットを治療有効量で投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、本開示は、癌を有する対象において免疫応答を誘発、刺激又は誘導するための方法であって、前記対象に、本開示による抗原結合分子のセットを治療有効量で投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、本開示は、癌を有する対象における抗癌免疫を増強又は誘導するための方法であって、前記対象に、本開示による抗原結合分子のセットを治療有効量で投与することを含む方法を提供する。

20

30

【0461】

診断

一実施形態において、本開示は、疾患の診断のための、本開示による抗原結合分子のセットの使用を提供する。一実施形態では、本開示は、標的抗原、好ましくは2つの標的抗原を検出するための、本開示による抗原結合分子のセットの使用を提供する。一実施形態では、本開示は、対象又はサンプル中の抗原、好ましくは2つの抗原を検出する方法であって、前記対象又はサンプルを、本開示による抗原結合分子のセットと接触させるステップを含む方法を提供する。一実施形態では、本開示は、対象の疾患を診断するための方法であって、前記対象又はサンプルを、本開示による抗原結合分子のセットと接触させるステップを含む方法を提供する。

40

【0462】

医薬組成物

本開示による抗原結合分子のセットでは、各抗原結合分子は、個別の医薬組成物中に製剤化又は含有される。これによって、標的細胞の非存在下での溶液中での2つの抗原結合分子の望ましくない二量体化又はヘテロ結合が防止される。一実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子及び少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0463】

50

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子と、少なくとも1種の薬学的に許容される担体とを含む第1の医薬組成物を提供する。

【0464】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子と、少なくとも1種の薬学的に許容される担体とを含む第2の医薬組成物を提供する。

【0465】

医薬組成物は、本開示による少なくとも1つの他の薬学的に活性の化合物をさらに含み得る。本開示による医薬組成物は、目的の1つの標的抗原若しくは複数の標的抗原に関連する疾患の診断、予防及び／又は治療に使用することができる。

10

【0466】

特に、本開示は、哺乳動物、より具体的にはヒトにおける予防、治療及び／又は診断用途に適した、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を提供する。

【0467】

一般に、本開示による抗原結合分子は、前記抗原結合分子と、少なくとも1種の薬学的に許容される担体、希釈剤若しくは賦形剤及び／又はアジュバントと、任意に、1つ若しくは複数の別の医薬活性化合物とを含む医薬組成物として製剤化され得る。このような製剤は、経口、非経口、局所投与、又は吸入による投与に適している。そのような化合物の例、並びにそれらを投与するための経路、方法及び医薬製剤又は組成物は、臨床医には明らかであろう。

20

【0468】

一実施形態において、本開示は、望ましくない2つの標的抗原の存在に関連する疾患の予防及び／又は治療に使用するための、本開示による抗原結合分子のセットに含まれる第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセットに含まれる第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を提供する。

【0469】

一実施形態において、本開示は、医薬品として使用するための、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を提供する。

30

【0470】

一実施形態において、本開示は、自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、血管疾患、感染症、血栓症、心筋梗塞、及び／若しくは糖尿病の予防並びに／又は治療に使用するための、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を提供する。

【0471】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を使用して、それを必要とする対象の自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、血管疾患、感染性疾患、血栓症、心筋梗塞、及び／又は糖尿病を処置する方法を提供する。

40

【0472】

さらに、本開示による抗原結合分子をインビボでの投与に適した形態で生産する方法も提供され、この方法は、(a)本開示による方法によって抗原結合分子を取得するステップと、(b)前記抗原結合分子を少なくとも1種の薬学的に許容される担体と一緒に製剤化するステップを含み、これによって、抗原結合分子の調製物がインビボでの投与のために製剤化される。本開示による医薬組成物は、薬学的に許容される担体に溶解した、治療

50

有効量の本開示による抗原結合分子を含有し得る。

【0473】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセットを含むキットを提供する。一実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と、本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物を含むキットを提供する。

【0474】

一実施形態において、本開示は、本開示による抗原結合分子のセットを含むキット、又は本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を含む第1の医薬組成物と本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を含む第2の医薬組成物、さらには、それを必要とする対象の癌の治療若しくはその進行の遅延、又は腫瘍増殖の抑制若しくは阻害の目的で、本開示による抗原結合分子セット又は第1及び第2の医薬組成物を投与するための指示を含む添付文書を包含するキットを提供する。

【0475】

用量設定

疾患の予防又は治療の目的で、本開示による抗原結合分子セット中の2つの抗原結合分子のそれぞれの適切な投与量は、意図される目的のために有効な量を確実にする必要があり、それは、処置しようとする疾患のタイプ、投与経路、対象の体重、抗原結合分子の具体的な種類、疾患の重症度及び経過、抗原結合分子のセットが予防目的又は治療目的のいずれで投与されるか、以前の又は同時治療介入、対象の臨床歴及び抗原結合分子のセットに対する反応、並びに主治医の裁量に応じて変動し得る。

【0476】

本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を投与するための有効な用量及びスケジュールは、経験的に決定することができ；例えば、定期的な評価によって患者の経過をモニターし、それに応じて用量を調節することができる。さらに、投与量の種間スケールリングは、当技術分野で公知の方法を用いて実施することができる（例えば、Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351）。

【0477】

一実施形態において、本開示は、抗原結合分子のセットを提供し、ここで、前記第1及び第2の抗原結合分子は、治療上有効な血清レベルを達成するのに十分な用量で投与される。

【0478】

本開示による抗原結合分子のセットにおける抗原結合分子の投与は、個別の投与を包含し、この場合、本開示による第2の抗原結合分子の投与は、第1の抗原結合分子の投与の前、それと同時、及び／又はその後に行われる。

【0479】

特定の実施形態において、抗原結合分子のセットは、静脈内投与される。特定の実施形態では、抗原結合分子のセットは、皮下投与される。

【0480】

特定の状況では、2つの抗原結合分子の「順次投与」又は「時間差投与」が考慮され得る。本明細書中で使用される場合、「順次」投与又は「時間差投与」とは、本開示による抗原結合分子のセット中の抗原結合分子の各用量が、異なる時点で、例えば、所定の間隔（例えば、数時間、数日、数週間又は数ヶ月）をあけた異なる日に対象に投与されることを意味する。

【0481】

特定の実施形態において、本開示による抗原結合分子のセット中の抗原結合分子は、順次投与される。一実施形態では、抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子が、最初に投与される。一実施形態では、抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子が、最初に投与される。

【0482】

10

20

30

40

50

一実施形態において、抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を第1の用量で投与した後、抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を第2の用量で投与する。

【0483】

第1の抗原結合分子を患者に投与した後、細胞に結合していない第1の抗原結合分子が全て血液から排出されない限り、待機期間を置き、続いて第2の抗原結合分子を投与することにより、そうでなければT細胞などの免疫エフェクター細胞の望ましくない活性化をもたらし得る血中の第1及び第2の抗原結合分子の結合を阻止することができる。

【0484】

このシナリオでは、最初に投与された本開示の第1の抗原結合分子は、好ましくは半減期延長部分が欠如しており、それによって、未結合の分子が対象の血液から比較的速やかにクリアランスされる。同時に、第2の抗原結合分子が投与されると、十分な量の第1の抗原結合分子が標的細胞上にまだ存在しており、その結果、機能性T細胞関与三重特異性抗体のオンセル形成がもたらされる。

【0485】

血液又は血漿中の未結合抗原結合分子を測定する方法及び関連する薬物動態学的アッセイは当技術分野で公知であり、そうしたものとして、抗原捕捉アッセイ、抗イディオタイプ架橋アッセイ、抗イディオタイプ捕捉サンドイッチアッセイ及び抗イディオタイプ抗原架橋アッセイなどのELISAベースのアッセイが挙げられる。

【0486】

一実施形態では、本開示による抗原結合分子のセットにおいて、第1の抗原結合分子を第1の用量で投与した後、第2の抗原結合分子を第2の用量で投与する。

【0487】

一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第1の抗原結合分子が対象の血液から排出された後に投与される。一実施形態では、第2の抗原結合分子は、第1の抗原結合分子が対象の血液中でもはや検出されなくなった時点で投与される。

【0488】

従って、特定の実施形態において、本開示は、疾患に罹患している対象を処置する方法を提供し、前記方法は、以下：

a) 本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を第1の用量で前記対象に投与するステップ、

b) 本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を第2の用量で前記対象に投与するステップを含む。

【0489】

一実施形態において、第2の抗原結合分子は、第1の抗原結合分子が対象の血液から排出された後に投与される。一実施形態では、第2の抗原結合分子は、第1の抗原結合分子が対象の血液中でもはや検出されなくなった時点で投与される。

【0490】

一実施形態において、本開示は、疾患に罹患している対象を処置する方法を提供し、前記方法は、以下：

a) 本開示による抗原結合分子のセット中の第1の抗原結合分子を第1の用量で前記対象に投与するステップ、

b) 第1の抗原結合分子が前記対象の血液から排出されるまで待機するステップ、

c) 本開示による抗原結合分子のセット中の第2の抗原結合分子を第2の用量で前記対象に投与するステップ

を含む。

【0491】

併用療法

本開示による2つの抗原結合分子のセットは、1種以上の他の治療薬と組み合わせて投与することができる。「治療薬」は、そのような処置を必要とする対象の症状又は疾患を

10

20

30

40

50

処置するために投与される任意の薬剤を包含する。特定の実施形態では、追加の治療薬は、免疫調節剤、細胞静止剤、細胞接着阻害剤、細胞傷害薬、細胞アポトーシスの活性化剤、又はアポトーシス誘導剤に対する細胞の感受性を増大する薬剤である。このような他の治療薬は、好適には、意図される目的に組み合わせる有効な量で存在する。併用療法は、併用投与（2種以上の治療薬が、同一組成物又は個別の組成物中に含まれる）、及び個別の投与を包含し、この場合、本開示による抗原結合分子のセットの投与は、追加の治療薬の投与の前、それと同時、及び／又はその後を実施され得る。また、本開示による抗原結合分子のセットは、放射線療法と組み合わせる使用することもできる。

【0492】

配列

【0493】

【表2】

表2: 本開示の抗原結合分子に使用される低親和性ヒト抗 CD3ε 抗体の VH 及び VL 並びに CDR アミノ酸配列。

抗体	鎖	配列番号	[aa]
CD3_VH	VH	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYMSWVRQAPGK GLEWVANIDYQSQHAYYAESVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	HCDR1	3	GFTFKSYMS
	HCDR2	4	NIDYQSQHAYYAESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
CD3_VL	VL	2	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYVYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQ
	LCDR1	6	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	7	RNNQRPS
	LCDR3	8	AAWDRHSHGAV

【0494】

【表3】

表3: 本開示の抗原結合分子に使用される高親和性ヒト抗 CD3ε 抗体の VH 及び VL 並びに CDR アミノ酸配列

抗体	鎖	配列番号	[aa]
CD3_VH	VH	59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK GLEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	HCDR1	61	GFTFRSHYMT
	HCDR2	62	NIDYEGTRTYAESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
CD3_VL	VL	60	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGANYVYVYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQ
	LCDR1	63	SGSSSNIGANYVY
	LCDR2	7	RNNQRPS
	LCDR3	8	AAWDRHSHGAV

【 0 4 9 5 】

【 表 4 】

表 4: 本開示の抗原結合分子に使用される抗 HER2 抗体トラスツズマブの VH 及び VL アミノ酸配列。

抗体	鎖	配列 番号	[aa]
トラスツズマブ	VH	9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
トラスツズマブ	VL	10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWFQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

10

【 0 4 9 6 】

【 表 5 】

表 5: 本開示の抗原結合分子に使用される抗 EGFR 抗体セツキシマブの VH 及び VL アミノ酸配列。

抗体	鎖	配列 番号	[aa]
セツキシマブ	VH	11	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSS
セツキシマブ	VL	12	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNG SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRT

20

【 0 4 9 7 】

30

40

50

【表 6】

表 6: 本開示の抗原結合分子に使用されるペプチドリンカーのアミノ酸配列。

リンカー	配列 番号	[aa]
(G ₄ S) ₄	16	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
PAPDA_20aa	31	AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS
ヒンジ _{trunc.}	32	KTHTCPPCP
PAPDA_20aa + ヒンジ _{trunc}	33	AQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCP
ヒンジ _{trunc}	34	EPKSCDKTHTCPPCP
B027 短リンカー_5aa	35	GQPSG
APAE_10	51	AQPAAPAPAE
APAE_10 + ヒンジ _{trunc}	106	AQPAAPAPAEKTHTCPPCP
PAPDA-A1D_20aa	53	DQPAAPAPDAHEAPAPAQGS
PAPDA_A1D_20aa + ヒンジ _{trunc}	54	DQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCP
PAPDA_40	52	AQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPA QGS
PAPDA-A1D_40aa	55	DQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPA QGS
PAPDA-A1D-40aa + ヒンジ _{trunc}	56	DQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAHEAPAPA QGSKTHTCPPCP
ヒンジ _{trunc.}	46	DKTHTCPPCP
ヒンジ _{trunc} B027	100	EPKSC
ヒンジ _{trunc} + B027 短リンカー	101	EPKSCGQPSG
ヒンジ _{trunc} + PAPDA_20	102	EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGS
ヒンジ _{trunc} + APAE_10	103	EPKSCAQPAAPAPAE
ヒンジ _{trunc} + PAPDA_40	104	EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAHE APAPAQGS
ヒンジ _{trunc} + (G ₄ S) ₄	105	EPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGGS
ヒンジ _{trunc}	107	KTHT

【 0 4 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7: N 末端及び/又は C 末端に位置するリンカー(下線で示す斜体)、CH3 ドメインのノブイントゥーホール変異、及び CH2 ドメインのサイレンシング変異を含む、B036、B038 及び B064 フォーマットの抗原結合分子に存在するヘテロ二量体Fc領域サブユニットの例示的なアミノ酸配列。

リンカー + Fc 領域 サブユニット	配列 番号	[aa]
B036 フォーマット: リンカー ^(PAPDA+ ヒンジ trunc) -CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ノブ)	13	<u>AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS</u> <u>KTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
B036 フォーマット: リンカー ^(ヒンジ trunc.) CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ホール)	14	<u>KTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
B038 フォーマット: リンカー ^(ヒンジ trunc.) CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ノブ) - (G4S) ₄ リンカー	15	<u>EPKSCDKTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <u>GGGGGS</u> <u>GGGGSGGGGSGGGGS</u>
B038 フォーマット: リンカー ^(ヒンジ trunc.) CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ホール)	14	<u>KTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
B064 フォーマット: リンカー ^(ヒンジ trunc.) CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ノブ) - (G4S) ₄ リンカー	64	<u>EPKSCDKTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <u>GGGGGS</u> <u>GGGGSGGGGSGGGGS</u>
B064 フォーマット: リンカー ^(ヒンジ trunc.) CH2 ^(AEASS) - CH3 ^(ホール)	65	<u>EPKSCDKTHTCPPCP</u> APEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【 0 4 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8: HER2 又は EGFR に対する一価結合を有すると共に、表2に記載の低親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VLドメインのいずれかを含む、図 1A に示す B027 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。

構築物 1 (B027) (トラスツズマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VL _(CD3)	17	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCGQPSGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGS SSNIGSNYYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFGSGKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSH GAVFGGGTKLTVLGQ
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWF QQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
構築物 2 (B027) (トラスツズマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VH _(CD3)	19	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCGQPSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSYMSWVRQAPGKGLEWVANIDYQSQHAY YAESVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYSAEFAHRSGLDVWGQGLTVTVSS
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWF QQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
構築物 3 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VL _(CD3)	20	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKV EPKSCGQPSGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGS SNIGSNYYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHG AVFGGGTKLTVLGQ

【 0 5 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 9】

VL _(Cetuxi.) – CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
構築物 4 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) – CH1 – リンカー _(GQPSG) – VH _(CD3)	22	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGQPSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFKSYYYMSWVRQAPGKGLEWVANIDYQSQHAYY AESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSS
VL _(Cetuxi.) – CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

【 0 5 0 1 】

30

40

50

【表 10】

表 9: 様々なリンカー、HER2 又は EGFR に対する一価結合を有すると共に、表 3 に記載の高親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VL ドメインのいずれかを含む、図 1A に示す B027 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。構築物 13~16 の各々は、配列番号 18 を有するトラスツマブの Fab 軽鎖をコードするポリペプチドをさらに包含するのに対し、構築物 17~20 は、配列番号 21 を有するセツキシマブの Fab 軽鎖をコードするポリペプチドをさらに包含する。

構築物 13 (B027) (トラスツマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VH _(CD3)	66	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCGQPSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTY AESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSS
構築物 14 (B027) (トラスツマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VH _(CD3)	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK LEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNANKNSLY QMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQ GLTVTVSS
構築物 15 (B027) (トラスツマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VH _(CD3)	68	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCAQPAAPAPAEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEG TRTYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSS
構築物 16 (B027) (トラスツマブ / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_40) - VH _(CD3)	69	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDA HEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTYA ESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSS

【0502】

10

20

30

40

【表 1 1】

構築物 17 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VL _(CD3)	70	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGQPSGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSS SNIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHG AVFGGGTKLTVLGQ
構築物 18 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VL _(CD3)	71	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSAS GTPGQRTVISCSSSSNIGANYVYWYQQLPGTAPKLL IYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQ
構築物 19 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VL _(CD3)	72	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCAQPAAPAPAEQSVLTQPPSASGTPGQRTVIS CSGSSSNIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWD RSHSHGAVFGGGTKLTVLGQ
構築物 20 (B027) (セツキシマブ / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_40) - VL _(CD3)	73	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAH EAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSS NIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHGA VFGGGTKLTVLGQ

【 0 5 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 10: HER2 又は EGFR に対する一価結合を有すると共に、表 2 に記載の低親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VL ドメインのいずれかを含む、図 1B に示す B036 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。

構築物 5 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(G4S)₄} - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ truncate) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	23	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPP SASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNYYVWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDFRSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLQQAQPA APAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
リンカー _(ヒンジ truncate) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホール)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWF QQKPGKAPKLLIYSASFVPSRFSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKTVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
構築物 6 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(G4S)₄} - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ truncate) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	24	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYMSWVRQAPGK GLEWVANIDYQSQHAYYAESVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQ GTLTVSSAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 0 4 】

10

20

30

40

【表 1 3】

リンカー _(ヒンジ truncate) - CH ₂ _(AEASS) - CH ₃ _(ホール)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWFQQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
構築物 7 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(G4S) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ truncate) - CH ₂ _(AEASS) - CH ₃ _(ノブ)	25	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALYYDYEFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNYYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADAYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
リンカー _(ヒンジ truncate) - CH ₂ _(AEASS) - CH ₃ _(ホール)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(Cetuxi.) - CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 5 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

構築物 8 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _{(G4S)4} - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ truncate.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	26	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYMSWVRQAPGKG LEWVANIDYQSQHAYYAESVKGRFTISRDNANKSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQG TLVTVSSAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
リンカー _(ヒンジ truncate.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホーブル)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
VL _(Cetuxi.) - CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGDFTLSINS VESEDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 5 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 11: 様々なリンカーの組合せ、HER2 又は EGFR に対する一価結合を有すると共に、表 3 に記載の高親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VL ドメインのいずれかを含む、図 1B に示す B036 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。構築物 21、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42 は、配列番号 18 を有するトラスツズマブの Fab 軽鎖をコードするポリペプチドをさらに包含するのに対し、構築物 22、23、25、27、29、31、33、35、37、39、及び 41 は、配列番号 21 を有するセツキシマブの Fab 軽鎖をコードするポリペプチドをさらに包含する。全ての構築物は、配列番号 14 を有する第 2 の Fc 領域サブユニット(ホール変異を担持)をコードする第 3 のポリペプチドをさらに包含する。

構築物 21 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(G4S)₄} - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3(ノブ)	74	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK GLEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGG GTLVTVSSAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 22 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _{(G4S)₄} - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3(ノブ)	75	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPS ASGTPGQRTVISCSSSSNIGANYVYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSGVPDFRSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGLKTLVLGQAQPA PAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVELTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0507】

10

20

30

40

50

【表 16】

構築物 23 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _{(G4S)⁴} - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	76	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRV EPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVLTQPPS ASGTPGQRTVISCSSSNIGANYVYVYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSPGVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQDQPA PAPDAHEAPAPAQQADQPAAPAPDAHEAPAPAQGS KTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP SIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
構築物 24 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(G4S)⁴} - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	77	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGGQTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRV VEPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK GLEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFHRSGLDVWQG GTLTVSSDQPAAPAPDAHEAPAPAQQADQPAAPAP DAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC FSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 25 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	78	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRV EPKSCGQPSGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSS SNIGANYVYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSPGVDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHG AVFGGGTKLTVLGQDQPAAPAPDAHEAPAPAQQAD QPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEAGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0508】

10

20

30

40

50

【表 17】

構築物 26 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(GQPSG)-} VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40 ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	79	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCGQPSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTY AESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSSDQPAAPAPD AHEAPAPAQQADQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTC PPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
構築物 27 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_40) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	80	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQQADQPAAPAPDAH EAPAPAQGSQSFLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSS NIGANYVYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDFR SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHGA VFGGGTKLTVLQGDQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
構築物 28 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _{(PAPDA_40)-} VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20 ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	81	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQQADQPAAPAPDA HEAPAPAQGSSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTYA ESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSSDQPAAPAPDA HEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0509】

10

20

30

40

【表 18】

構築物 29 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	82	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPAEQSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSSSNIGANYVYWYQLPGTAPKLLIYRNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWD RHSYGAVFGGGTKLTVLGQDQPAAPAPDAHEAPAPA QGADQPAAPAPDAHEAPAPAGGSKTHTCPPCPAPEA EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 30 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_40-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	83	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL LGCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCAQPAAPAPAEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRSHYMTWRQAPGKGLEWVANIDYEG TRTYAEAEVKGRTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTSLTVSSDQPA APAPDAHEAPAPAGGADQPAAPAPDAHEAPAPAGG SKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
構築物 31 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20-ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	84	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPAEQSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSSSNIGANYVYWYQLPGTAPKLLIYRNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWD RHSYGAVFGGGTKLTVLGQDQPAAPAPDAHEAPAPA QGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

【0510】

10

20

30

40

50

【表 19】

構築物 32 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20 ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	85	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCAQPAAPAPAEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEG TRTYAESVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGGQGLTVTVSSDQPA APAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 33 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetux.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VL _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20 ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	86	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWH VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSAS GTPGQRTVISCSSGSSNIGANYVYVYQQLPGTAPKLL IYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQDQPAAPAP DAHEAPAPAQGSKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 34 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VH _(CD3) - リンカー _(PAPDA_A1D_20 ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	87	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK LEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGGQ GLTVTVSSDQPAAPAPDAHEAPAPAQGSKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 20】

構築物 35 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VL _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	88	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRV EPKSCGQPSGQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS SNIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHG AVFGGGTKLTVLGQKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 36 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(GQPSG) - VH _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	89	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRV VEPKSCGQPSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTY AESVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSSKTHTCPPCPA PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 37 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(APAE₁₀) - VL _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	90	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPAEQSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSSSNIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWD RSHGAVFGGGTKLTVLGQKTHTCPPCPAPEAEGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

構築物 38 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(APAE_10) - VH _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	91	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDR VEPKSCAQPAAPAPAEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEG TRTYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLLTVSSKHTC PPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
構築物 39 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VL _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	92	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVWGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSAS GTPGQRVTISCSGSSSNIGANYVYVYQQLPGTAPKLL IYRNNQRPSGVPDFSGSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCAAWRDRSHGAVFGGGTKLTVLGQKHTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISK KQGPQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 40 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_20) - VH _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	93	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDR VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVLTVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSHYMTWVRQAPGK LEWVANIDYEGTRTYAESVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQ TLTVSSKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 1 3 】

10

20

30

40

【表 2 2】

構築物 41 (B036) (セツキシマブ / CD3 _{VL} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_40) - VL _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	94	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSTRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDAH EAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSS NIGANYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHGA VFGGGTKLTVLGQKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
構築物 42 (B036) (トラスツズマブ / CD3 _{VH} / Fc-KiH)	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(PAPDA_40) VH _(CD3) - リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	95	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV VEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGADQPAAPAPDA HEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSHYMTWVRQAPGKGLEWVANIDYEGTRTYA ESVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GYSAEFAHRSGLDVWGQGLTVTVSSKTHTCPPCPAP EAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 12: HER2 又は EGFR に対する一価結合を有すると共に、表 2 に記載の低親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VL ドメインのいずれかを含む、図 1C に示す B038 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。

構築物 9 (B038) (トラスツズマブ / Fc-KiH / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(ヘンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) - リンカー _{(G4S)⁴} - VL _(CD3)	27	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNYVYW YQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLT VLGQ
リンカー _(ヘンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホル)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWF QQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGRSGTDFTL TISLQPEDFATYYCQGHYTPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
構築物 10 (B038) (トラスツズマブ / Fc-KiH / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(ヘンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) - リンカー _{(G4S)⁴} - VH _(CD3)	28	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYYS WVRQAPGKGLEWVANIDYQSQAAYAESVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHR SGLDVWGQGTLLVTVSS

【 0 5 1 5 】

10

20

30

40

【表 2 4】

リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホーブル)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWFQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
構築物 11 (B038) (セツキシマブ / Fc-KiH / CD3 _{VL})	配列番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) - リンカー _{((G4S)4)} - VL _(CD3)	29	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSTRLSINKDNSKSSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNYYVWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSPGVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLTVLGQ
リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホーブル)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(Cetuxi.) - CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSEVEDIADYYCQQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
構築物 12 (B038) (セツキシマブ / Fc-KiH / CD3 _{VH})	配列番号	[aa]

【 0 5 1 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) - リンカー _{(G4S)4} - VH _(CD3)	30	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYMSW VRQAPGKGLEWVANIDYQSQHAYYAEVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRS GLDVWGQGTLLTVSS
リンカー _(ヒンジ trunc.) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホール)	14	KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
VL _(Cetuxi.) - CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS VESEDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

【 0 5 1 7 】

30

40

50

【表 2 6】

表 13: HER2 又は EGFR に対する二価結合を有すると共に、表 2 に記載の低親和性抗 CD3 抗体の VH 又は VLドメインのいずれかを含む、図 4A に示す B064 フォーマットの本開示による抗原結合分子のアミノ酸配列。各構築物は 4 つのポリペプチドから構成される。

構築物 43 (B064) (トラスツズマブ / Fc-KiH / CD3 _{VL})	配列 番号	[aa]
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(ヘンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) - リンカー _{(G4S)⁴} - VL _(CD3)	96	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNYYVW YQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCAAWDRHSHGAVFGGGTKLT VLGQ
VL _(Trast.) - CL	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWF QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VH _(Trast.) - CH1 - リンカー _(ヘンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホール)	97	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

構築物 44 (B064) (セツキシマブ / Fc-KiH / CD3 _{VH})	配列 番号	[aa]
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ) ・リンカー _{(G4S)₄} - VH _(CD3)	98	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYMSW VRQAPGKGLEWVANIDYQSQHAYYAESVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRS GLDVWGQGTLLTVSS
VL _(Cetuxi.) - CL	21	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VH _(Cetuxi.) - CH1 - リンカー _(ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホー)	99	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

【実施例】

【0519】

以下は、本開示による分子及び方法の例である。本明細書で提供される一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施形態が実施され得ることが理解される。

【0520】

標準的な方法を用いて、Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されている標準的な方法を用いてDNAを操作した。ヒト免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、以下の文献に記載されている: Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242。

40

【0521】

実施例1: 1つ又は2つのFabターゲティング部分と、CD3Fv結合ドメインのVH又はVLドメインのいずれかを含む、本開示による(1 1/2)及び(2 1/2)抗原結合分子の作製及び生産。

リダイレクトされた腫瘍細胞又は癌細胞のT細胞殺傷を媒介することができる三重特異性抗体のオンセル形成にそれらを組み合わせて使用する目的で新しく設計された抗原結合

50

分子の適合性を決定するために、各抗原結合分子の様々な必要成分を、目的のフォーマットにクローニングした。

【0522】

本明細書で例示される抗原結合分子は、HER2又はEGFRに対して特異性を有するターゲティング部分としての少なくとも1つの抗体Fab部分と、CD3特異的FvドメインのVL又はVHドメインのいずれかから構成される。個別のフォーマットの基本構造を図1A～1C及び図4Aに提示する。

【0523】

B027フォーマット：

不對B027フォーマットの抗原結合分子は、ターゲティング部分としてのN末端に位置するFabと、CD3特異的Fvドメイン（「分断Fvドメイン」若しくは「1／2Fvドメイン」）のC末端に位置する不對VH又はVLドメインとから成るか、或いはそれらを含む。Fab部分とそれぞれの不對可変ドメインとの融合は、例えば、Fab重鎖のC末端と可変ドメインのN末端との間に短いペプチドリンカーGQPSG（配列番号35）を用いることによって達成される。これに関連して使用され得る代替のペプチドリンカーを表6又は表21に示す。

【0524】

B036フォーマット：

不對B036フォーマットは、B027フォーマットに基づくものであるが、半減期延長部分として全IgGFc領域を追加で含んでいる。B036フォーマットは、CD3特異的Fvドメインの不對VH又はVLドメインと融合したターゲティング部分としてのN末端に位置するFabから成るか、又はそれを含む。さらに、C末端に位置する全IgGFc領域は、不對可変ドメインに融合される。Fab部分と可変ドメインの融合は、Fab重鎖のC末端と、不對VHドメイン又はVLドメインいずれかのN末端との間の短い20mer（G4S）4リンカー（配列番号16）によって達成され、次に、このリンカーが、例えば、以下の配列：AQPAAAPAPDAHEAPAPAPAGSKTHTCP（配列番号33）を有する20merペプチドリンカーの使用により、そのC末端でFc領域に融合される。これに関連して使用され得る代替のペプチドリンカー及びペプチドリンカーの組合せを表6又は表22に示す。

【0525】

両方のFc領域サブユニットのN末端にヒトIgG1ヒンジ配列の一部（CH2－CH3セグメント）を使用することにより、2つのヒンジ配列間の鎖間ジスルフィド架橋の形成を介したヘテロ二量体Fc領域のさらなる安定化が可能になる。Fc領域はさらに、ノブイントゥーホール技術に従い、各Fc領域サブユニットのCH3ドメインに変異を導入することにより修飾された。それによって、一方の変異したCH3ドメインを含むFc領域サブユニットは、相補的に操作された他方のCH3ドメインを含むFc領域サブユニットと強制的にヘテロ二量体化される。加えて、ADCC、CDC、及びADCPなどのエフェクター機能を媒介する活性を消失させるために、各Fc領域サブユニットのCH2ドメインに変異を導入することによって、Fc領域を修飾した。

【0526】

B038フォーマット：

不對B038フォーマットは、B036フォーマットの代替的实施形態を提供する。このフォーマットでは、Fabターゲティング部分と不對CD3特異的VH又はVLドメインとの間に全Fc領域が位置し、これはそれ自体でスペーサとして機能する。

【0527】

B038フォーマットは、ターゲティング部分としてのN末端に位置するFab、CD3特異的FvドメインのC末端に位置する不對VH又はVLドメイン、及び介在する全IgGFcから成るか、又はそれらを含む。Fab部分と2つのFc領域サブユニットの一方との融合は、例えば、配列EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号34）を有するヒトIgG1ヒンジ配列の一部を含む15merペプチドリンカーの使用により達成さ

10

20

30

40

50

れる。第2のFc領域サブユニットも、そのN末端にペプチドリンカーを担持し、これは、配列KTHTCP P C P（配列番号32）を有するヒトIgG1ヒンジ配列の一部も含む。ノブ変異を担持するFc領域サブユニットと不對VH又はVLドメインのN末端との融合は、例えば、（G4S）4リンカー（配列番号16）などの20merペプチドリンカーの使用により達成される。

【0528】

ヒトIgG1ヒンジ配列の使用によって、2つのヒトIgG1ヒンジ配列間に鎖間ジスルフィド架橋が形成され、ヘテロ二量体Fc領域がさらに安定化する。ノブ-イントゥーホール技術に従い、各Fc領域サブユニットのCH3ドメインに変異を導入することにより、Fc領域をさらに修飾した。それによって、一方の変異したCH3ドメインを含むFc領域サブユニットは、相補的に操作された他方のCH3ドメインを含むFc領域サブユニットと強制的にヘテロ二量体化される。Fc領域はさらに、ADCC、CDC、及びADCPなどのエフェクター機能を媒介する活性を消失させるために、各Fc領域サブユニットのCH2ドメインに変異を導入することによってさらに修飾された。

【0529】

例示されているFcベースの抗原結合分子では、Fab重鎖、不對CD3特異的VH又はVLドメイン、並びにCH3ドメインのノブ変異を担持するFc領域サブユニットは、1つのポリペプチド鎖上に位置している。相補的なFc領域サブユニットは、CH3ドメインのホール変異を担持している。

【0530】

B064フォーマット：

不對B064フォーマットは、B038フォーマットの代替的二価ターゲティングを提供する。このフォーマットでは、第2の腫瘍ターゲティングFab（第1の腫瘍ターゲティングFabと同一）がIgG Fc領域に融合される。従って、B064フォーマットは、ターゲティング部分として2つのFab分子から成るか、又はそれらを含み、各々がそのFab重鎖のC末端で、全IgG Fc領域を形成する2つのFc領域サブユニットのうちの一方、及びCD3特異的FvドメインのC末端に位置する不對VH又はVLドメインと融合している。各Fabと2つのFc領域サブユニットの一方との融合は、例えばヒトIgG1ヒンジ配列の一部を含むペプチドリンカー、例えば、EPKSCDKTHTCP P C P（配列番号34）の配列を有するペプチドリンカーを用いることにより達成される。第2のFc領域サブユニットもそのN末端にペプチドリンカーを担持し、これはまた、例えば、KTHTCP P C P（配列番号32）の配列を有するヒトIgG1ヒンジ配列の一部も含む。ノブ変異を担持するFc領域サブユニットと不對VH又はVLドメインのN末端との融合は、例えば、（G4S）4リンカー（配列番号16）などの20merペプチドリンカーの使用により達成される。

【0531】

結合ドメイン：

ヒトHER2（UniProt：P04626）結合には、Baselga et al.，（1998，Cancer Res 58（13）：2825-2831）に記載されているようなトラスツズマブ（Trastuzumab）（HERCEPTIN（登録商標））のVH及びVLドメインをコードするヌクレオチド配列を用いた。トラスツズマブ及びその調製方法は、米国特許第5,821,337号明細書に開示されている。ハーセプチンFabと複合体化したヒトHER2の細胞外ドメインのX線結晶構造解析から、ハーセプチンは、HER2の細胞膜近位エピトープ又は膜近傍領域に結合することが明らかにされた（図3、左側パネル参照）（Cho, H.-S. et al.（2003）Nature 421：756-760）。

【0532】

ヒトEGFR結合（UniProt：P00533）には、セツキシマブ（Erbixux（登録商標））のVH及びVLドメインをコードするヌクレオチド配列を用いた。セツキシマブ及びその調製方法は、米国特許第7,060,808号明細書に記載されてい

10

20

30

40

50

る。セツキシマブ Fab と複合体化したヒト EGFR の細胞外ドメインの X 線結晶構造解析から、セツキシマブは、EGFR の細胞膜遠位エピトープ (sEGFR のドメイン III) に細胞表面まで約 50 Å の距離の地点結合することが明らかにされた (図 3、右側パネル参照) (Shiqing Li. et al. Cancer Cell; 2005 Apr; 7 (4): 301-11)。

【0533】

CD3ε の結合には、本明細書の表 2 及び表 3 に記載されている CD3 に特異的なヒト抗体の VH 及び VL ドメインをコードするヌクレオチド配列を使用した。

【0534】

本明細書に記載の実施例に従って作製した 44 個の不対抗原結合分子のアミノ酸配列の概要を表 8～13 に記載する。

【0535】

遺伝子合成

核酸配列若しくは所望の遺伝子セグメントは全て、適切なテンプレートを用いた PCR によって作製されたか、又は適切なフランキング領域 (例えば、適切な制限酵素認識部位、リンカー配列) を有する直鎖 DNA 断片として自社で若しくは外部供給業者により遺伝子合成された。特異的制限酵素切断部位にフランキングされた核酸配列又は遺伝子セグメントは、標準的な分子生物学的方法を用いてそれぞれの哺乳動物発現ベクターにクローニングした。哺乳動物発現ベクターでの使用が意図される場合、全ての構築物は、真核細胞での分泌のためにタンパク質をターゲティングするリーダーペプチドをコードする 5' 末端 DNA 配列を用いて設計された。サブクローニングされた遺伝子断片の DNA 配列は、DNA 二本鎖配列決定によって確認した。

【0536】

不対 1 1/2 及び 2 1/2 抗原結合分子の生産

本開示の個々の不対抗原結合分子 (表 8～表 13 による構築物 1～構築物 44) の発現のために、指数関数的に増殖する真核生物 HEK293-6E 細胞を、本明細書に開示される抗原結合分子の全ての成分をコードする哺乳動物発現ベクターで (共) トランスフェクトし、それにより、抗 CD3 Fv ドメインの VH 若しくは VL ドメイン、及び/又は適用可能であれば、目的の IgG Fc ドメイン、並びにトラスツズマブ又はセツキシマブの 1 つ若しくは 2 つの Fab 軽鎖に、それぞれ融合したトラスツズマブ又はセツキシマブいずれかの 1 つ若しくは 2 つの Fab 重鎖を含む抗原結合分子の 1:1 又は 1:1:1 又は 1:1:1 ヘテロマーが得られる。

【0537】

トランスフェクション後 6 日目に細胞培養上清を回収し、B027 フォーマットの場合は、抗 CH1 アフィニティークロマトグラフィー (Capture Select IgG-CH1 又は CH1-XL | ThermoFisher Scientific) に、又は Fc 担持 B036 B064 及び B038 フォーマットの場合は、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーに、それぞれ供した。バッファー交換は 1×ダルベッコ PBS (pH 7.2 | Invitrogen) で実施し、サンプルを滅菌濾過した (孔径 0.2 μm)。タンパク質濃度を UV 分光光度計で測定し、構築物の純度は CE-SDS (LabChip GX Touch | Perkin Elmer | USA) を用いて変性、還元、非還元条件下で分析した。UHP-SEC を実施して、個々の不対 1 1/2 抗体調製物を分析した。

【0538】

QC 結果

表 8～表 13 に従う 44 の哺乳類産生不対抗原結合分子の品質管理から、全ての構築物が許容できる収量、モノマー含量、及び純度で生産されることが明らかにされた。生産された不対抗原結合分子が標的抗原に結合する能力は、ヒト HER2 及びヒト EGFR の可溶性細胞外ドメインをそれぞれ用いた標準的な ELISA により確認した。

【0539】

10

20

30

40

50

実施例 2：癌細胞の T 細胞媒介性殺傷誘導についての (1 1 / 2) 又は (2 1 / 2) 抗原結合分子の組合せの特性決定

機能的な三重特異性抗体分子のオンセル形成を可能にするように、本明細書で開示した通りに生産された不對 1 1 / 2 又は 2 1 / 2 抗原結合分子を組み合わせた。両方の抗原結合分子が同じ細胞上で標的抗原に結合すると、CD3 特異的 VH 及び VL ドメインの機能的相補性がもたらされる。新たに形成された機能性抗 CD3 Fv ドメイン、及び該ドメインと T 細胞の結合により、癌細胞のリダイレクト殺傷が媒介される。

【0540】

方法

ヒト T 細胞の単離

健康なドナー由来のヒト全血を、例えば、Li-ヘパリン含有 S-Monovette 容器 (Sarstedt) 中に採取した。20 mL の血液を 50 mL のコニカルチューブに移し、1 mL の Rosette Sep Human CD8+ Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies, #15063) と混合してから、室温で 20 分間インキュベートした。Rosette Sep ヒト CD8+ 濃縮カクテルを含む血液を、2 % ウシ胎児血清 (Sigma, #F7524) と 2 mM EDTA を含有する等量の PBS で希釈した。希釈した血液を、15 mL の Lymphoprep 密度勾配培地 (Stemcell Technologies, #07811) の入った Sep Mate-50 チューブ (Stemcell Technologies, #85450) に移し、室温で 1200 × g、20 分間遠心分離した。上清を 50 mL のコニカルチューブに移し、2 % ウシ胎児血清と 2 mM EDTA を含む PBS で 45 mL まで希釈し、800 × g で 5 分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを、2 % ウシ胎児血清を含む 1 mL の PBS 中に再懸濁させた。細胞懸濁液をプールして、50 mL チューブに移し、2 % ウシ胎児血清を含む 30 mL PBS で希釈した。800 × g で 5 分間の遠心分離により細胞をペレット化した。細胞ペレットを 2 mL の 1 × Pharm Lyse 赤血球溶解バッファー (BD, #555899) に懸濁させ、4 °C で 10 分間インキュベートした。2 % のウシ胎児血清を含む PBS を最終体積 15 mL まで添加した。細胞を 120 × g で 10 分間ペレット化し、上清をデカントした。細胞を、2 % ウシ胎児血清含有 PBS で 2 回洗浄した後、計数した (CASY TT device, Beckman Coulter)。

【0541】

アッセイ方法 I (1 1 / 2 又は 2 1 / 2 抗原結合分子のプレミックス)

7, 500 個の HER2 及び EGFR 発現 SKOV-3 卵巣癌細胞 (ATCC (登録商標) HTB-77 (商標)) を 10 % FCS 添加培養液に懸濁させ、黒色 96 ウェルアッセイプレート (コーニング) に播種し、37 °C、並びに 5 % CO₂ 及び湿度で一晩培養した。

【0542】

CellToxGreen 染料 (Promega, #G8731) を、個別に段階希釈した後、プレミックスした、1 1 / 2 又は 2 1 / 2 抗原結合分子 (最終濃度: 0.0001 ~ 100 nM) 及び精製ヒト T 細胞 (E : T 比 10 : 1) 又はヒト PBMC (E : T 比 30 : 1) (全て、フェノールレッド不含 RPMI 1640 (Gibco, #32404-014)、GlutaMAX (Gibco 35050-038) 及び 10 % ウシ胎児血清を含むアッセイ培地で希釈した) を細胞に添加し、37 °C、5 % CO₂ 及び湿度で 48 時間又は 72 時間インキュベートした。Tecan Infinite F500 装置を用い、励起波長 485 nm 及び発光波長 535 nm で、取り込まれた CellToxGreen 蛍光を測定することにより、細胞傷害活性を評価した。

【0543】

アッセイ方法 II (不對 1 1 / 2 抗原結合分子の時間差 / 順次適用)

1 1 / 2 抗原結合分子のセットを順次又は時間差的にインビボ投与するシミュレーションのために、アッセイ方法 I を次のように変更した：

フェノールレッド不含RPMI 1640 (Gibco、#32404-014)、GlutaMAX (Gibco 35050-038) 及び10%ウシ胎児血清を含むアッセイ培地で希釈した第1の段階希釈1/2抗原結合分子(最終濃度: 0.00001~100nM)を播種細胞に添加し、37℃、5%CO₂で30分間インキュベートして結合させた。上清を廃棄し、その後、段階希釈した第2の1/2抗原結合分子(最終濃度: 0.00001~100nM)を標的細胞に添加した。37℃、5%CO₂で30分間インキュベートした後、上清をアッセイ培地により交換した。第1及び第2の抗原結合分子が結合した標的細胞を、37℃、5%CO₂でさらにインキュベートした。CellTox Green dye (Promega、#G8731)と精製ヒトT細胞(E:T比10:1)又はヒトPBMC(E:T比30:1)(全て、フェノールレッド不含RPMI 1640 (Gibco、#32404-014)、GlutaMAX (Gibco 35050-038) 及び10%ウシ胎児血清を含むアッセイ培地で希釈した)を細胞に添加し、37℃、5%CO₂及び湿度で48時間又は72時間インキュベートした。前述したように細胞傷害活性を評価した。

10

【0544】

結果

異なる1/2及び2/2抗原結合分子の組合せ手法の実験結果を表14~22にまとめる。

【0545】

一般に、EGFR、HER2及びCD3に対して特異性を有する不對1/2及び/又は2/2抗原結合分子の組合せと一緒にT細胞を共培養すると、用量依存的に標的陽性SKOV-3細胞の殺傷が誘導された。

20

【0546】

B027及びB038フォーマットにおける抗原結合分子の組合せの結果

B027及びB038フォーマットにおける組合せ手法の結果を表14にまとめる。

【0547】

HER2又はEGFRに特異的なB027及びB038フォーマットの抗原結合分子の様々な組合せは、CD3特異的Fv結合ドメインの機能的相補性を有する三重特異性抗体のオンセル形成の成功、並びに2桁から3桁ピコモル範囲の効力でインビトロ腫瘍細胞殺傷をもたらした。

30

【0548】

しかし、驚くべきことに、EGFRの膜遠位エピトープに対して特異性を有するB027フォーマットの抗原結合分子と、HER2の膜近位エピトープに対して特異性を有するB038フォーマットの抗原結合分子の非対称の組合せが、最も強力な細胞殺傷をもたらすことが判明した(表14の組合せ3を参照)。2つの1/2抗原結合分子の形状が異なるため、CD3結合ドメインの機能的相補性は恐らく生じないと考えられていたことから、これは予想外であった。さらに注目すべきことに、B027とB038フォーマットの標的特異性を交換すると、形成された三重特異性抗体のインビトロ細胞殺傷活性が著しく低下した(表14の組合せ2を参照)。

【0549】

この知見の理由は、HER2及びEGFR上の標的エピトープに配分することができる。図3に示すように、トラスツズマブは、HER2の膜近位エピトープをターゲティングしているのに対し、セツキシマブは、EGFRのより膜遠位エピトープをターゲティングしている。細胞膜から標的EGFRエピトープまでの距離は、約50Åの範囲であると推定することができる。従って、抗原結合分子のセットに存在する、不對だが、相補的なCD3可変ドメインの機能的相補性を促進するためには、これらの可変ドメインを空間的に近接させることが有益であると思われる。

40

【0550】

Fabターゲティングドメインをその不對CD3可変ドメインから分離するB038フォーマットに存在するFc部分は、分子がその標的エピトープに結合すると、そのCD3

50

可変ドメインを B 0 2 7 フォーマットに存在する相補的 C D 3 可変ドメインと空間的に近接させるストークとして働くと考えられる。実際、B 0 3 8 フォーマットのヒト I g G F c 領域の長さは約 6 5 Å であり、そのため、B 0 2 7 フォーマットの抗原結合分子が認識する E G F R エピトープの細胞表面までの推定距離と非常によく一致している。

【 0 5 5 1 】

これに対し、B 0 2 7 及び B 0 3 8 フォーマットの抗原結合分子の標的特異性を交換することにより、相補的な C D 3 可変ドメイン間の距離がさらに延長され、その結果、C D 3 F v ドメインの機能的相補性にとってあまり好ましくない状況となり、従って、細胞殺傷活性が弱くなる。この結果は、本明細書で開示されるような 1 1 / 2 抗原結合分子の組合せ、特に B 0 2 7 の抗原結合分子と B 0 3 8 フォーマットの抗原結合分子の組合せが、標的エピトープが付与する距離と共に、それらのターゲティング部分及び不對 C D 3 可変ドメインに関して異なる距離を組み込むことにより、優れた T 細胞媒介性腫瘍細胞殺傷をもたらすことを明らかに実証している。

【 0 5 5 2 】

【表 2 8】

表 14: SKOV-3 細胞の細胞表面に対称型又は非対称型三重特異性抗体に集合する B027 及び B038 フォーマットの 1 1/2 抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。「短い」は、ターゲティング Fab ドメインと不對 CD3 可変ドメインとの距離が近いことを示す。「長い」は、ターゲティング Fab ドメインと不對 CD3 可変ドメインとの間の距離が長いことを示す。「対称」は、各 Fab ターゲティングドメインが、集合 CD3 Fv ドメインに対してほぼ同じ距離を有する、オンセル形成三重特異性抗体を示す。「非対称」は、各 Fab ターゲティングドメインが、集合抗 CD3 Fv ドメインに対して有意に異なる距離を有する、オンセル形成三重特異性抗体を示す。

組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	特徴		Fab ターゲ ディン ドメイン	標的	SKOV-3 細胞上の 細胞膜に 対するエ ピトープ位置	T細胞 殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV- 3	最良の 殺傷と比較 して x 倍 高い IC ₅₀
1	対称	4	22, 21	B027	短い	-	Cetuxi.	EGFR	遠位	26	1,9
		1	17, 18	B027	短い	-	Trastu.	HER2	近位		
2	非対称	12	30,21, 14	B038	長い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	127	9,1
		1	17, 18	B027	短い	-	Trastu.	HER2	近位		
3	非対称	4	22, 21	B027	短い	-	Cetuxi.	EGFR	遠位	14	最良の 殺傷
		9	27, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu.	HER2	近位		
4	対称	12	30,21, 14	B038	長い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	80	5,8
		9	27, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu.	HER2	近位		

【 0 5 5 3 】

B 0 2 7 及び B 0 3 6 フォーマットの抗原結合分子の組合せの結果

B 0 2 7 及び B 0 3 6 フォーマットの組合せ手法の結果を表 1 5 にまとめる。ここでも、HER 2 又は E G F R に対して特異性を有する B 0 2 7 及び B 0 3 6 フォーマットの 1 1 / 2 抗原結合分子の異なる組合せは、C D 3 結合ドメインの機能的相補性を有する三重特異性抗体のオンセル形成の成功をもたらした。B 0 2 7 と B 0 3 8 フォーマットの組合せとは対照的に、2 つの腫瘍ターゲティング F a b アームの各々と新たに形成された C D 3 F v ドメインの間の距離が酷似しているため、得られたオンセル形成三重特異性抗体は対称と思われる。従って、これらの組合せでは、標的エピトープから細胞膜までの距離の差が生じない。

【 0 5 5 4 】

既に観察されたように、F c 領域がない B 0 2 7 最小フォーマットにおける 2 つの 1 1 / 2 抗原結合分子の組合せは、S K O V - 3 細胞の強力なインビトロ細胞殺傷を示した（表 1 5 の組合せ 1 を参照）。ターゲティング F a b と抗 C D 3 F v ドメイン間の距離に関して最小の組込みサイズは、あらゆる種類の標的エピトープを効率的にターゲティン

グすると考えられる。不對であるが、相補的な抗CD3可変ドメインの機能的相補性は、標的エピトープの空間的中心で起こると考えられる。この意味で、一方のCD3可変ドメインは細胞膜から離れて配向され、相補的なCD3可変ドメインは、細胞膜に向かって配向されている可能性がある。予想されたように、B027最小フォーマットの1/2抗原結合分子と、Fc担持B036フォーマットの1/2抗原結合分子の組合せは、SKOV-3細胞に対して弱いインビトロ殺傷力を示した（表15の組合せ2及び組合せ3を参照）が、これは、ほぼ間違いなく、Fcドメインの立体障害に起因するものであろう。B027及びB036フォーマット間で標的特異性を交換しても効力に有害な作用はなく、これは、オンセル形成された三重特異性抗体の対称性を裏付けるものである。B036 Fcフォーマットの2つの1/2抗体の組合せ（表15の組合せ4を参照）は、最も弱いインビトロ細胞殺傷力を示したが、これは、ほぼ間違いなく、2つの抗体の各々に全Fc領域が1つずつ存在し、それにより、立体干渉が生じたことによるものであろう。

10

【0555】

【表29】

表 15: SKOV-3 細胞の細胞表面に対称型三重特異性抗体を形成する B027 及び B036 フォーマットの 1/2抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	特徴		Fab ターゲティングドメイン	標的	細胞膜に対するエピトープ位置	T細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	2	19, 18	B027	短い	-	Trastu.	HER2	近位	20	最良の殺傷
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi.	EGFR	遠位		
2	対称	6	24, 14, 18	B036	短い	Fc	Trastu.	HER2	近位	49	2,5
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi.	EGFR	遠位		
3	対称	2	19, 18	B027	短い	-	Trastu.	HER2	近位	72	3,7
		7	25, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位		
4	対称	6	24, 14, 18	B036	短い	-	Trastu.	HER2	近位	222	11,3
		7	25, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位		

20

30

【0556】

B036 及び B038 フォーマットの抗原結合分子の組合せの結果

B036 及び B038 フォーマットの抗原結合分子に対する組合せ手法の結果を表16にまとめる。

40

【0557】

ここでも、HER2 又は EGFR に対して特異性を有する B036 及び B038 フォーマットの 1/2 抗原結合分子の様々な組合せにより、CD3 結合ドメインの機能的相補性を有する対称又は非対称の三重特異性抗体のオンセル形成の成功と、2桁から3桁のピコモル範囲の効力でインビトロ腫瘍細胞殺傷が達成された。

【0558】

この結果は、B036 フォーマットは、C末端Fc領域の存在がB027フォーマットと異なるに過ぎず、Fabターゲティングドメインと不對CD3可変ドメインとの間の距離には影響を及ぼさないため、上述のB027及びB038フォーマットの抗原結合分子の組合せで観察された結果と一致することが予想された。

50

【0559】

実際、B036とB038フォーマットの抗原結合分子の組合せは、標的エピトープの異なる距離を考慮に入れることも可能にする。トラスツズマブの膜近位エピトープをターゲティングするB038フォーマットを、セツキシマブの膜遠位エピトープをターゲティングとするB036フォーマットと組み合わせて使用すると、SKOV-3細胞の優れたインビトロ殺傷が明らかにされた（表16の組合せ3を参照）が、これら2つの抗原結合分子の標的特異性を交換すると、殺傷活性が著しく低下した（表16の組合せ2を参照）。

【0560】

先に観察されたように、B036フォーマットでの2つの1/2抗原結合分子の組合せは、最低のインビトロ細胞殺傷を示したが、これは、ほぼ間違いなく、2つの分子の各々に全Fc領域が存在し、それにより、立体干渉が生じたことによるものであろう。興味深いことに、B038フォーマットの2つの1/2抗原結合分子の組合せでは、2つの全Fc領域が存在するにもかかわらず、インビトロ細胞殺傷活性の悪化は少なかった（表16の組合せ4参照）。これは、C末端に位置するCD3可変ドメインにより説明することができ、恐らく、それらのドメインは、可変ドメインの優れた空間的アクセシビリティ及び相補性を可能にするが、B036フォーマットでは、不對可変ドメインは、恐らくC末端のFcドメインによって遮蔽される。

【0561】

まとめると、これらの結果から、標的エピトープに応じて、1/2抗原結合分子を組み合わせる（特に、B036フォーマットの抗原結合分子とB038フォーマットの抗原結合分子を組み合わせる）ことによって、優れた腫瘍細胞殺傷が達成されることが確認される。

【0562】

【表30】

表 16: SKOV-3 細胞の細胞表面に対称型又は非対称型三重特異性抗体を形成する B036 及び B038 フォーマットの 1/2 抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	特徴		Fab ターゲ ティング ドメイン	標的	細胞膜に 対するエピ トープ位置	T 細胞 殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3	最良の殺傷 と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	8	26, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	230	5,0
		5	23, 14, 18	B036	短い	Fc	Trastu.	HER2	近位		
2	非対称	12	30, 14, 21	B038	長い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	188	4,1
		5	23, 14, 18	B036	短い	Fc	Trastu.	HER2	近位		
3	非対称	8	26, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	46	最良の殺 傷
		9	27, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu.	HER2	近位		
4	対称	12	30, 14, 21	B038	長い	Fc	Cetuxi.	EGFR	遠位	77	1,7
		9	27, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu.	HER2	近位		

【0563】

B027とB038フォーマットの1/2抗原結合分子の組合せについて、並びに時間差投与と通常投与の比較によるB036及びB038フォーマットについての結果

時間差投与の手法は、個々の抗原結合分子がその標的細胞に結合する前に、血中に不要

な機能性三重特異抗体が形成されるリスクを最小限に抑えると考えられている。結合していない第1の1 1 / 2 抗原結合分子全ての全身クリアランス後に、第2の抗原結合分子を投与すれば、これらの抗原結合分子は、標的細胞上に存在する第1の抗原結合分子と結合することができる。

【0564】

B027及びB038フォーマット、並びにB036及びB038フォーマットの抗原結合分子の組合せ手法の結果を、通常適用（細胞に適用する前の1 1 / 2 抗原結合分子のプレミックス）と時間差適用（結合していない第1の抗原結合分子を除去するために中間ウォッシングステップを伴う）と比較して、それぞれ表17及び表18にまとめる。これらの結果から、本開示の1 1 / 2 抗原結合分子は、インビボでの時間差投与手法にも適していることが確認され、また、適用した異なるフォーマットの組合せの観点から、過去のエピトープ依存的殺傷の相関も確認された。セツキシマブの膜遠位エピトープをターゲティングするB036フォーマット又はB027フォーマットの抗原結合分子を、トラスツズマブの膜近位エピトープをターゲティングするB038フォーマットの抗原結合分子と組み合わせて用いる時間差投与手法では、SKOV-3細胞の優れたインビトロ殺傷活性が明らかにされたが、これら2つのフォーマット間で標的特異性を交換すると、殺傷活性が有意に低下した（データは示していない）。

【0565】

【表31】

表 17: SKOV-3 細胞に対する標準的適用(適用前に 1 1/2 抗原結合分子のプレミックス)、又は SKOV-3 細胞に対する時間差/順次適用のいずれかとして適用した、B027 及び B038 フォーマットでの 1 1/2 抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

									標準的投与		時間差投与		
組合せ		構築物	配列番号:	フォーマット	特徴		Fabターゲティングドメイン	標的	細胞膜に対するエピトープ位置	T細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (72h)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀	T細胞殺傷 IC ₅₀ [nM] SKOV-3 (72h)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	2	19, 18	B027	短い	-	Trastu	HER2	近位	45	2,1	1,8	最良の殺傷
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi	EGFR	遠位				
2	非対称	10	28, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu	HER2	近位	21	最良の殺傷	1,8	最良の殺傷
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi	EGFR	遠位				
3	非対称	10	28, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu	HER2	近位	82	3,9	19,0	10,3
		7	25, 14, 27	B036	短い	Fc	Cetuxi	EGFR	遠位				
4	対称	10	28, 14, 18	B038	長い	Fc	Trastu	HER2	近位	120	5,7	34,9	18,9
		11	29, 14, 21	B038	長い	Fc	Cetuxi	EGFR	遠位				

【0566】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 18: SKOV-3 細胞に対する標準的適用(適用前に 2 つの 1/2 抗原結合分子のプレミックス)、又は SKOV-3 細胞に対する時間差/順次適用のいずれかとして適用した、B027 及び B036 フォーマットでの 1/2 抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

									標準的投与		時間差投与		
組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	特徴		Fab ターゲティングドメイン	標的	細胞膜に対するエピトープ位置	T細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (72h)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀	T細胞殺傷 IC ₅₀ [nM] SKOV-3 (72h)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	2	19, 18	B027	短い	-	Trastu	HER2	近位	11	最良の殺傷	0,7	最良の殺傷
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi	EGFR	遠位				
2	対称	6	24, 14, 18	B036	短い	Fc	Trastu	HER2	近位	41	3,8	6,6	9,5
		3	20, 21	B027	短い	-	Cetuxi	EGFR	遠位				
3	対称	2	19, 18	B027	短い	-	Trastu	HER2	近位	73	6,9	16,3	23,3
		7	25, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi	EGFR	遠位				
4	対称	6	24, 14, 18	B036	短い	-	Trastu	HER2	近位	271	25,6	18,9	27,0
		7	25, 14, 21	B036	短い	Fc	Cetuxi	EGFR	遠位				

10

20

【0 5 6 7】

B 0 2 7 及び B 0 6 4 フォーマットの抗原結合分子の組合せの結果

B 0 2 7 及び B 0 6 4 フォーマットの組合せ手法の結果を表 1 9 にまとめる。B 0 6 4 フォーマットは、追加的 F a b ターゲティング部分の存在と、それによる標的抗原に対する I g G 様二価結合だけが B 0 3 8 フォーマットが異なることから、これらの結果は、前述した B 0 2 7 及び B 0 3 8 フォーマットの抗原結合分子の組合せについて観察された結果と一致することが予想された。トラスツズマブの膜近位エピトープをターゲティングする B 0 6 4 フォーマットを、セツキシマブの膜遠位エピトープをターゲティングする B 0 2 7 フォーマットと組み合わせて用いると、S K O V - 3 細胞の優れたインビトロ殺傷活性が明らかにされた(表 1 9 の組合せ 2 を参照)が、上記 2 つの抗原結合分子の標的特異性を交換すると、殺傷活性が有意に低下した(表 1 9 の組合せ 3 を参照)。興味深いことに、B 0 6 4 フォーマットの 2 つの抗原結合分子の組合せは、2 つの全 F c 領域が存在するにもかかわらず、最も強力なインビトロ殺傷活性を示した(表 1 9 の組合せ 4 を参照)。

30

【0 5 6 8】

40

50

【表 3 3】

表 19: SKOV-3 細胞の細胞表面に対称型又は非対称型三重特異性抗体を形成する B036 及び B064 フォーマット(標準的適用)の抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	Fab ターゲティングドメイン	標的	細胞膜に対するエピトープ位置	T 細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (72h) (n≥2)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	1	17, 18	B027	Trastu.	HER2	近位	31,0	8,1
		4	21, 22	B027	Cetuxi.	EGFR	遠位		
2	非対称	43	96, 18, 97	B064	Trastu.	HER2	近位	12,6	3
		4	21, 22	B027	Cetuxi.	EGFR	遠位		
3	非対称	1	17, 18	B027	Trastu.	HER2	近位	109,2	28
		44	98, 21, 99	B064	Cetuxi.	EGFR	遠位		
4	対称	43	96, 18, 97	B064	Trastu.	HER2	近位	3,8	最良の殺傷
		44	98, 21, 99	B064	Cetuxi.	EGFR	遠位		

10

【0569】

B036 及び B064 フォーマットでの抗原結合分子の組合せの結果

B036 及び B064 フォーマットにおける組合せ手法の結果を表 20 にまとめる。この結果は、前述のように B036 と B038 フォーマットの抗原結合分子の組合せで観察された結果と一致することが予想された。トラスツズマブの膜近位エピトープをターゲティングする B064 フォーマットを、セツキシマブの膜遠位エピトープをターゲティングする B036 フォーマットと組み合わせると、SKOV-3 細胞の優れたインビトロ殺傷が明らかにされた(表 20 の組合せ 2 を参照)が、これら 2 つの抗原結合分子の標的特異性を交換すると、殺傷活性が著しく低下した(表 20 の組合せ 3 を参照)。先に観察されたように、B036 フォーマットの 2 つの抗原結合分子の組合せでは、好ましいインビトロ細胞の殺傷活性の低下が明らかにされた(表 20 の組合せ 1 を参照)。

20

【0570】

30

【表 3 4】

表 20: SKOV-3 細胞の細胞表面に対称型又は非対称型三重特異性抗体を形成する B036 及び B064 フォーマット(標準的適用)の抗原結合分子の異なる組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ		構築物	配列番号	フォーマット	Fab ターゲティングドメイン	標的	細胞膜に対するエピトープ位置	T 細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (72h) (n≥2)	最良の殺傷と比較して x 倍高い IC ₅₀
1	対称	5	23, 14, 18	B036	Trastu.	HER2	近位	181,0	47,2
		8	26, 14, 21	B036	Cetuxi.	EGFR	遠位		
2	非対称	43	96, 18, 97	B064	Trastu.	HER2	近位	11,0	2,9
		8	26, 14, 21	B036	Cetuxi.	EGFR	遠位		
3	非対称	5	23, 14, 18	B036	Trastu.	HER2	近位	66,8	17,4
		44	98, 21, 99	B064	Cetuxi.	EGFR	遠位		
4	対称	43	96, 18, 97	B064	Trastu.	HER2	近位	3,8	最良の殺傷
		44	98, 21, 99	B064	Cetuxi.	EGFR	遠位		

40

【0571】

異なるリンカーと比較した、B027 での 1 / 2 抗原結合分子の組合せの結果

50

F a b ターゲティング部分と不對可変ドメインの間に異なるタイプのリンカーを含む B 0 2 7 フォーマットでの抗原結合分子の組合せ手法の結果を表 2 1 にまとめる。試験した構築物は全て、表 3 に従って、高親和性抗 C D 3 抗体の V H 又は V L ドメインのいずれかを使用した。これらの結果は、異なるリンカー及び 4 0 アミノ酸残基までのリンカー長さを使用しても、C D 3 特異的 F v 結合ドメインの機能的相補性を有する対称型三重特異性抗体のオンセル形成、及びインビトロ腫瘍細胞殺傷の成功をもたらすという結論を示唆している。

【 0 5 7 2 】

【表 3 5】

表 21: 異なるペプチドリンカーを有し、表 3 の高親和性抗 CD3 可変ドメインを使用する B027 フォーマット (プレミックス適用) の 1 1/2 抗原結合分子の組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ		構築物	構築物 配列番号	フォーマット	Fab と抗 CD3 V H の 又は抗 CD3 V L の 間のリンカー	リンカー 配列番号	ターゲティング Fab ドメイン	T 細胞 殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (n≥2)
1	対称	17	70, 21	B027	GQPSG-5aa	35	Cetuxi.	16,1
		13	66, 18	B027	GQPSG-5aa	35	Trastu.	
2	対称	19	72, 21	B027	APEA-10aa	51	Cetuxi.	8,3
		15	68, 18	B027	APEA-10aa	51	Trastu.	
3	対称	18	71, 21	B027	PAPDA-20aa	31	Cetuxi.	17,9
		14	67, 18	B027	PAPDA-20aa	31	Trastu.	
4	対称	20	73, 21	B027	PAPDA-40aa	52	Cetuxi.	30,9
		16	69, 18	B027	PAPDA-40aa	52	Trastu.	

【 0 5 7 3 】

異なるリンカー及びリンカーの組合せと比較した、B 0 3 6 フォーマットでの 1 1/2 抗原結合分子の組合せの結果

F a b 標的部分と不對可変ドメインの間；及び不對可変ドメインと 1 つの F c 領域サブユニットの間に、異なるタイプのリンカー及びリンカーの組合せをそれぞれ含む B 0 3 6 フォーマットの抗原結合分子の組合せ手法の結果を表 2 2 にまとめる。

【 0 5 7 4 】

試験した構築物は全て、表 3 に従って、高親和性抗 C D 3 抗体の V H 又は V L ドメインのいずれかを使用した。

【 0 5 7 5 】

ここでも、これらの結果は、異なるリンカー及び 4 9 アミノ酸残基までの異なるリンカー長さを使用しても、C D 3 特異的 F v 結合ドメインの機能的相補性を有する対称型三重特異性抗体のオンセル形成、及びインビトロ腫瘍細胞殺傷の成功をもたらすという結論を示唆している。

【 0 5 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 22: 異なるリンカー及びリンカーの組合せを有し、表 3 の高親和性抗 CD3 可変ドメインを使用する B036 フォーマット(プレミックス適用)の 1/2 抗原結合分子の組合せによる HER2 及び EGFR の二重ターゲティング。

組合せ	フォーマット	構築物	構築物配列番号	Fab と抗 CD3 VH 又は CD3 VL の間のペプチドリンカー 1	リンカー 1 配列番号	抗 CD3 可変ドメイン	抗 CD3 VH 又は抗 CD3 VL と Fc 領域の間のペプチドリンカー 2	リンカー 2 配列番号	Fab ターゲティングドメイン	T 細胞殺傷 IC ₅₀ [pM] SKOV-3 (n≥2)
1	B036	35	88, 14, 21	GQPSG-5aa	35	VL	ヒンジ _{trunc}	32	Cetuxi.	100,8
	B036	36	89, 14, 18	GQPSG-5aa	35	VH	ヒンジ _{trunc}	32	Trastu.	
2	B036	25	78, 14, 21	GQPSG-5aa	35	VL	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Cetuxi.	185,7
	B036	26	79, 14, 18	GQPSG-5aa	35	VH	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Trastu.	
3	B036	37	90, 14, 21	APAE-10aa	51	VL	ヒンジ _{trunc}	32	Cetuxi.	56,8
	B036	38	91, 14, 18	APAE-10aa	51	VH	ヒンジ _{trunc}	32	Trastu.	
4	B036	31	84, 14, 21	APAE-10aa	51	VL	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Cetuxi.	97,9
	B036	32	85, 14, 18	APAE-10aa	51	VH	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Trastu.	
5	B036	29	82, 14, 21	APAE-10aa	51	VL	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Cetuxi.	140,4
	B036	30	83, 14, 18	APAE-10aa	51	VH	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Trastu.	
6	B036	39	92, 14, 21	PAPDA-20aa	31	VL	ヒンジ _{trunc}	32	Cetuxi.	76,5
	B036	40	93, 14, 18	PAPDA-20aa	31	VH	ヒンジ _{trunc}	32	Trastu.	
7	B036	33	86, 14, 21	PAPDA-20aa	31	VL	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Cetuxi.	125,5
	B036	34	87, 14, 18	PAPDA-20aa	31	VH	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Trastu.	
8	B036	22	75, 14, 21	(G ₄ S) ₄ - 20aa	16	VL	PAPDA-20aa+ ヒンジ _{trunc}	33	Cetuxi.	79,9
	B036	21	74, 14, 18	(G ₄ S) ₄ - 20aa	16	VH	PAPDA-20aa+ ヒンジ _{trunc}	33	Trastu.	
9	B036	23	76, 14, 21	(G ₄ S) ₄ - 20aa	16	VL	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Cetuxi.	120,9
	B036	24	77, 14, 18	(G ₄ S) ₄ - 20aa	16	VH	PAPDA-A1D-40aa+ ヒンジ _{trunc}	56	Trastu.	
10	B036	27	80, 14, 21	PAPDA-40aa	52	VL	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Cetuxi.	153,7
	B036	28	81, 14, 18	PAPDA-40aa	52	VH	PAPDA-A1D-20aa+ ヒンジ _{trunc}	54	Trastu.	
11	B036	41	94, 14, 21	PAPDA-40aa	52	VL	ヒンジ _{trunc}	32	Cetuxi.	133,9
	B036	42	95, 14, 18	PAPDA-40aa	52	VH	ヒンジ _{trunc}	32	Trastu.	

10

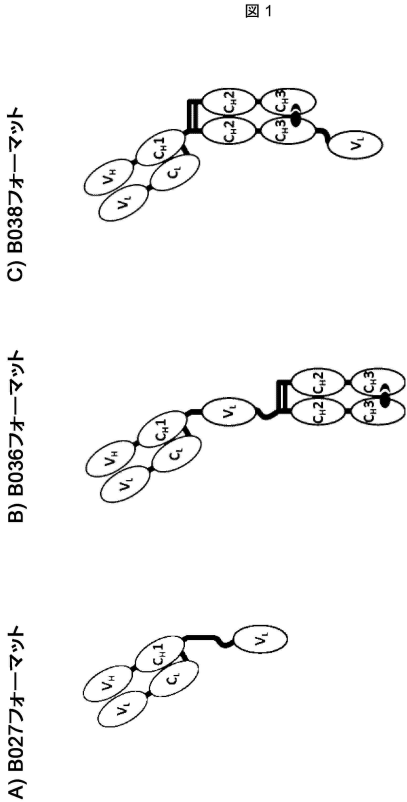
20

30

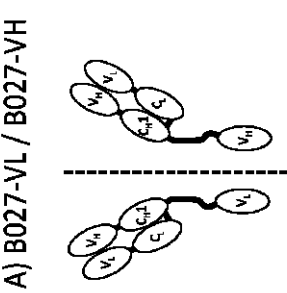
40

50

【図面】
【図 1】

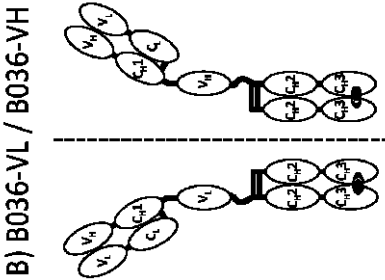


【図 2 A)】

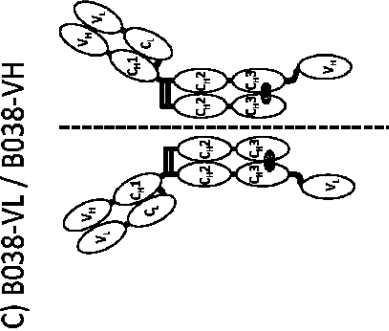


10

【図 2 B)】



【図 2 C)】



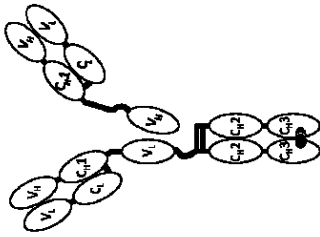
30

40

50

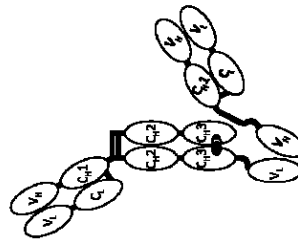
【図 2 D）】

D) B036-VL / B027-VH



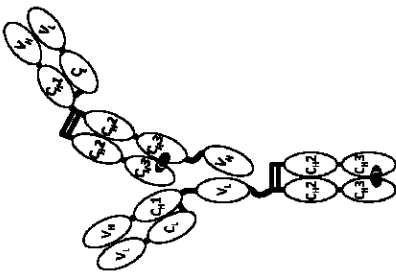
【図 2 E）】

E) B038-VL / B027-VH

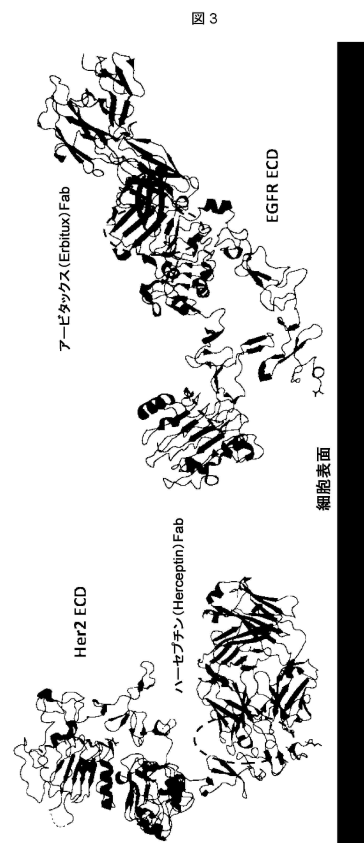


【図 2 F）】

F) B036-VL / B038-VH



【図 3】



10

20

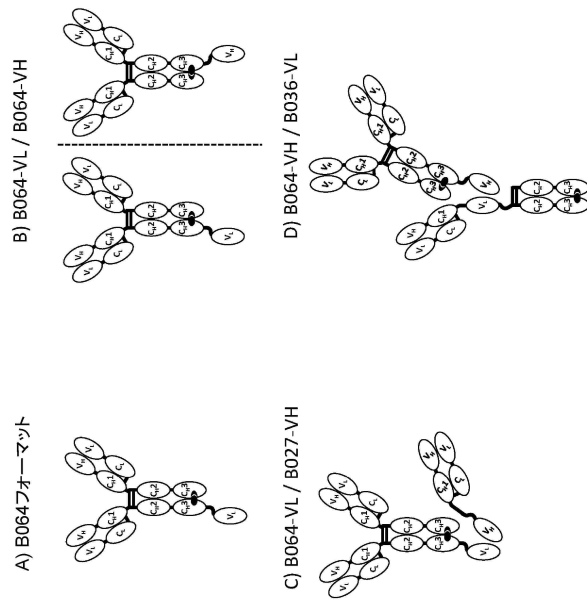
30

40

50

【 図 4 】

図 4



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/071060

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/46 A61P35/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/134710 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO LTD [CN]) 11 July 2019 (2019-07-11) paragraph [0012] paragraph [0017] paragraph [0150] figures 1-10 -----	1-22
X	WO 2021/030680 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 18 February 2021 (2021-02-18) paragraph [0002] paragraph [0035] paragraph [0110] figures 1A-1S paragraph [0118] - paragraph [0127] ----- -/-	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2022

Date of mailing of the international search report

25/10/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071060

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/104075 A1 (NOVARTIS AG [CH]; GRANDA BRIAN [US] ET AL.) 31 May 2019 (2019-05-31) paragraph [0007] example 6 -----	1-22
X	WO 2020/023553 A1 (INHIBRX INC [US]) 30 January 2020 (2020-01-30) figure 1 paragraph [0031] - paragraph [0037] paragraph [0038] -----	1-22
X	WO 2020/115115 A1 (MORPHOSYS AG [DE]) 11 June 2020 (2020-06-11) page 3, paragraph 4 - page 4, paragraph 4 page 62, paragraph 2 -----	1-22
X	WO 2016/086189 A2 (XENCOR INC [US]) 2 June 2016 (2016-06-02) paragraph [0258] paragraph [0322] figure 1 -----	1-22
A	JUSTIN CARAVELLA ET AL: "Design of next-generation protein therapeutics", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 14, no. 4, 1 August 2010 (2010-08-01) , pages 520-528, XP002662771, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/J.CBPA.2010.06.175 [retrieved on 2010-07-16] the whole document figure 1 -----	1-22
X	WO 2019/199916 A1 (LILLY CO ELI [US]) 17 October 2019 (2019-10-17) figures 3, 4 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/071060

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019134710 A1	11-07-2019	AU 2019205406 A1	27-08-2020
		CA 3085864 A1	11-07-2019
		CN 111836832 A	27-10-2020
		EP 3740510 A1	25-11-2020
		IL 275782 A	31-08-2020
		JP 2021509896 A	08-04-2021
		KR 20200118423 A	15-10-2020
		SG 11202006362R A	29-07-2020
		TW 201930349 A	01-08-2019
		US 2020369770 A1	26-11-2020
		WO 2019134710 A1	11-07-2019
WO 2021030680 A1	18-02-2021	AU 2020330063 A1	24-03-2022
		BR 112022002012 A2	07-06-2022
		CA 3147791 A1	18-02-2021
		CN 114302893 A	08-04-2022
		EP 4013797 A1	22-06-2022
		IL 290299 A	01-04-2022
		KR 20220044821 A	11-04-2022
		TW 202120553 A	01-06-2021
		US 2021047438 A1	18-02-2021
		US 2022251244 A1	11-08-2022
		WO 2021030680 A1	18-02-2021
WO 2019104075 A1	31-05-2019	AU 2018370853 A1	21-05-2020
		CA 3082283 A1	31-05-2019
		CN 111601824 A	28-08-2020
		EP 3713962 A1	30-09-2020
		IL 274591 A	30-06-2020
		JP 2021503892 A	15-02-2021
		KR 20200088440 A	22-07-2020
		RU 2020120411 A	23-12-2021
		US 2020362054 A1	19-11-2020
		WO 2019104075 A1	31-05-2019
WO 2020023553 A1	30-01-2020	CA 3105891 A1	30-01-2020
		CN 112789294 A	11-05-2021
		EP 3827019 A1	02-06-2021
		JP 2021531785 A	25-11-2021
		TW 202035451 A	01-10-2020
		US 2020048350 A1	13-02-2020
		WO 2020023553 A1	30-01-2020
WO 2020115115 A1	11-06-2020	AU 2019392711 A1	20-05-2021
		CA 3121699 A1	11-06-2020
		EP 3891186 A1	13-10-2021
		JP 2022513708 A	09-02-2022
		US 2022041719 A1	10-02-2022
		WO 2020115115 A1	11-06-2020
WO 2016086189 A2	02-06-2016	AU 2015353409 A1	15-06-2017
		AU 2017216517 A1	31-08-2017
		AU 2019201923 A1	11-04-2019
		AU 2021202061 A1	29-04-2021
		BR 112017011092 A2	26-12-2017
		CA 2967426 A1	02-06-2016
		CL 2017001328 A1	23-03-2018
		CN 107207610 A	26-09-2017

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/071060

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 110894240 A	20-03-2020
		CN 113735976 A	03-12-2021
		CO 2017005388 A2	31-10-2017
		CU 20170074 A7	07-11-2017
		DK 3223845 T3	16-08-2021
		EA 201791139 A1	30-04-2018
		EC SP17040521 A	28-02-2019
		EP 3223845 A2	04-10-2017
		EP 3928788 A1	29-12-2021
		ES 2886523 T3	20-12-2021
		GT 201700112 A	27-11-2018
		HR P20211273 T1	12-11-2021
		HU E055115 T2	28-10-2021
		JP 6696982 B2	20-05-2020
		JP 7117434 B2	12-08-2022
		JP 2017536829 A	14-12-2017
		JP 2020124209 A	20-08-2020
		JP 2022008537 A	13-01-2022
		KR 20170084326 A	19-07-2017
		LT 3223845 T	25-08-2021
		MA 55043 A	29-12-2021
		MD 3223845 T2	30-11-2021
		NZ 732144 A	24-04-2020
		PE 20171324 A1	11-09-2017
		PH 12017500968 A1	20-11-2017
		PL 3223845 T3	22-11-2021
		PT 3223845 T	20-08-2021
		RS 62332 B1	29-10-2021
		SG 11201704283P A	29-06-2017
		SI 3223845 T1	30-11-2021
		TN 2017000223 A1	19-10-2018
		US 2016229924 A1	11-08-2016
		US 2017081420 A1	23-03-2017
		US 2018282432 A1	04-10-2018
		US 2021102003 A1	08-04-2021
		US 2022041757 A1	10-02-2022
		WO 2016086189 A2	02-06-2016

WO 2019199916	A1	17-10-2019	NONE

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 イヴォンヌ シュターク

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 3 7 9, ツィールシュタット シュトラーセ 1 1 3

Fターム (参考) 4H045 AA10 AA11 CA40 DA76 EA20 FA74