(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-508117
(P2016-508117A)
(43)公表日　平成28年3月17日(2016.3.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 275 頁）　最終頁に続く

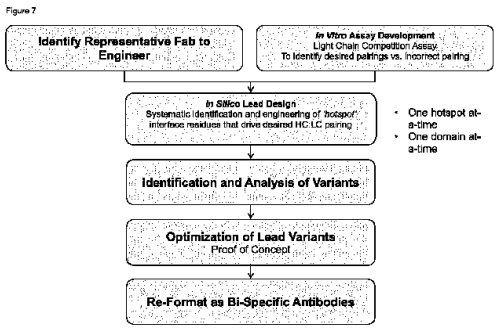
(21)出願番号　特願2015-544282 (P2015-544282)
(86)(22)出願日　平成25年11月28日 (2013.11.28)
(85)翻訳文提出日　平成27年7月9日 (2015.7.9)
(86)国際出願番号　PCT/CA2013/050914
(87)国際公開番号　WO2014/082179
(87)国際公開日　平成26年6月5日 (2014.6.5)
(31)優先権主張番号　61/730,906
(32)優先日　平成24年11月28日 (2012.11.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/761,641
(32)優先日　平成25年2月6日 (2013.2.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/818,874
(32)優先日　平成25年5月2日 (2013.5.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　510214045
ザイムワークス，インコーポレイテッド
カナダ国，ブリティッシュ　コロンビア州　ブイ６エイチ　３ブイ９，バンクーバー，ウエスト　８番　アベニュー　５４０－１３８５
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖－軽鎖対およびその使用

(57)【要約】
第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含み得るヘテロ二量体対であって、各ヘテロ二量体が、免疫グロブリン重鎖またはその断片、および免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含むヘテロ二量体対を、本発明は提供する。当該ヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、ＣＨおよび／もしくはＣＬドメインにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を、ＶＨおよび／もしくはＶＬドメインにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を、またはこれらの組み合わせを含み得る。修飾されたアミノ酸（複数を含む）は、ヘテロ二量体対の２つの重鎖および２つの軽鎖が細胞において同時発現されるときに、第１のヘテロ二量体の重鎖が、軽鎖のうちの一方と、他方よりも優先的に対合するように、軽鎖と重鎖との間の接続部分の一部であり得、典型的には、それぞれの重鎖と所望の軽鎖との間に優先的対合を生成するように、修飾される。同様に、第２のヘテロ二量体の重鎖は、典型的には、第１の軽鎖ではなく、第２の軽鎖と優先的に対合する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離された抗原結合ポリペプチド構築物であって、少なくとも第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含み、
第１のヘテロ二量体が、第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含み、第２のヘテロ二量体が、第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含み、該第１のヘテロ二量体のＨ１またはＬ１配列のうちの少なくとも１つが、該第２のヘテロ二量体の対応するＨ２またはＬ２配列とは異なり、
Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、
Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つが、少なくとも１つの定常ドメインおよび／または少なくとも１つの可変ドメインについて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合する、構築物。
【請求項２】
構築物がヘテロ二量体Ｆｃをさらに含み、該Ｆｃが少なくとも２つのC_{H3}配列を含み、該Ｆｃが、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合し、二量体化されたC_{H3}配列が、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により測定される約６８℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有し、構築物が二重特異性である、請求項１に記載の構築物。
【請求項３】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が細胞または哺乳動物細胞において同時発現されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が無細胞発現系において同時発現されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が同時生成されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２がレドックス生成系により同時生成されるときに、Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２がＬ１と比較してＬ２と優先的に対合する、請求項１～２のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項４】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つが、Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と優先的に対合し、かつ／またはＨ２がＬ１と比較してＬ２と優先的に対合するように、V_Hおよび／またはV_Lドメインの少なくとも１つのアミノ酸修飾ならびにC_{H1}および／またはC_Lドメインの少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項５】
Ｈ１がC_{H1}ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ１およびＬ２のうちの少なくとも１つが、C_Lドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、かつ／またはＨ１がV_Hドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ１およびＬ２のうちの少なくとも１つが、V_Lドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項６】
Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、および／またはＬ２が、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のアミノ酸突然変異を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項７】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つが、少なくとも１つの定常ドメインおよび／または少なくとも１つの可変ドメインについて少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のアミノ酸修飾を含む、請求項１～６のい

ずれか一項に記載の構築物。
【請求項８】
ＬＬ１およびＬ２の両方が、Ｈ１およびＨ２のうちの少なくとも１つと同時発現されるときに、Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対のうちの少なくとも１つの相対的な対合が、それぞれの対応するＨ１－Ｌ２またはＨ２－Ｌ１のヘテロ二量体対のものと比べ、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超であり、修飾されたＨ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対の相対的な対合が、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するＨ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対において観察されるそれぞれの相対的な対合よりも大きい、請求項１～７のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項９】
第１および第２のヘテロ二量体のうちの少なくとも１つの、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性が、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０℃以内であるか、または
少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む各ヘテロ二量体の、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性が、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０℃以内である、請求項１～８のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項１０】
各ヘテロ二量体の、それが結合する抗原に対する親和性が、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）またはＦＡＣＳにより測定されるそれぞれの非修飾ヘテロ二量体の、同一の抗原に対する親和性の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０倍以内である、請求項１～９のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項１１】
Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と対合するときに、Ｈ１およびＬ１のうちの少なくとも１つが、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含むか、または
Ｈ２がＬ１と比較してＬ２と対合するときに、Ｈ２およびＬ２のうちの少なくとも１つが、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含むか、または
Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と対合するときに、Ｈ１およびＬ１のうちの少なくとも１つが、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含むか、または
Ｈ２がＬ１と比較してＬ２と対合するときに、Ｈ２およびＬ２のうちの少なくとも１つが、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項１２】
少なくとも１つのアミノ酸修飾が、表２９、表３０、または表３１に示されるもののうちの１つ以上から選択される、請求項１～１１のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項１３】
構築物が、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃをさらに含み、該Ｆｃが、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する、請求項１～１２のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項１４】
Ｆｃが、ヒトＦｃ、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、ヒトＩｇＡ　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ、ヒト

ＩｇＤ　Ｆｃ、ヒトＩｇＥ　Ｆｃ、ヒトＩｇＭ　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ、またはヒトＩｇＧ４　Ｆｃである、請求項１３に記載の構築物。

【請求項１５】

Ｆｃが、ヘテロ二量体Ｆｃである、請求項１３～１４のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項１６】

Ｆｃが、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項１７】

二量体化されたC_{H3}配列が、約６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７７．５、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、または８５℃、またはそれより高い、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項１３～１６のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項１８】

Ｆｃが、生成されるときに約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％を超える純度で形成されるヘテロ二量体であるか、あるいはＦｃが、発現されるときにまたは単一細胞により発現されるときに約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％を超える純度で形成されるヘテロ二量体である、請求項１３～１７のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項１９】

Ｆｃが、

野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおける１つ以上の修飾

を含む、請求項１３～１８のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項２０】

Ｆｃが、少なくとも１つのC_{H2}配列をさらに含む、請求項１３～１９のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項２１】

ＦｃのC_{H2}配列（複数を含む）が、１つ以上の修飾を含む、請求項２０に記載の構築物。

【請求項２２】

Ｆｃが、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する１つ以上の修飾を含む、請求項１３～２１のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項２３】

Ｆｃが１つ以上のリンカーによりヘテロ二量体と結合するか、またはＦｃが１つ以上のリンカーによりＨ１およびＨ２と結合する、請求項１３～２２のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項２４】

１つ以上のリンカーが１つ以上のポリペプチドリンカーである、請求項２３に記載の構築物。

【請求項２５】

１つ以上のリンカーが１つ以上の抗体ヒンジ領域を含む、請求項２３に記載の構築物。

【請求項２６】

１つ以上のリンカーが１つ以上のＩｇＧ１ヒンジ領域を含む、請求項２３に記載の構築物。

【請求項２７】

１つ以上のリンカーが１つ以上の修飾を含む、請求項２３～２６のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項２８】

１つ以上の修飾が、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する、請求項２７に記載の構築物。
【請求項２９】
少なくとも１つのアミノ酸修飾が、少なくとも１つのアミノ酸突然変異であるか、または少なくとも１つのアミノ酸修飾が、少なくとも１つのアミノ酸置換である、請求項１～２８のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項３０】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２の各々の配列が、ヒト配列に由来する、請求項１～２９のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項３１】
多重特異性または二重特異性である、請求項１～３０のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項３２】
多価または二価である、請求項１～３１のいずれか一項に記載の構築物。
【請求項３３】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物をコードする少なくとも１つの配列を含む、単離されたポリペプチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。
【請求項３４】
ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが、ｃＤＮＡである、請求項３３に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項３５】
請求項３３または３４に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの１つ以上を含む、ベクターまたはベクターのセット。
【請求項３６】
プラスミド、マルチシストロンベクター、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、および組換え発現ベクターからなる群から選択される、請求項３５に記載のベクターまたはベクターのセット。
【請求項３７】
請求項３３または３４に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項３５または３６に記載のベクターもしくはベクターのセットを含む、単離された細胞。
【請求項３８】
細胞が、ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはＨＥＫ２９３細胞である、請求項３７に記載の単離された細胞。
【請求項３９】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。
【請求項４０】
緩衝液、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート剤、安定剤、および賦形剤からなる群から選択される１つ以上の物質をさらに含む、請求項３９に記載の薬学的組成物。
【請求項４１】
対象における疾患または障害または癌または血管系疾患の治療のための、あるいは医薬の製造における、請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物または請求項３９もしくは４０のいずれか一項に記載の薬学的組成物の使用。
【請求項４２】
疾患または障害または癌または血管系疾患に罹患している対象の治療方法であって、該対象に、請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物または請求項３９もしくは４０のいずれか一項に記載の組成物を投与する段階を含む、方法。
【請求項４３】
細胞内または細胞へのシグナルを、阻害する、減少させる、または遮断する方法であっ

て、該細胞を、請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物または請求項３９～４０のいずれか一項に記載の組成物と接触させる段階を含む、方法。
【請求項４４】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物を宿主細胞培養物から得る方法であって、
（ａ）構築物をコードする１つ以上の核酸配列を含む少なくとも１つの宿主細胞を含む宿主細胞培養物を得る段階と、
（ｂ）該宿主細胞培養物から構築物を回収する段階と
を含む、方法。
【請求項４５】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物を得る方法であって、
（ａ）Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２を得る段階と、
（ｂ）Ｈ１を、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合させ、Ｈ２を、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合させる段階と、
（ｃ）構築物を得る段階と
を含む、方法。
【請求項４６】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物を調製する方法であって、
ａ．少なくとも１つの構築物をコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを得る段階と、
ｂ．少なくとも１つの宿主細胞への導入のために、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの各々の最適比を決定する段階であって、該最適比が、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２の発現時に形成された誤対合されたＨ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ１のヘテロ二量体対と比較して、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２の発現時に形成されたＨ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対の量を評価することにより決定される、段階と、
ｃ．好ましい最適比を選択する段階であって、該好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも１つの宿主細胞へのトランスフェクションが構築物の発現をもたらす、段階と、
ｄ．最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを少なくとも１つの宿主細胞にトランスフェクトする段階と、
ｅ．構築物を発現させるために、該少なくとも１つの宿主細胞を培養する段階と
を含む、方法。
【請求項４７】
最適比を選択する段階が、一過性トランスフェクション系におけるトランスフェクションにより評価される、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも１つの宿主細胞へのトランスフェクションが、構築物の最適な発現をもたらす、請求項４６～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
構築物が、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、該Ｆｃが、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する、請求項４６～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
Ｆｃが、任意で１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体ならびに第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を

含む第２のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットであって、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異の該データセットが、表２９、３０、または３１に列挙されるこれらの突然変異あるいはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、データセットと、

Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合するであろう可能性、および／またはＨ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するであろう可能性を決定するためのコンピュータ実行コードと

を保存する、コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項５２】

優先的対合を決定するためのコンピュータ実装方法であって、

第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体ならびに第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットを得る段階であって、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異の該データセットが、表２９、３０、または３１に列挙されるこれらの突然変異あるいはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、段階と、

コンピュータプロセッサにより、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合するであろう可能性、および／またはＨ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するであろう可能性を決定する段階と

を含む、方法。

【請求項５３】

請求項１～３２のいずれか一項に記載の構築物を生成する段階をさらに含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を生成する方法であって、該二重特異性構築物が、第１の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体ならびに第２の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体を含み、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、

ａ．Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、および／またはＬ２への修飾のサブセットの導入時に、試験系において、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２内のアミノ酸修飾のセットを表すデータを含むデータセットを得る段階と、

ｂ．該データセットからの１つ以上の修飾のサブセットを第１のヘテロ二量体および／または第２のヘテロ二量体に導入する段階と、

ｃ．二重特異性構築物を含む発現産物を生成するために、少なくとも１つの宿主細胞において第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を同時発現する段階と

を含む、方法。

【請求項５５】

他のポリペプチド産物と比較して、発現産物における二重特異性構築物の量を決定する段階をさらに含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】
二重特異性構築物が、他のポリペプチド産物と比較して、７０％超の純度で生成される、請求項５４～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
データセットが、請求項５１に記載のデータセットである、請求項５４～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
他のポリペプチド産物と比較して、二重特異性構築物の純度を増加させるために、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、またはＬ２のうちの少なくとも１つに、さらなるアミノ酸修飾を加える段階をさらに含む、請求項５４～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
構築物が、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、該Ｆｃが、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する、請求項５４～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
Ｆｃが、任意で１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
抗原結合ポリペプチドが、抗体、Ｆａｂ、またはｓｃＦｖである、請求項５４～６０のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１２年１１月２８日に出願された、米国仮特許出願第６１／７３０，９０６号、２０１３年２月６日に出願された、米国仮特許出願第６１／７６１，６４１号、２０１３年５月２日に出願された、米国仮特許出願第６１／８１８，８７４号、２０１３年８月２３日に出願された、米国仮特許出願第６１／８６９，２００号の利益を主張するものであり、それらのそれぞれの全開示は、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂ経由で提出されている配列表を含有し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０１３年ＸＸＸに作成されたＡＳＣＩＩコピーは、ＸＸＸ＿ｓｅｑｕｅｎｃｅｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔと名付けられており、サイズは、ＸＸＸバイトである。
【背景技術】
【０００３】
背景
二重特異性抗体は、２つの異なるエピトープと結合することができる。エピトープは、同じ抗原上であり得るか、または各エピトープが異なる抗原上にあり得る。二重特異性抗体のこの特徴は、それらを、疾患の治療において１つを超える分子を標的とするまたは採用するための治療的有用性がある様々な治療的適応のための魅力的ツールにする。二重特異性抗体を形成するためのアプローチのうちの１つは、２つの固有の抗体重鎖および２つの固有の抗体軽鎖の同時に起こる発現を含み得る。抗体重鎖が比較的無差別な（ｐｒｏｍｉｓｃｕｏｕｓ）方法で抗体軽鎖と結合するように進化しているため、野生型と同様の形式における二重特異性抗体の正しい形成は、依然として課題である。この無差別な対合の結果として、２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖の同時発現は、重鎖-軽鎖の対合のスクランブリングを自然にもたらす。この誤対合は、二重特異性治療薬の創出の主な課題であり、均質対合が良好な製造可能性および生物学的効率における必須条件である。

【０００４】
特定の抗体軽鎖または断片が特定の抗体重鎖または断片と対合する二重特異性抗体を調製するいくつかのアプローチが、記載されている。この問題に対処する様々なアプローチの総説は、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）ｍＡｂｓ ４：６，１－１１（非特許文献１）に見出され得る。国際特許出願ＰＣＴ／ＥＰ２０１１／０５６３８８（ＷＯ２０１１／１３１７４６）（特許文献１）は、還元条件下でのインキュベーションにより２つの単一特異性ＩｇＧ４またはＩｇＧ４様抗体間の、方向性を持った「Ｆａｂアーム」または「半分子」の交換を進めるために、非対称突然変異が２つの単一特異的な出発タンパク質のＣＨ３領域に導入されるヘテロ二量体タンパク質を産生するためのインビトロの方法が記載されている。

【０００５】
Ｓｃｈａｅｆｅｒら（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ ＧｍｂＨ）は、人工的なリンカー（ＰＮＡＳ（２０１１）１０８（２７）：１１１８７－１１１９２（非特許文献２））を用いずに、ヒト二価二重特異性ＩｇＧ抗体に、２つの既存の抗体に由来する２つの重鎖および２つの軽鎖を組み立てるための方法を記載している。本方法は、二重特異性抗体の１／２の抗原結合断片（Ｆａｂ）内で重鎖ドメインおよび軽鎖ドメインを交換することを含む。

【０００６】
Ｓｔｒｏｐら（Ｒｉｎａｔ－Ｐｆｉｚｅｒ Ｉｎｃ．）は、対象となる２つの抗体を別々に発現させ、精製し、特定の還元条件下でそれらを一緒に混合することによる安定な二重特異性抗体を生成する方法を記載している（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２０１２）４２０：２０４－１９（非特許文献３））。

【０００７】
Ｚｈｕら（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）は、定常ドメインを完全に欠いている変異ドメイン抗体断片からなるダイアボディ構築物のＶＬ／ＶＨ接続部分において突然変異を遺伝子操作し、ヘテロ二量体ダイアボディを生成した（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９７）６：７８１－７８８（非特許文献４））。同様に、Ｉｇａｗａら（Ｃｈｕｇａｉ）もまた、一本鎖ダイアボディのＶＬ／ＶＨ接続部分において突然変異を遺伝子操作して、選択的発現を促進し、ダイアボディの構造異性化を阻害した（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ（２０１０）２３：６６７－６７７（非特許文献５）
）。

【０００８】
米国特許公開第２００９／０１８２１２７号（特許文献２）（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ，Ｉｎｃ．）は、１つの対の軽鎖の、もう一方の対の重鎖と相互作用する能力を減じる、Ｆｃ接続部分および軽鎖－重鎖対のＣＨ１：ＣＬ接続部分でのアミノ酸残基修飾による二重特異性抗体の生成を記載している。

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００９】
【特許文献１】国際特許出願ＰＣＴ／ＥＰ２０１１／０５６３８８（ＷＯ２０１１／１３１７４６）
【特許文献２】米国特許公開第２００９／０１８２１２７号
【非特許文献】
【００１０】
【非特許文献１】Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）ｍＡｂｓ ４：６，１－１１
【非特許文献２】ＰＮＡＳ（２０１１）１０８（２７）：１１１８７－１１１９２
【非特許文献３】Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２０１２）４２０：２０４－１９
【非特許文献４】Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９７）６：７８１－７８８
【非特許文献５】Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃ

ｔｉｏｎ（２０１０）２３：６６７－６７７
【発明の概要】
【００１１】
概要
少なくとも第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含む、単離された抗原結合ポリペプチド構築物であって、第１のヘテロ二量体は、第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含み、第２のヘテロ二量体は、第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含み、第１のヘテロ二量体のＨ１またはＬ１配列のうちの少なくとも１つは、第２のヘテロ二量体の対応するＨ２またはＬ２配列とは異なり、Ｈ１およびＨ２はそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２はそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つの定常ドメインおよび／または少なくとも１つの可変ドメインについて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ１は、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２は、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合する構築物が、本明細書に記載される。
【００１２】
いくつかの態様において、本構築物は、ヘテロ二量体Ｆｃをさらに含み、Ｆｃは、少なくとも２つのC_{H3}配列を含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合し、二量体化されたC_{H3}配列は、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により測定される約６８℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有し、構築物は二重特異性である。
【００１３】
いくつかの態様において、少なくとも１つのアミノ酸修飾は、表または実施例に示される少なくとも１つのアミノ酸修飾から選択される。
【００１４】
いくつかの態様において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が細胞または哺乳動物細胞において同時発現されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が無細胞発現系において同時発現されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２が同時生成されるときに、またはＨ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２がレドックス生成系により同時生成されるときに、Ｈ１は、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２は、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合する。
【００１５】
いくつかの態様において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つは、Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と優先的に対合し、かつ／またはＨ２がＬ１と比較してＬ２と優先的に対合するように、V_Hおよび／またはV_Lドメインの少なくとも１つのアミノ酸修飾ならびにC_{H1}および／またはC_Lドメインの少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む。
【００１６】
いくつかの態様において、Ｈ１がC_{H1}ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ１およびＬ２のうちの少なくとも１つが、C_Lドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、かつ／またはＨ１がV_Hドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ１およびＬ２のうちの少なくとも１つは、V_Lドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む。
【００１７】
いくつかの態様において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、および／またはＬ２は、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のアミノ酸突然変異を含む。いくつかの態様において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つの定常ドメインおよび／または少なくとも１つの可変ドメインについ

て少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のアミノ酸修飾を含む。

【００１８】

いくつかの態様において、Ｌ１およびＬ２の両方が、Ｈ１およびＨ２のうちの少なくとも１つと同時発現されるときに、Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対のうちの少なくとも１つの相対的な対合は、それぞれの対応するＨ１－Ｌ２またはＨ２－Ｌ１のヘテロ二量体対のものと比べ、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超であり、修飾されたＨ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対の相対的な対合は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するＨ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対において観察されるそれぞれの相対的な対合よりも大きい。

【００１９】

いくつかの態様において、第１および第２のヘテロ二量体のうちの少なくとも１つの、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０℃以内である。いくつかの態様において、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む各ヘテロ二量体の、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０℃以内である。

【００２０】

いくつかの態様において、各ヘテロ二量体の、それが結合する抗原に対する親和性は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）またはＦＡＣＳにより測定されるそれぞれの非修飾ヘテロ二量体の、同一の抗原に対する親和性の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０倍以内である。

【００２１】

いくつかの態様において、Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と対合するとき、Ｈ１およびＬ１のうちの少なくとも１つは、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含む。いくつかの態様において、Ｈ２がＬ１と比較してＬ２と対合するとき、Ｈ２およびＬ２のうちの少なくとも１つは、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含む。いくつかの態様において、Ｈ１がＬ２と比較してＬ１と対合するとき、Ｈ１およびＬ１のうちの少なくとも１つは、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含む。いくつかの態様において、Ｈ２がＬ１と比較してＬ２と対合するとき、Ｈ２およびＬ２のうちの少なくとも１つは、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む少なくとも１つのドメインを含む。

【００２２】

いくつかの態様において、少なくとも１つのアミノ酸修飾は、表または実施例のうちの少なくとも１つに示される突然変異セットである。いくつかの態様において、少なくとも１つの修飾は、Ｈ１－Ｑ３９Ｅ、Ｌ１－Ｑ３８Ｋ、Ｈ２－Ｑ３９Ｋ、およびＬ２－Ｑ３８Ｅではない。いくつかの態様において、少なくとも１つの修飾は、Ｈ１－Ｑ３９Ｅ、Ｌ１－Ｑ３８Ｅ、Ｈ２－Ｑ３９Ｋ、およびＬ２－Ｑ３８Ｋではない。

【００２３】

いくつかの態様において、本構築物は、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃをさらに含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する。

【００２４】

いくつかの態様において、Ｆｃは、ヒトＦｃ、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、ヒトＩｇＡ　Ｆｃ

、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ、ヒトＩｇＤ　Ｆｃ、ヒトＩｇＥ　Ｆｃ、ヒトＩｇＭ　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ３　Ｆｃ、またはヒトＩｇＧ４　Ｆｃである。いくつかの態様において、Ｆｃは、ヘテロ二量体Ｆｃである。いくつかの態様において、Ｆｃは、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、二量体化されたC_{H3}配列が、約６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７７．５、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、または８５℃、またはそれより高い、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの態様において、Ｆｃは、生成されるときに、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％を超える純度で形成されるヘテロ二量体であるか、あるいはＦｃは、発現されるときに、または単一細胞により発現されるときに、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％を超える純度で形成されるヘテロ二量体である。いくつかの態様において、Ｆｃは、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおける１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、少なくとも１つのC_{H2}配列をさらに含む。いくつかの態様において、ＦｃのC_{H2}配列（複数を含む）は、１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する１つ以上の修飾を含む。

【００２５】

いくつかの態様において、Ｆｃは１つ以上のリンカーによりヘテロ二量体と結合するか、またはＦｃは１つ以上のリンカーによりＨ１およびＨ２と結合する。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上のポリペプチドリンカーである。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上の抗体ヒンジ領域を含む。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上のＩｇＧ１ヒンジ領域を含む。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーへの１つ以上の修飾は、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する。

【００２６】

いくつかの態様において、少なくとも１つのアミノ酸修飾は、少なくとも１つのアミノ酸突然変異であるか、または少なくとも１つのアミノ酸修飾は、少なくとも１つのアミノ酸置換である。

【００２７】

いくつかの態様において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２の各々の配列は、ヒト配列に由来する。

【００２８】

いくつかの態様において、本構築物は、多重特異性または二重特異性である。いくつかの態様において、本構築物は、多価または二価である。

【００２９】

本明細書に記載される構築物をコードする少なくとも１つの配列を含む、単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセットもまた、本明細書に記載される。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットは、ｃＤＮＡである。

【００３０】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの１つ以上を含む、ベクターまたはベクターのセットもまた、本明細書に記載される。いくつかの態様において、ベクターまたはベクターのセットは、プラスミド、マルチシストロンベクター、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、および組換え発現ベクターからなる群から選択される。

【００３１】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセットまたは本明

細書に記載されるベクターもしくはベクターのセットを含む、単離された細胞もまた、本明細書に記載される。いくつかの態様において、本細胞は、ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはＨＥＫ２９３細胞である。

【００３２】

本明細書に記載される構築物および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物もまた、本明細書に記載される。いくつかの態様において、本組成物は、緩衝液、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート剤、安定剤、および賦形剤からなる群から選択される１つ以上の物質をさらに含む。

【００３３】

対象における疾患または障害または癌または血管系疾患の治療のための、あるいは医薬の製造における、本明細書に記載される構築物または本明細書に記載される薬学的組成物の使用もまた、本明細書に記載される。

【００３４】

疾患または障害または癌または血管系疾患に罹患している対象の治療方法であって、対象に、本明細書に記載される構築物または本明細書に記載される組成物を投与する段階を含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００３５】

細胞内または細胞へのシグナルを阻害する、減少させる、または遮断する方法であって、細胞を、本明細書に記載される構築物または本明細書に記載される組成物と接触させる段階を含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００３６】

宿主細胞培養物から本明細書に記載される構築物を得る方法であって、（ａ）構築物をコードする１つ以上の核酸配列を含む少なくとも１つの宿主細胞を含む宿主細胞培養物を得る段階と、（ｂ）宿主細胞培養物から構築物を回収する段階と、を含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００３７】

本明細書に記載される構築物を得る方法であって、（ａ）Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２を得る段階と、（ｂ）Ｈ１を、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合させ、Ｈ２を、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合させる段階と、（ｃ）構築物を得る段階と、を含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００３８】

本明細書に記載される構築物を調製する方法であって、少なくとも１つの構築物をコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを得る段階と、少なくとも１つの宿主細胞への導入のために、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの各々の最適比を決定する段階であり、この最適比は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２の発現時に形成された誤対合されたＨ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ１のヘテロ二量体対と比較して、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２の発現時に形成されたＨ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２のヘテロ二量体対の量を評価することにより決定される、段階と、好ましい最適比を選択する段階であり、好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも１つの宿主細胞へのトランスフェクションが構築物の発現をもたらす、段階と、最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを少なくとも１つの宿主細胞にトランスフェクトする段階と、構築物を発現させために、少なくとも１つの宿主細胞を培養する段階とを含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００３９】

いくつかの態様において、最適比の選択は、一過性トランスフェクション系におけるトランスフェクションにより評価される。いくつかの態様において、好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも１つの宿主細胞へのトランスフェクションは、構築物の最適な発現をもたらす。いくつかの態様において、本構築物は、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する。いくつか

の態様において、Ｆｃは、任意で１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である。

【００４０】

コンピュータ可読記憶媒体であって、第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体ならびに第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットであり、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異のデータセットが表または実施例に列挙されるこれらの突然変異またはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、データセットと、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合するであろう可能性、および／またはＨ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するであろう可能性を決定するためのコンピュータ実行コードと、を保存する、コンピュータ可読記憶媒体もまた、本明細書に記載される。

【００４１】

優先的対合を決定するためのコンピュータ実装方法であって、第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体ならびに第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットを得る段階であり、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異のデータセットが、表または実施例に列挙されるこれらの突然変異またはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、段階と、コンピュータプロセッサにより、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合するであろう可能性、および／またはＨ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するであろう可能性を決定する段階と、を含む方法もまた、本明細書に記載される。いくつかの態様において、本方法は、本明細書に記載される構築物を生成することをさらに含む。

【００４２】

二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を生成する方法であって、当該二重特異性構築物は、第１の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）および第１の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体、ならびに第２の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）および第２の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体を含み、Ｈ１およびＨ２がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ１およびＬ２がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、本方法は、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、および／またはＬ２への修飾のサブセットの導入時に、試験系において、Ｈ１が、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合し、Ｈ２が、Ｌ１と比較してＬ２と優先的に対合するように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２内のアミノ酸修飾のセットを表すデータを含む、データセットを得る段階と、データセットからの１つ以上の修飾のサブセットを第１のヘテロ二量体および／または第２のヘテロ二量体に導入する段階と、二重特異性構築物を含む発現産物を生成するために、少なくとも１つの宿主細胞において第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を同時発現する段階と、を含む方法もまた、本明細書に記載される。

【００４３】

いくつかの態様において、本方法は、他のポリペプチド産物と比較して、発現産物における二重特異性構築物の量を決定する段階をさらに含む。いくつかの態様において、二重

特異性構築物は、他のポリペプチド産物と比較して、７０％超の純度で生成される。いくつかの態様において、データセットは、本明細書に記載されるデータセットである。いくつかの態様において、本方法は、他のポリペプチド産物と比較して、二重特異性構築物の純度を増加させるために、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、またはＬ２のうちの少なくとも１つに、さらなるアミノ酸修飾を加える段階をさらに含む。いくつかの態様において、本構築物は、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、任意で１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である。いくつかの態様において、抗原結合ポリペプチドは、抗体、Ｆａｂ、またはｓｃＦｖである。

【図面の簡単な説明】

【００４４】

【図１】アミノ酸修飾がV_HまたはV_Lドメインに作成されるＬＣＣＡ設計セットにおいて、本明細書に記載される抗原結合構築物の、ヘテロ二量体の優先的対合を示す表を提供する。

【図２】アミノ酸修飾がC_{H1}またはC_Lドメインに作成されるＬＣＣＡ設計セットにおいて、ヘテロ二量体の優先的対合を示す表を提供する。

【図３】本明細書に記載される抗原結合構築物から選択された、優先的に対合または誤対合されたヘテロ二量体についての熱安定性および親和性を示す表を提供する。

【図４】選択されたヘテロ二量体についての熱変性曲線を提供する。

【図５】選択されたヘテロ二量体についてのサイズ排除クロマトグラフィーのプロファイルを提供する。

【図６Ａ】図６は、可変、定常、およびＪ領域セグメントについて、標準的なヒト生殖細胞系配列に対してアラインされたＤ３Ｈ４４重鎖および軽鎖アミノ酸配列を示す。（図における注釈：＊配列同一性、＃接続部分のホットスポット（特異性をもたらす部分）、＋設計において試験された突然変異の残基）。図６Ａは、ヒトＶＨ生殖細胞系サブグループを示す（ある代表的な配列がそれぞれのファミリーについて表示される）。ＶＨ３およびＩＧＨＪ３＊０２に対するＤ３Ｈ４４のアラインメントに基づいた配列同一性。

【図６Ｂ】ヒトカッパＶＬ生殖細胞系サブグループを示す（ある代表的な配列がそれぞれのファミリーについて表示される）。ＶＫＩおよびＩＧＫＪ１＊０１に対するＤ３Ｈ４４のアラインメントに基づいた配列同一性。

【図６Ｃ】ヒトラムダＶＬ生殖細胞系サブグループを示す（ある代表的な配列がそれぞれのファミリーについて表示される）。ＶＬ１およびＩＧＬＪ１＊０１に対するＤ３Ｈ４４のアラインメントに基づいた配列同一性。

【図６Ｄ】ヒトＣＨ１対立遺伝子配列を示す。

【図６Ｅ】ヒトカッパおよびラムダ対立遺伝子配列を示す。

【図７】二重特異性抗体を設計するための戦略を概説するフローチャートを示す。

【図８】二重特異性Ｍａｂ（モノクローナル抗体）を形成するための遺伝子操作の必要条件、および重鎖軽鎖対を定量化するために必要とされるアッセイ必要条件の高レベルの図式的概観を示す。高い純度（すなわち、誤対合されたＨ－Ｌの会合がほとんどないか、または全くない）を有する二重特異性Ｍａｂを遺伝子操作する設定目標は、それらの固有の同種の軽鎖に対する２つの固有の重鎖の優先的対合を合理的に遺伝子操作することにより（特異的なアミノ酸突然変異の導入により）達成され得る。このプロセスを図式的に示し、ここで、Ｈ１は、Ｌ２ではなくＬ１と優先的に対合するように遺伝子操作されている。同様に、Ｈ２は、Ｌ１ではなくＬ２と優先的に対合するように遺伝子操作されている。二重特異性Ｍａｂの設計の実験的スクリーニングは、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１を同時に定量化することができるアッセイを必要とする。これらのアッセイ必要条件は、各二重特異性Ｆａｂアームを独立して遺伝子操作することができると仮定することにより簡易化され得る。この場合、アッセイは、唯一、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２またはＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１を定量化すること必要とするが、同時に両方を定量化すること必要としない。

【図９】いかに重鎖および軽鎖がタグ付けされ、優先的対合が決定されるかを示す概略図を提供する。この概略図において、丸は、３つの構築物がトランスフェクトされる細胞を表す。発現産物は細胞から分泌され、上清（ＳＰＮＴ）を、検出装置、この場合ＳＰＲチップ上に流す。重鎖との対合に関して競合する２つの軽鎖に融合される２つの異なるタグの検出レベルに基づいて、重鎖の、２つの軽鎖への優先的対合の定量的推計が推計され得る。

【図１０】２つの完全長重鎖の各々が、独立して２つの異なる軽鎖と同時発現されるときに予測された重鎖関連物を示す。優先的対合は、ＭＣＡを用いて評価される。

【図１１】Ｈ１がＬ２を上回ってＬ１と優先的に対合し、Ｈ２がＬ１を上回ってＬ２と優先的に対合するように設計されている、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、Ｌ２鎖の例示的なセットを示す。可変領域の重鎖と軽鎖の接続部分の３Ｄ結晶構造の画像表示を示す。接続部分に導入された突然変異は、優先的に形成する絶対的な対に関して、可変領域接続部分の２つのセットにおいてそれぞれ、静電気的および立体的相補性を達成する。一方で、不適切な対においては好ましくない立体的および静電気的ミスマッチがあり、これはミスマッチ対における対合傾向の低下、ならびに安定性の低下をもたらし得る。

【図１２】図１１に示されるＨ１、Ｌ１、Ｈ２、Ｌ２の鎖の例示的なセットに基づいて、Ｈ１、Ｌ１、およびＬ２が同時発現されるとき（左パネル）に、ならびにＨ２、Ｌ１、およびＬ２が同時発現されるとき（右パネル）に生じるＬＣ／ＭＳスペクトルを示す。

【図１３】図１１に示される設計に基づいて、Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２の対の生物物理学的特性の評価を示す。図１３Ａは、プロテインＡでの精製の前およびその後のＨ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２の対の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示し、産物の収量はゲルの下部に示した。図１３Ｂは、Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２の対合した産物のＤＳＣサーモグラムを示し、図１３Ｃは、Ｈ２－Ｌ２対についてのＵＰＬＣ－ＳＥＣ（Ｈ２－Ｌ２）のプロファイルを示す。

【図１４】細胞において、２つの異なる軽鎖が２つの異なる重鎖と同時発現されるときに期待される、重鎖関連の産物を示す。優先的対合は、ＳＭＣＡ（モノクローナル抗体競合アッセイ）を用いて評価される。

【図１５】図１１に示される設計に基づいた二重特異性抗原結合構築物（Ｈ１－Ｌ１＿Ｈ２－Ｌ２）についてのＬＣ／ＭＳスペクトルを示す。

【図１６】図１６Ａ、左パネルは、図１１に示される設計セットに由来する二重特異性抗原結合構築物の純度の評価を示す。図は、ヘテロ二量体Ｆｃを有するＨｅｒ２結合Ｍａｂからなる対照変異体とともに、ＳＭＣＡ変異体の、クマシー染色した非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。プロテインＡ（ＰｒｏｔＡ）での精製後のＳＭＣＡ変異体の純度は高く、対照と定性的に同等である。ＳＭＣＡ変異体の推定されたＰｒｏｔＡ後の収量は、２０ｍｇ／Ｌであり、４０ｍｇ／ｍｌの対照収量に匹敵する。右パネル（図１６Ｂ）は、前述の二重特異性構築物のＳＥＣプロファイルを示す。観察された主なピーク（＞９０％のピーク領域全体）は、約１５０ＫＤａの分子量で流出し、Ｍａｂモノマーからなる。観察された微小ピークは、約７５ＫＤａで流出し、これは半抗体からなる。著しく高い分子量のピーク（凝集体種を示す可能性がある）は観察されない。

【図１７】図１７Ａは、図１１に示される設計セットに基づいた二重特異性構築物によるＴＦまたはＨｅｒ２抗原に対する単一特異性結合を示すＳＰＲデータを示す（注記：このＳＭＣＡ設計は、図１１に示されるものと同じＨ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２のＭＣＡ設計を使用する）。図１７Ｂは、二重特異性抗原結合構築物によるＴＦおよびＨｅｒ２抗原の同時に起こる二重特異性結合を示すＳＰＲデータを示す。

【図１８】重要な接続部分の残基の特定に関する、かつ優先的な重鎖－軽鎖の対合を有する設計のコンピュータによるモデリングに関するフローチャートを示す。

【図１９】本発明で提供される、絶対的突然変異対のライブラリーを用いた、二重特異性抗体を調製する方法を示す概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４５】

詳細な説明

第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含み得る抗原結合ポリペプチド構築物（ヘテロ二量体対とも称される）であって、各ヘテロ二量体が免疫グロブリン重鎖またはその断片および免疫グロブリン軽鎖を含む構築物が本明細書に提供される。ヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、免疫グロブリン重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１）中に１つ以上のアミノ酸修飾および免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）中に１つ以上のアミノ酸修飾、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨ）中に１つ以上のアミノ酸修飾および免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）中に１つ以上のアミノ酸修飾、または重鎖および軽鎖の定常および可変ドメインの両方に前述のアミノ酸修飾の組み合わせを含み得る。修飾されるアミノ酸は、典型的には、軽鎖と重鎖の間の接続部分の一部であり、第１のヘテロ二量体の重鎖が、軽鎖のうちの一方と、他方よりも優先的に対合するように、各重鎖と所望の軽鎖の間に優先的対合を形成するように修飾される。同様に、第２のヘテロ二量体の重鎖は、第１の軽鎖ではなく、第２の軽鎖と優先的に対合し得る。

【００４６】

上述のように、本明細書に記載されるアミノ酸修飾の特定の組み合わせは、重鎖の、特定の軽鎖との優先的対合を促進し、そのため、二重特異性モノクローナル抗体（Ｍａｂ）発現がごくわずかなまたは制限された誤対合で生じることを可能にし、望ましくないまたは誤対合された産物から所望のヘテロ二量体を精製する必要性を最小限に抑える。ヘテロ二量体は、アミノ酸修飾を含まないヘテロ二量体に匹敵する熱安定性を示し得、アミノ酸修飾を含まないヘテロ二量体に匹敵する抗原に対する結合親和性も示し得る。

【００４７】

第１および第２のヘテロ二量体の設計は、２つの異なる治療標的を標的とするか、または同じ抗原内で２つの異なるエピトープ（重複または非重複）を標的とする二重特異性抗体を形成するために使用することができる。

【００４８】

本発明は、本発明によるヘテロ二量体対を調製する方法をさらに提供する。

【００４９】

定義

特に定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、特許請求の範囲に記載の対象が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同様の意味を有する。本明細書の用語について複数の定義が存在する場合には、本項の定義が優先される。ＵＲＬまたは他のそのような識別名またはアドレスで引用がなされている場合には、そのような識別子は変化し得て、インターネット上の特定の情報は変更され得るが、同様の情報がインターネットの検索により見出され得ることが理解される。それに加えて、参考文献は、そのような情報の利用可能性および公的な普及を証明する。

【００５０】

前述の一般的な説明および以下の発明を実施するための形態は、単に例示および説明であって、いかなる特許請求の範囲に記載の対象も制限するものではないことを理解されたい。本明細書では、単数形の使用は、特に具体的に明記しない限り、複数形を含む。

【００５１】

本発明の説明において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、特に示されない限り、列挙される範囲内の任意の整数の値と、適当な場合には、その分数（例えば、整数の１／１０および１／１００等）とを含むと理解される。本明細書で使用される「約」は、特に示されない限り、示された範囲、値、配列、または構造の±１０％を意味する。本明細書で使用される「１つ(ａ)」および「１つ(ａｎ)」という用語は、特に示されない限りまたはその文脈で指示されない限り、列挙された構成要素の「１つ以上」を指すことが理解されるべきである。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢の１つ、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味する、と理解されるべきである。本明細書で使用される「含む」および「備える」という用語は、同義に使用される。加えて、本明細書に記載される構造および置換分の様々な組み合わせに由

来する個々の一本鎖ポリペプチドまたは免疫グロブリン構築物は、本出願により、各一本鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体が個別に説明されたかのように同じ程度まで開示される。それ故に、個々の一本鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体を形成するための特定の構成要素の選択は、本発明の範囲内にある。

【００５２】

本明細書で使用される項の表題は、構成上の目的にすぎず、記載される主題を限定するものと解釈すべきではない。特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含むが、これらに限定されない、本明細書で引用されるすべての文書、または文書の一部は、いかなる目的に対しても、参照によりその全体が明確に本明細書に組み込まれる。

【００５３】

本明細書に記載される方法および組成物は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、細胞株、構築物、および試薬に限定されず、したがって、変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明に記載される方法および組成物の範囲を限定するとは意図されず、それは添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることもまた理解されるべきである。

【００５４】

本明細書で言及されるすべての刊行物および特許は、例えば、刊行物に記載される構築物および方法論といった、説明および開示の目的において参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、これらは、本明細書に記載される方法、組成物、および化合物に関連して使用され得る。本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前のその開示のために単に提供される。本明細書におけるいかなるものも、本明細書に記載される発明者らが、先行の発明または任意の他の理由により、そのような開示に先行する権限がないことの承認であるとは解釈されるべきではない。

【００５５】

本出願において、アミノ酸名および原子名（例えば、Ｎ、Ｏ、Ｃ等）は、ＩＵＰＡＣ命名法（ＩＵＰＡＣ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ ａｎｄ Ｓｙｍｂｏｌｉｓｍ ｆｏｒ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ（ｒｅｓｉｄｕｅ ｎａｍｅｓ，ａｔｏｍ ｎａｍｅｓ ｅｔｃ．）、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１３８，９－３７（１９８４）とともに、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１５２，１（１９８５）の修正版に基づいてタンパク質データバンク（ＰＤＢ）（ｗｗｗ．ｐｄｂ．ｏｒｇ）により定義される通りに使用される。「アミノ酸残基」という用語は、主に、２０個の天然に存在するアミノ酸、すなわち、アラニン（ＡｌａまたはＡ）、システイン（ＣｙｓまたはＣ）、アスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）、グルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）、フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）、グリシン（ＧｌｙまたはＧ）、ヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）、イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）、リジン（ＬｙｓまたはＫ）、ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）、メチオニン（ＭｅｔまたはＭ）、アスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）、プロリン（ＰｒｏまたはＰ）、グルタミン（ＧｌｎまたはＱ）、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）、セリン（ＳｅｒまたはＳ）、トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）、バリン（ＶａｌまたはＶ）、トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）、およびチロシン（ＴｙｒまたはＹ）残基からなる群に含まれるアミノ酸残基を示すと解釈される。

【００５６】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために、本明細書において交換可能に使用される。つまり、ポリペプチドに対する記述は、ペプチドの記載およびタンパク質の記載に等しく適用され、その逆もまた同様である。これらの用語は、天然に生じるアミノ酸ポリマーだけでなく、１個以上のアミノ酸残基が天然にコードされていないアミノ酸であるアミノ酸ポリマーにも適用される。本明細書で使用される場合、これらの用語は、アミノ酸残基がペプチド共有結合によって連結されている、完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖（全長のタンパク質が挙げられる）を包含する。

【００５７】
「ヌクレオチド配列」または「核酸配列」という用語は、２つ以上のヌクレオチド分子の連続した伸長を示すことが意図される。ヌクレオチド配列は、ゲノム、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、半合成、合成起源、またはそれらのいずれかの組み合わせのものであり得る。
【００５８】
「細胞」、「宿主細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」は、本明細書において交換可能に使用され、このようなすべての用語には、細胞の増殖および培養に起因する子孫が含まれることを理解するべきである。「形質転換」および「トランスフェクション」は、細胞に核酸配列を導入する工程を指すように交換的に使用される。
【００５９】
「アミノ酸」という用語は、天然に生じるアミノ酸、および天然に生じないアミノ酸、ならびに、天然に生じるアミノ酸と同様の方法で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を指す。天然にコードされたアミノ酸は、２０個の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）、ならびにピロリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体は、天然に生じるアミノ酸と同じ基本的な化学構造を有する化合物、すなわち、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム等の炭素が水素、カルボキシル基、アミノ基、およびＲ基と結合している化合物を指す。このような類似体は、修飾されたＲ基を有しているか（ノルロイシン等）、または修飾されたペプチドの骨格を有しているが、天然に生じるアミノ酸と同じ基本的な化学構造を保持している。アミノ酸についての参照は、例えば、天然に生じるタンパク新生Ｌ-アミノ酸；Ｄ-アミノ酸、化学的に修飾されたアミノ酸（アミノ酸の変異体および誘導体等）；アラニン、オルニチン等の天然に生じる非タンパク新生アミノ酸；およびアミノ酸の特徴であると当該技術分野で知られている性質を有する化学的に合成された化合物を含む。天然に生じないアミノ酸の例としては、□－メチルアミノ酸（例えばメチルアラニン）、Ｄ-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、２-アミノ-ヒスチジン、ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン）、余分なメチレンを側鎖に有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、ならびに側鎖におけるカルボン酸の官能基がスルホン酸基と置換されたアミノ酸（例えばシステイン酸）が挙げられるが、これらに限定されない。合成の、ネイティブでないアミノ酸、置換されたアミノ酸、または１個以上のＤ-アミノ酸を含む、非天然アミノ酸を本発明のタンパク質に組み込むことは、多くの異なる方法において有利であり得る。Ｄ-アミノ酸を含有するペプチド等は、Ｌ-アミノ酸を含有する対応物と比較して、インビトロまたはインビボにおける増加した安定性を示す。したがって、Ｄ-アミノ酸を組み込むというペプチドの構築等は、細胞内でのより高い安定性が望まれるか、必要とされる場合、特に有用であり得る。より具体的には、このような性質が望ましいときに、Ｄ-ペプチド等は、内因性のペプチダーゼおよびプロテアーゼに対して耐性を示し、それにより分子のバイオアベイラビリティを改善し、インビボにおける寿命を延長する。さらに、Ｄ-ペプチド等は、Ｔヘルパー細胞への、主要組織適合遺伝子複合体のクラスＩＩ拘束性の提示のために、効率良く処理されることができず、それ故に、全生物において体液性免疫反応を誘導する可能性が低い。
【００６０】
アミノ酸は、ＩＵＰＡＣ-ＩＵＢ生物化学命名委員会（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ）が推薦する一般的に知られている３文字表記または１文字表記のいずれかにより、本明細書では称される。同様に、ヌクレオチドは、一般的に受け入れられている１文字コードにより称され得る。
【００６１】
「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、「保存的に修飾された変異体」は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸か、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は本質的に

同一の配列を指す。遺伝コードの縮重のため、多くの機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードしている。例えば、ＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、およびＧＣＵのコドンはすべて、アミノ酸アラニンをコードしている。それ故に、コドンによりアラニンが特定されるすべての位置では、コードされるポリペプチドを変化させることなく、記載された対応するコドンの何れかへコドンを変化させることができる。このような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に修飾された変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書のすべての核酸配列はまた、この核酸のすべての可能性のあるサイレント変異を表している。当業者は、機能的に同一の分子が得られるように、核酸における各コドンが修飾され得ることを理解するだろう（メチオニンに対する通常唯一のコドンであるＡＵＧ、およびトリプトファンに対する通常唯一のコドンであるＴＧＧは除く）。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列に潜在的に含まれる。

【００６２】

アミノ酸配列に関しては、コードされた配列中の単一のアミノ酸または数％のアミノ酸を変更、付加、または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の配列に対する個々の置換、欠失、または付加は、そのような変更によってアミノ酸の欠乏、アミノ酸の付加、または化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす「保存的に修飾された変異体」であることを当業者は理解するだろう。機能的に同一のアミノ酸を提供する保存的な置換表は当業者に既知である。このような保存的に修飾された変異体は、本発明の、多型の変異体、種間のホモログ（ｉｎｔｅｒｓｐｅｃｉｅｓ　ｈｏｍｏｌｏｇｓ）および対立遺伝子に加えられるものであり、それらを排除するものではない。

【００６３】

機能的に同一のアミノ酸を提供する保存的な置換表は当業者に既知である。以下の８群のそれぞれは、互いに保存的な置換となるアミノ酸を含んでいる：

１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；
２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；
３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；
４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；
５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；
６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；
７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；および
８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）

（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ Ｈ Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．；２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　１９９３）を参照のこと。

【００６４】

２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、「同一の」またはパーセント「同一性」という用語は、２つ以上の配列またはサブ配列が同じであることを指す。配列を比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大限に対応するように対比および整列させ、以下の配列比較アルゴリズム（または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの１つを使用して測定されるか、または手動で整列させて目視によって検査して測定した場合に、アミノ酸残基またはヌクレオチドの割合が同じである場合、配列は「実質的に同一」である（すなわち、指定の領域にわたって約５０％の同一性、約５５％の同一性、６０％の同一性、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％または約９９％の同一性）。この定義はまた、試験配列の相補体にも言及する。同一性は、少なくとも約５０アミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって、あるいは７５～１００アミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって、あるいは、特定されない場合は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列全体にわたって存在し得る。本発明のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識されたプローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングする段階と、こ

のポリヌクレオチド配列を含有する全長のｃＤＮＡおよびゲノムクローンを単離する段階と、を含むプロセスにより、ヒト以外の種からのホモログを含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得ることができる。このようなハイブリダイゼーション技術は、当業者によく知られている。

【００６５】

ポリペプチドの誘導体または変異体は、誘導体または変異体のアミノ酸配列が、元のペプチドからの１００アミノ酸配列を用いて少なくとも５０％の同一性を有する場合、ペプチドと「相同性」を共有するか、または「相同である」と言われる。ある実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも７５％同一である。ある実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも８５％同一である。ある実施形態において、誘導体のアミノ酸配列は、誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９０％同一である。いくつかの実施形態において、誘導体のアミノ酸配列は、誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９５％同一である。ある実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９９％同一である。

【００６６】

本明細書で使用される「単離された」ポリペプチドまたは構築物は、その天然細胞培養環境の成分から特定および分離および／または回収された構築物またはポリペプチドを意味する。その天然環境の汚染成分とは、典型的には、ヘテロマルチマーの診断および治療への使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様溶質が含まれ得る。

【００６７】

ある実施形態において、本明細書で使用される、本明細書に記載される「単離された」抗原結合構築物は、ヘテロ二量体対または「単離された」ヘテロ二量体対を含み、その天然細胞培養環境の成分から特定および分離および／または回収されたヘテロ二量体またはヘテロ二量体対を含む。その天然環境の汚染成分とは、ヘテロ二量体または抗原結合構築物の診断および治療への使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様溶質が含まれ得る。

【００６８】

ヘテロ二量体および抗原結合構築物およびヘテロ二量体対は、概して、実質的に均質になるまで精製される。「実質的に均質な」、「実質的に均質な形態」、および「実質的均質性」という語句は、産物が望ましくないポリペプチドの組み合わせ（例えば、ホモ二量体）に由来する副産物を実質的に欠いていることを示すために使用される。純度によって表される場合に、実質的均質性は、副産物の量が重量パーセンテージで１０％を超えず、好ましくは５％未満であり、さらに好ましくは１％未満であり、最も好ましくは０．５％未満であることを意味する。

【００６９】

「～に選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」という語句は、特定のヌクレオチド配列が複合混合物（全細胞、ライブラリーＤＮＡ、またはＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない）に存在するときに、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、その配列に対してのみ分子が結合すること、二重鎖を形成すること、またはハイブリダイズすることを指す。

【００７０】

抗体技術の当業者により理解される用語にはそれぞれ、特に本明細書に明確に異なって規定されない限り、当該技術分野で得られる意味が与えられる。抗体は、可変領域、ヒンジ領域、および定常ドメインを有することが知られている。免疫グロブリン構造および機能は、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ，Ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｈａｐｔｅｒ １４（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈ

ａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８８）において概説されている。

【００７１】

本明細書で使用される「抗体」および「免疫グロブリン」または「抗原結合ポリペプチド」は、交換可能に使用される。「抗原結合ポリペプチド」は、分析物（抗原）と特異的に結合する、免疫グロブリン遺伝子（複数を含む）、または１つ以上のその断片により実質的にコードされるポリペプチドを指す。認識された免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、エプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロンとして分類され、順に、それぞれ、免疫グロブリンアイソタイプ、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥを規定する。さらに、抗体は、多くのサブクラスのうちの１つに属し得、例えば、ＩｇＧは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のサブクラスに属し得る。

【００７２】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、２対のポリペプチド鎖からなり、各対は、１つの「軽」鎖（約２５ｋＤ）および１つの「重」鎖（約５０～７０ｋＤ）を有する。「軽鎖」という用語には、完全長の軽鎖および結合特異性を与えるために十分な可変領域配列を有するその断片が含まれる。完全長の軽鎖は、可変領域ドメイン、ＶＬ、および定常領域ドメイン、ＣＬを含む。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。軽鎖は、カッパ鎖およびラムダ鎖を含む。「重鎖」という用語には、完全長の重鎖および結合特異性を与えるために十分な可変領域配列を有するその断片が含まれる。完全長の重鎖には、可変領域ドメインＶＨ、ならびに３つの定常領域ドメインＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３が含まれる。ＶＨドメインはポリペプチドのアミノ末端にあり、ＣＨドメインはカルボキシル末端にあり、ＣＨ３がポリペプチドのカルボキシ末端に最も近い。重鎖は、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４サブタイプが含まれる）、ＩｇＡ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２サブタイプが含まれる）、ＩｇＭ、ならびにＩｇＥを含む、任意のアイソタイプであり得る。「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、概して、抗原認識に関与する抗体の軽鎖および／または重鎖の一部を指し、典型的には、重鎖（ＶＨ）において約１２０～１３０のアミノ末端アミノ酸および軽鎖（ＶＬ）において約１００～１１０のアミノ末端アミノ酸を含む。「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」は、抗原結合特異性および親和性に寄与するアミノ酸配列である。「フレームワーク」領域（ＦＲ）は、ＣＤＲの適切な立体配座を維持して、抗原結合領域と抗原との間の結合を促進するのに役立っている。構造的には、フレームワーク領域は、抗体中、ＣＤＲの間に位置し得る。可変領域は、典型的には、３つの超可変領域ＣＤＲにより連結されている比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）、という同じ一般構造を示す。各対の２つの鎖のＣＤＲは、典型的には、フレームワーク領域により整列され、特異的エピトープと結合することが可能になる。Ｎ末端からＣ末端まで、軽鎖および重鎖の可変領域の両方は、典型的には、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、およびＦＲ４を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割当ては、特に指定のない限り、典型的には、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７および１９９１））の定義に従っている。ある実施形態において、免疫グロブリン構築物は、治療ポリペプチドに接続したＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、またはＩｇＥからの少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される免疫グロブリン構築物中に含まれる免疫グロブリンドメインは、ダイアボディまたはナノボディ等の免疫グロブリン系構築物に由来する。ある実施形態において、本明細書に記載される免疫グロブリン構築物は、ラクダ抗体等の重鎖抗体からの少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。ある実施形態において、本明細書に提供される免疫グロブリン構築物は、ウシ抗

体、ヒト抗体、ラクダ抗体、マウス抗体、または任意のキメラ抗体等の哺乳動物抗体由来の少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。

【００７３】

「二重特異性」、「デュアル特異性」、または「二機能性」抗原結合タンパク質または抗体は、２つの異なる抗原結合部位を有するハイブリッド抗原結合タンパク質または抗体である。二重特異性抗原結合タンパク質および抗体は、多重特異性抗原結合タンパク質抗体の一種である。二重特異性抗体結合タンパク質または抗体の２つの結合部位は、同じまたは異なる分子標的上に存在し得る２つの異なるエピトープと結合する。「多重特異性抗原結合タンパク質」または「多重特異性抗体」は、１つを超える抗原またはエピトープを標的とするものである。「二価抗原結合タンパク質」または「二価抗体」は、２つの抗原結合部位を含む。場合によっては、２つの結合部位は、同じ抗原特異性を有する。二価抗原結合タンパク質および二価抗体は、二重特異性であり得る。以下を参照のこと。「多重特異性」または「多重機能性」抗体以外の二価抗体は、ある特定の実施形態において、典型的には、その結合部位のそれぞれが同一であることが理解される。

【００７４】

「優先的対合」という用語は、第１のポリペプチドと第２のポリペプチド、例えば、本明細書に記載される抗原結合構築物およびヘテロ二量体対における免疫グロブリン重鎖と免疫グロブリン軽鎖の対合パターンを説明するために本明細書で使用される。したがって、「優先的対合」とは、第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとの間に対合が生じる時に、１つ以上のさらなる異なるポリペプチドが存在していても、第１のポリペプチドの、第２のポリペプチドとの好ましい対合を指す。典型的には、優先的対合は、第１および第２のポリペプチドのうちの１つまたはその両方の修飾（例えば、アミノ酸修飾）の結果として生じる。典型的には、優先的対合は、対合が生じた後に存在する最も豊富な二量体である、対合した第１および第２のポリペプチドをもたらす。免疫グロブリン重鎖（Ｈ１）は、２つの異なる免疫グロブリン軽鎖（Ｌ１およびＬ２）と同時発現させる場合、両方の軽鎖と等しく統計的に対合し、およそ５０：５０の、Ｌ１と対合したＨ１およびＬ２と対合したＨ１の混合物をもたらすことが当該技術分野で知られている。この文脈において、例えば、Ｈ１をＬ１およびＬ２の両方と同時発現させる場合に、Ｈ１－Ｌ１重鎖－軽鎖ヘテロ二量体の量がＨ１－Ｌ２ヘテロ二量体の量よりも多かった場合、「優先的対合」がＨ１とＬ１との間で起こっていると考えられる。それ故に、この場合は、Ｈ１は、Ｌ２と比較してＬ１と優先的に対合している。

【００７５】

抗体重鎖は抗体軽鎖と対合し、互いに「接続部分」で相接するかまたは接触する。「接続部分」は、第１のポリペプチドにおける１つ以上の「接触」アミノ酸残基を含み、第２のポリペプチドの１つ以上の「接触」アミノ酸残基と相互作用する。ある文脈において、接続部分という用語は、Ｆｃが、ＩｇＧ１、最も好ましくはヒトＩｇＧ１抗体等のＩｇＧ抗体に好ましくは由来する、Ｆｃの二量体化したＣＨ３ドメインの接続部分を説明するために使用され得る。

【００７６】

抗体軽鎖と会合する抗体重鎖は、典型的には、「接続部分」で互いに相接するかまたは接触する。免疫グロブリン軽鎖は、「接続部分」を介して免疫グロブリン重鎖と操作可能に会合する。「接続部分」は、免疫グロブリン重鎖におけるこれらの１つ以上の「接触」アミノ酸残基を含み、免疫グロブリン軽鎖の接続部分における１つ以上の「接触」アミノ酸残基と相互作用する。本明細書で使用される接続部分は、免疫グロブリン重鎖のＶＨおよびＣＨ１ドメインならびに免疫グロブリン軽鎖のＶＬおよびＣＬドメインを含むことができる。「接続部分」は、ＩｇＧ抗体、最も好ましくはヒトＩｇＧ１抗体由来であり得る。

【００７７】

本明細書で使用される「アミノ酸修飾」という用語には、アミノ酸突然変異、挿入、欠失、置換、化学的修飾、物理的修飾、および再配置が含まれるが、これらに限定されない

。

【００７８】

抗原結合構築物およびヘテロ二量体対

本明細書に記載される抗原結合構築物は、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含むことができ、各ヘテロ二量体は、免疫グロブリン重鎖を免疫グロブリン軽鎖と対合することにより得られる。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常および可変ドメインの構造および組織は、当該技術分野でよく知られている。免疫グロブリン重鎖は、典型的には、１つの可変（ＶＨ）ドメイン、ならびに３つの定常ドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３を含む。免疫グロブリン軽鎖は、典型的には、１つの可変（ＶＬ）ドメインおよび１つの定常（ＣＬ）ドメインを含む。これらの典型的な形式への様々な修飾が行われ得る。

【００７９】

本明細書に記載される抗原結合構築物およびヘテロ二量体対は、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含むことができ、各ヘテロ二量体は、少なくとも、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを有する免疫グロブリン／抗体重鎖またはその断片、ならびにＶＬドメインおよびＣＬドメインを有する免疫グロブリン／抗体軽鎖を含む。一実施形態において、ヘテロ二量体対および抗原結合構築物のヘテロ二量体の両方は、完全長免疫グロブリン重鎖を含む。別の実施形態において、ヘテロ二量体対または抗原結合構築物のヘテロ二量体の両方は、少なくとも、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む免疫グロブリン重鎖の断片を含む。一実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体の両方は、少なくとも、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む免疫グロブリン重鎖のアミノ末端断片を含む。別の実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体の両方は、少なくとも、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む免疫グロブリン重鎖のカルボキシ末端断片を含む。

【００８０】

ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体は、抗原またはエピトープと特異的に結合することができる。一実施形態において、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖は、既知の治療抗体に由来するか、または遺伝子操作される。治療抗体は、疾患または障害に罹患しているかまたはかかりやすい哺乳動物における、疾患または障害を治療するのに有効であるものである。各ヘテロ二量体が由来し得る適切な治療抗体としては、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、アウログラブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ　オゾガミシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テプリズマブ、トシリズマブ／アトリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、Ｐｒｏｘｉｎｉｕｍ（商標）、Ｒｅｎｃａｒｅｘ（商標）、ウステキヌマブ、およびザルツムマブが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８１】

一実施形態において、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖は、以下の表のタンパク質、ならびに以下の表のタンパク質に属するサブユニット、ドメイン、モチーフ、およびエピトープ：レニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン等の成長ホルモン；増殖ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；アルファ－１抗トリプシン；インスリンＡ鎖；インスリンＢ鎖；プロインスリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩＣ因子、第ＩＸ因子、組織因子（ＴＦ）、およびｖｏｎ　Ｗｉｌｌｅｂｒａｎｄｓ因子等の凝固因子；プロテインＣ等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノーゲン活性化因子（ｔ－ＰＡ）等のプラスミノーゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血増殖因子；

腫瘍壊死因子－アルファおよびベータ；エンケファリナーゼ；ＲＡＮＴＥＳ（活性化に際して調節され、通常はＴ細胞により発現され、分泌される）；ヒトマクロファージ炎症タンパク質（ＭＩＰ－１－アルファ）；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；Ｍｕｅｌｌｅｒｉａｎ阻害物質；リラクシンＡ鎖；リラクシンＢ鎖；プロリラクシン；マウスゴナドトロピン結合ペプチド；ベーターラクタマーゼ等の微生物タンパク質；ＤＮａｓｅ；ＩｇＥ；ＣＴＬＡ－４等の細胞傷害性Ｔリンパ球結合抗原（ＣＴＬＡ）；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）；例えば、ＥＧＦＲ、ＶＥＧＦＲ等のホルモンもしくは増殖因子に対する受容体；アルファインターフェロン（アルファ－ＩＦＮ）、ベータインターフェロン（ベーター－ＩＦＮ）およびガンマインターフェロン（ガンマ－ＩＦＮ）等のインターフェロン；プロテインＡまたはＤ；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、ニューロトロフィン－３、４、５もしくは６（ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＮＴ－５、もしくはＮＴ－６）等の神経栄養因子、または神経成長因子；血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）；ＡＦＧＦおよびＰＦＧＦ等の線維芽細胞増殖因子；上皮増殖因子（ＥＧＦ）；ＴＧＦ－１、ＴＧＦ－２、ＴＧＦ－３、ＴＧＦ－４、もしくはＴＧＦ－５を含むＴＧＦアルファおよびＴＧＦベータ等のトランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ）；インスリン様増殖因子ＩおよびＩＩ（ＩＧＦ－ＩおよびＩＧＦ－ＩＩ）；ｄｅｓ（１－３）－ＩＧＦ－Ｉ（脳ＩＧＦ－Ｉ）、インスリン様増殖因子結合タンパク質；ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１４、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ５２、ＣＤ６３、ＣＤ６４、ＣＤ８０およびＣＤ１４７等のＣＤタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；抗毒素；骨形態形成因子（ＢＭＰ）；インターフェロンアルファ、ベータ、およびガンマ等のインターフェロン；Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＧ－ＣＳＦ等のコロニー刺激因子（ＣＳＦ）；インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１～ＩＬ－１３；ＴＮＦアルファ、スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊加速因子；例えば、ＡＩＤＳエンベロープの一部、例えば、ｇｐ１２０等のウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレッシン；調節タンパク質；ＬＦＡ－１、Ｍａｃ１、ｐ１５０．９５、ＶＬＡ－４、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－３、およびＶＣＡＭ、ａ４／ｐ７インテグリン、および（Ｘｖ／ｐ３インテグリンもしくはそのサブユニット、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ４９ｆ、アルファ７、アルファ８、アルファ９、アルファＤ、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ５１、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ４１、アルファＩＩｂ、アルファＩＥＬｂ等のインテグリンアルファサブユニット等の細胞接着分子；ＣＤ２９、ＣＤ１８、ＣＤ６１、ＣＤ１０４、ベータ５、ベータ６、ベータ７、およびベータ８等のインテグリンベータサブユニット；限定されるものではないが、アルファＶベータ３、アルファＶベータ５、およびアルファ４ベータ７が含まれるが、これらに限定されないインテグリンサブユニットの組み合わせ；アポトーシス経路のメンバー；ＩｇＥ；血液群抗原；ｆｌｋ２／ｆｌｔ３受容体；肥満（ＯＢ）受容体；ｍｐｌ受容体；ＣＴＬＡ－４；プロテインＣ；ＥｐｈＡ２、ＥｐｈＡ４、ＥｐｈＢ２等のＥｐｈ受容体；ＨＬＡ－ＤＲ等のヒト白血球抗原（ＨＬＡ）；補体受容体ＣＲ１、Ｃ１Ｒｑ等の補体タンパク質ならびにＣ３およびＣ５等の他の補体因子；ＧｐＩｂアルファ、ＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ、およびＣＤ２００等の糖タンパク質受容体；ならびに上記のポリペプチドのいずれかの断片が含まれるがこれらに限定されない分子と結合する抗体に由来するか、または遺伝子操作される。

【００８２】

一実施形態において、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、ＡＬＫ受容体（プレイオトロフィン受容体）、プレイオトロフィン、ＫＳ１／４汎－癌腫抗原；卵巣癌抗原（ＣＡ１２５）；前立腺酸ホスファターゼ；前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）；メラノーマ結合抗原ｐ９７；メラノーマ抗原ｇｐ７５；高分子量メラノーマ抗原（ＨＭＷ－ＭＡＡ）；前立腺特異的膜抗原；癌胎児抗原（ＣＥＡ）；多様型上皮ムチン抗原；ヒト乳脂肪球抗原；ＣＥＡ、ＴＡＧ－７２、ＣＯ１７－１Ａ、ＧＩＣＡ　１９－９、ＣＴＡ－１、およびＬＥＡ等の結腸直腸腫瘍結合抗原；Ｂｕｒｋｉｔｔリンパ腫抗原－３８．１３；ＣＤ

１９；ヒトＢリンパ球抗原－ＣＤ２０；ＣＤ３３；ガングリオシドＧＤ２、ガングリオシドＧＤ３、ガングリオシドＧＭ２、およびガングリオシドＧＭ３等のメラノーマ特異的抗原；腫瘍特異的移植方細胞表面抗原（ＴＳＴＡ）；Ｔ抗原、ＤＮＡ腫瘍ウイルス、およびＲＮＡ腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原等のウイルス誘導性腫瘍抗原；結腸のＣＥＡ等の癌胎児抗原－アルファ－フェトタンパク質、５１４癌胎児トロホブラスト糖タンパク質および膀胱腫瘍癌胎児抗原；ヒト肺癌抗原Ｌ６およびＬ２０等の分化抗原；線維肉腫の抗原；ヒト白血病Ｔ細胞抗原－Ｇｐ３７；新生糖タンパク質；スフィンゴ脂質；ＥＧＦＲ（上皮増殖因子受容体）等の乳癌抗原；ＮＹ－ＢＲ－１６；ＮＹ－ＢＲ－１６およびＨＥＲ２抗原（ｐ１８５ＨＥＲ２）；多様型上皮ムチン（ＰＥＭ）；悪性腫瘍ヒトリンパ球抗原－ＡＰＯ－１；胎児の赤血球に認められるＩ抗原等の分化抗原；成人の赤血球に認められる一次内胚葉Ｉ抗原；移植前の胚；胃腸腺癌に認められるＩ（Ｍａ）；乳房上皮に認められるＭ１８、Ｍ３９；骨髄細胞に認められるＳＳＥＡ－１；ＶＥＰ８；ＶＥＰ９；Ｍｙｌ；Ｖａ４－Ｄ５；結腸直腸癌に認められるＤ１５６－２２；ＴＲＡ－１－８５（血液群Ｈ）；精巣および卵巣癌に認められるＳＣＰ－１；結腸腺癌に認められるＣ１４；肺腺癌に認められるＦ３；胃癌に認められるＡＨ６；Ｙハプテン；胎児癌細胞に認められるＬｅｙ；ＴＬ５（血液群Ａ）；Ａ４３１細胞に認められるＥＧＦ受容体；膵臓癌に認められるＥ１シリーズ（血液群Ｂ）；胎児癌細胞に認められるＦＣ１０．２；胃腸腺癌抗原；腺癌に認められるＣＯ－５１４（血液群Ｌｅａ）；腺癌に認められるＮＳ－１０；ＣＯ－４３（血液群Ｌｅｂ）；Ａ４３１細胞のＥＧＦ受容体に認められるＧ４９；結腸腺癌に認められるＭＨ２（血液群ＡＬｅｂ／Ｌｅｙ）；結腸癌に認められる１９．９；胃癌ムチン；骨髄細胞に認められるＴ５Ａ７；メラノーマに認められるＲ２４；胎児癌細胞に認められる４．２、ＧＤ３、Ｄ１．１、ＯＦＡ－１、ＧＭ２、ＯＦＡ－２、ＧＤ２、およびＭ１：２２：２５：８ならびに４～８細胞段階の胚に認められるＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４；皮膚Ｔ細胞リンパ腫抗原；ＭＡＲＴ－１抗原；シアリルＴｎ（ＳＴｎ）抗原；結腸癌抗原ＮＹ－ＣＯ－４５；肺癌抗原ＮＹ－ＬＵ－１２変異体Ａ；腺癌抗原ＡＲＴ１；腫瘍随伴関連脳－精巣－癌抗原（癌神経抗原ＭＡ２；腫瘍随伴性神経抗原）；神経癌腹部抗原２（ＮＯＶＡ２）；肝細胞癌抗原遺伝子５２０；腫瘍関連抗原ＣＯ－０２９；腫瘍関連抗原ＭＡＧＥ－Ｃ１（癌／精巣抗原ＣＴ７）、ＭＡＧＥ－Ｂ１（ＭＡＧＥ－ＸＰ抗原）、ＭＡＧＥ－Ｂ２（ＤＡＭ６）、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－４ａ、ＭＡＧＥ－４ｂ、およびＭＡＧＥ－Ｘ２；癌－精巣抗原（ＮＹ－ＥＯＳ－１）ならびに上記のポリペプチドのいずれかの断片等が含まれるがこれらに限定されない癌抗原と特異的に結合する抗体に由来するか、または遺伝子操作される。

【００８３】

ヒト抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、およびＩｇＤを含むアイソタイプにグループ分けされ得る。一実施形態において、Ｆｃは、ＩｇＧアイソタイプに由来する。別の実施形態において、Ｆｃは、ＩｇＡアイソタイプに由来する。別の実施形態において、Ｆｃは、ＩｇＥアイソタイプに由来する。別の実施形態において、Ｆｃは、ＩｇＭアイソタイプに由来する。別の実施形態において、Ｆｃは、ＩｇＤアイソタイプに由来する。

【００８４】

ヒトＩｇＧ抗体はまた、サブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４にも分類され得る。それ故に、いくつかの実施形態において、Ｆｃは、抗体のＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のサブクラスに由来し得ることが企図される。

【００８５】

ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体は、エピトープまたは抗原と特異的に結合し得る。一実施形態において、ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体は、同じエピトープと結合する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対の第１のヘテロ二量体は、ある抗原上のエピトープと特異的に結合し、ヘテロ二量体対の第２のヘテロ二量体は、同じ抗原上の異なるエピトープと特異的に結合する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対の第１のヘテロ二量体は、第１の抗原上のエピトープと特異的に結合し、ヘテロ二量体対の第２のヘテロ二量体は、第１の抗原とは異なる第２の抗原上のエピトープと特異的に結合する。例えば、一実

施形態において、第１のヘテロ二量体は、組織因子と特異的に結合するが、第２のヘテロ二量体は、抗原Ｈｅｒ２（ＥｒｂＢ２）と特異的に結合する。別の実施形態において、第１のヘテロ二量体は、上述の分子または癌抗原と特異的に結合する。別の実施形態において、第２のヘテロ二量体は、上述の分子または癌抗原と特異的に結合する。さらに別の実施形態において、第１のヘテロ二量体は、抗原ＣＤ３と特異的に結合するが、第２のヘテロ二量体は、抗原ＣＤ１９と特異的に結合する。

【００８６】

上述のように、いくつかの実施形態において、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖は、既知の治療抗体、または様々な標的分子または癌抗原と結合する抗体に由来するか、または遺伝子操作され得る。多くのそのような分子のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、容易に入手可能である（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＪ３０８０８７．１（ヒト化抗ヒト組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４軽鎖可変領域およびＣＬドメイン）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＪ３０８０８６．１（ヒト化抗ヒト組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４重鎖可変領域およびＣＨ１ドメイン）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＨＣ３５９０２５．１（ペルツズマブＦａｂ軽鎖遺伝子モジュール）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＨＣ３５９０２４．１（ペルツズマブＦａｂ重鎖遺伝子モジュール）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＧＭ６８５４６５．１（抗体トラスツズマブ（＝Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）－野生型；軽鎖）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＧＭ６８５４６３．１（抗体トラスツズマブ（＝Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）－野生型；重鎖）；ＧｅｎＢａｎｋ：ＧＭ６８５４６６．１（抗体トラスツズマブ（＝Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）－ＧＣ－最適化軽鎖）；およびＧｅｎＢａｎｋ：ＧＭ６８５４６４．１（抗体トラスツズマブ（＝Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）－ＧＣ－最適化軽鎖重鎖を参照のこと。本明細書に記載されるＧｅｎＢａｎｋ番号の各々の配列は、２０１２年１１月２８日現在でＮＣＢＩウェブサイトから入手可能であり、各々は、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８７】

いくつかの態様において、単離された抗原結合構築物は、本明細書に開示される表またはアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列またはその断片と少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、単離された抗原結合構築物は、本明細書に開示される表またはアクセッション番号に記載されるヌクレオチド配列またはその断片と少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％同一であるポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を含む。

【００８８】

免疫グロブリン重鎖および軽鎖に対するアミノ酸修飾

ヘテロ二量体対のヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、第１のヘテロ二量体の重鎖が、軽鎖のうちの一方と、他方よりも優先的に対合するように、それらの免疫グロブリン重鎖および／または免疫グロブリン軽鎖に対して１つ以上のアミノ酸修飾を含むことができる。同様に、第２のヘテロ二量体の重鎖は、第１の軽鎖ではなく、第２の軽鎖と優先的に対合し得る。この１つの重鎖と２つの軽鎖のうちの１つとの優先的対合は、免疫グロブリン重鎖を両方の免疫グロブリン軽鎖と同時発現させる場合に、免疫グロブリン重鎖が、２つの免疫グロブリン軽鎖のうちの一方と、他方を上回って優先的に対合する、１つの免疫グロブリン重鎖および２つの免疫グロブリン軽鎖を含む設計セットに基づき得る。それ故に、ＬＣＣＡ設計セットは、１つの免疫グロブリン重鎖、第１の免疫グロブリン軽鎖、および第２の免疫グロブリン軽鎖を含み得る。

【００８９】

一実施形態において、１つ以上のアミノ酸修飾は、１つ以上のアミノ酸置換を含む。

【００９０】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットに示される優先的対合は、軽鎖と重鎖との間の接続部分の一部である１つ以上のアミノ酸を修飾することにより構築される。一実施形

態において、ＬＣＣＡ設計セットに示される優先的対合は、免疫グロブリン重鎖のＣＨ１ドメイン、第１の免疫グロブリン軽鎖のＣＬドメイン、および第２の免疫グロブリン軽鎖のＣＬドメインのうちの少なくとも１つにおいて１つ以上のアミノ酸を修飾することにより構築される。

【００９１】

一実施形態において、アミノ酸修飾（複数を含む）は、残基のＫａｂａｔ番号付けにより示されるように、可変（ＶＨ、ＶＬ）および定常（ＣＨ１、ＣＬ）ドメインの保存されたフレームワーク残基に限定される。例えば、Ａｌｍａｇｒｏ［Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ Ｉｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（２００８）１３：１６１９－１６３３］は、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｉａ、およびＩＭＧＴ番号付けスキームに基づいてフレームワーク残基の定義を提供する。

【００９２】

一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、互いに相補的である免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖に導入される１つ以上の突然変異を含む。重鎖および軽鎖の接続部分での相補性は、立体的および疎水性接触、静電気的／荷電相互作用、または様々な相互作用の組み合わせに基づいて達成され得る。タンパク質表面間の相補性は、鍵と鍵穴適合（ｌｏｃｋ ａｎｄ ｋｅｙ ｆｉｔ）、ノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂ ｉｎｔｏ ｈｏｌｅ）、突出部と空洞（ｐｒｏｔｒｕｓｉｏｎ ａｎｄ ｃａｖｉｔｙ）、ドナーとアクセプター（ｄｏｎｏｒ ａｎｄ ａｃｃｅｐｔｏｒ）等に関して文献に幅広く記載され、すべては、２つの相互作用する表面間の、構造的および化学的に対をなす性質を暗示している。一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、１つ以上の突然変異を含み、この免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖に導入される突然変異は、接続部分で軽鎖および重鎖にわたって新しい水素結合を導入する。一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの少なくとも１つは、１つ以上の突然変異を含み、この免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖に導入される突然変異は、接続部分で軽鎖および重鎖にわたって新しい塩橋を導入する。

【００９３】

好適なＬＣＣＡ設計セットの非限定的な例を表１に示し、表１はヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖ＣＨ１ドメイン（Ｈ１）および２つの免疫グロブリン軽鎖ＣＬドメイン（Ｌ１およびＬ２）におけるアミノ酸修飾を示し、Ｈ１、Ｌ１、およびＬ２を同時発現させる場合に、Ｈ１はＬ１と優先的に対合する。これらのＬＣＣＡ設計セットに示されるアミノ酸修飾は、抗組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４免疫グロブリン重鎖および軽鎖のアミノ酸配列に基づいている。

【００９４】

（表１）Ｈ１がＬ１と優先的に対合する、１つの免疫グロブリン重鎖（Ｈ１）ならびに２つの免疫グロブリン軽鎖Ｌ１およびＬ２に対する定常ドメイン修飾を有する選択されたＬＣＣＡ設計セット

セット番号	H1_突然変異 *	L1_突然変異	L2_突然変異
C500	WT#	WT	F116A
C503	WT	WT	F98L
C505	A139W_V190S	F116S	F118W_V133S
C507	A139W_V190S	F116A	F118W_V133S
C509	A139W	WT	F116A
C510	A139V_V190S	F116A	F118W_V133S
C511	A139V_V190S	WT	F118W_V133S
C513	A139I_V190S	F116A	F118W_V133S
C514	A139I_V190S	WT	F118W_V133S
C515	A139G_V190A	L135W_N137A	F116A_L135A
C517	A139G_V190A	L135W	F116A_L135A
C519	A139G_V190A	L135W	F116A_L135V
C521	S188I	WT	S176V_T178L
C523	V190G	F116A	F118W_V133S
C524	V190G	F116S	F118W_V133S
C525	S188L_V190Y	V133S	S176L
C527	F174V_P175S_S188G	S176L	WT
C530	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	Q160K_T178R
C532	L143A_D144G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	V133A_Q160K_T178R

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【００９５】

好適なＬＣＣＡ設計セットのさらなる非限定的な例を表２に示し、表２はヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖ＣＨ１ドメイン（Ｈ２）および２つの免疫グロブリン軽鎖ＣＬドメイン（Ｌ１およびＬ２）におけるアミノ酸修飾を示し、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２を同時発現させる場合に、Ｈ２はＬ２と優先的に対合する。

【００９６】

（表２）Ｈ２がＬ２と優先的に対合する、１つの免疫グロブリン重鎖（Ｈ２）および２つの免疫グロブリン軽鎖Ｌ１およびＬ２に対する定常ドメイン修飾を有する選択されたＬＣＣＡ設計セット

セット番号	H2_突然変異 *	L1_突然変異	L2_突然変異
C501	A139W_V190S	WT#	F116A
C502	A139W_V190A	WT	F116A
C504	F100W	WT	F98L
C506	A139W	F116S	F118W_V133S
C508	A139V	F116A	F118W_V133S
C512	A139I	WT	F118W_V133S
C516	A139W	L135W_N137A	F116A_L135A
C518	A139W	L135W	F116A_L135A
C520	A139W	L135W	F116A_L135V
C522	WT	WT	S176V_T178L
C526	F174V_P175S_S188G	V133S	S176L
C528	F174V_S188L	S176L	WT
C529	S188L	S176L	WT
C531	K145T_Q179D_S188L	Q124E_Q160E_T178D	Q160K_T178R
C533	K145T_Q179D_S188F	Q124E_V133W_Q160E_T180E	V133A_Q160K_T178R

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【００９７】

好適なＬＣＣＡ設計セットのさらなる非限定的な例は、実施例、表、および図に記載されている。

【００９８】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいていかなるアミノ酸修飾も有さない第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。別の実施形態において、ＬＣＣ

Ａ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。別の実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。別の実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【００９９】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１００】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１０１】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメイン

において少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＣＨ１ドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＣＬドメインにおいて少なくとも４つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＣＬドメインにおいて少なくとも３つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１０２】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットに示される優先的対合は、免疫グロブリン重鎖のＶＨドメイン、第１の免疫グロブリン軽鎖のＶＬドメイン、および第２の免疫グロブリン軽鎖のＶＬドメインのうちの少なくとも１つにおいて１つ以上のアミノ酸を修飾することにより構築される。好適なＬＣＣＡ設計セットの非限定的な例を表３に示し、表３はヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖ＶＨドメイン（Ｈ１）および２つの免疫グロブリン軽鎖ＶＬドメイン（Ｌ１およびＬ２）におけるアミノ酸修飾を示し、Ｈ１、Ｌ１、およびＬ２を同時発現させる場合に、Ｈ１はＬ１と優先的に対合する。

【０１０３】

（表３）Ｈ１がＬ１と優先的に対合する、１つの免疫グロブリン重鎖ならびに２つの免疫グロブリン軽鎖に対する可変ドメイン修飾を有する選択されたＬＣＣＡ設計セット

セット番号	H1_突然変異 *	L1_突然変異	L2_突然変異
V001	V37W_W103H	F98L	F98W
V004	V37W_W103H	F98L	P44W
V005	V37A_W103H	P44W	F98L
V006	V37W_W103F	F98L	F98W
V007	V37W	F98A	F98W
V009	V37W	F98A	WT#
V011	V37I	WT	F98L
V013	V37A_W103V	P44W	F98A
V015	V37A_W103H	P44W	F98A
V016	V37A_W103H	P44W	F98W
V020	L45W	Y87G	P44W
V022	WT	F98W	F98A
V023	WT	WT	F98A
V024	Q39R	Q38E	F98A
V026	Q39R	Q38E	WT
V028	Q39R	Q38E	Q38R
V030	Q39R	Q38D	Q38R
V032	Q39M	Q38M	Q38E
V034	Q39K	Q38N_T85E	Q38N_T85K
V037	Q39E	Q38R	F98A
V039	Q39D	Q38R	Q38D
V040	V37E	L89R_F98T	WT
V042	V37E_F100D	L89R_F98W	WT
V044	V37E_F100D	L89R_F98W	F98Y

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【０１０４】

好適なＬＣＣＡ設計セットのさらなる非限定的な例を表４に示し、表４はヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖ＶＨドメイン（Ｈ２）および２つの免疫グロブリン軽鎖ＶＬドメイン（Ｌ１およびＬ２）におけるアミノ酸修飾を示し、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２を同時発現させる場合に、Ｈ２はＬ２と優先的に対合する。

【０１０５】

（表４）Ｈ２がＬ２と優先的に対合する、１つの免疫グロブリン重鎖ならびに２つの免疫グロブリン軽鎖に対する可変ドメイン修飾を有する選択されたＬＣＣＡ設計セット

セット番号	H2_突然変異 *	L1_突然変異	L2_突然変異
V002	V37I	F98L	F98W
V003	WT#	F98L	F98W
V005	V37A_W103H	F98L	P44W
V007	V37W	F98W	F98A
V008	V37I	F98A	F98W
V009	V37W	WT	F98A
V010	V37I	F98A	WT
V012	F100W	WT	F98L
V014	V37W	P44W	F98A
V017	V37A_W103V	P44W	F98W
V018	V37A_W103V	P44W	F98L
V019	V37I_F100W	P44W	F98L
V021	V37A_W103H	Y87G	P44W
V025	V37W	Q38E	F98A
V027	WT	Q38E	WT
V029	Q39E	Q38E	Q38R
V030	Q39R	Q38R	Q38D
V031	Q39E	Q38D	Q38R
V033	Q39R	Q38M	Q38E
V035	Q39D	Q38N_T85E	Q38N_T85K
V036	Q39E	Q38N_T85E	Q38N_T85K
V038	V37W	Q38R	F98A
V041	WT	L89R_F98T	WT
V043	WT	L89R_F98W	WT
V045	V37S_A97K	L89R_F98W	F98Y

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【０１０６】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１０７】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１０８】

一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいてアミノ酸修飾を有さない第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖

、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。一実施形態において、ＬＣＣＡ設計セットは、ＶＨドメインにおいて少なくとも２つのアミノ酸修飾を有する免疫グロブリン重鎖、ＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第１の免疫グロブリン軽鎖、およびＶＬドメインにおいて少なくとも１つのアミノ酸修飾を有する第２の免疫グロブリン軽鎖を含む。

【０１０９】

一実施形態において、表１～４に示されるＬＣＣＡ設計セットを合わせて、２つの異なる免疫グロブリン重鎖（Ｈ１およびＨ２）および２つの異なる免疫グロブリン軽鎖（Ｌ１およびＬ２）を含む組み合わせを提供し、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、およびＬ２を同時発現させるときに、Ｈ１はＬ１と優先的に対合し、Ｈ２はＬ２と優先的に対合する。一実施形態において、重鎖のＣＨ１ドメインおよび／または軽鎖のＣＬドメインに対する修飾を含む表１からのＬＣＣＡ設計セットを、重鎖のＣＨ１ドメインおよび／または軽鎖のＣＬドメインに対する修飾も含む表２からのＬＣＣＡ設計セットと合わせる。

【０１１０】

ＬＣＣＡ設計セットの組み合わせに由来する設計セットの非限定的な例を表５に示す

【０１１１】

（表５）定常ドメイン修飾を含む設計セット

セット番号	セット番号	H1_突然変異＊	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
C500	C501	WT#	WT	A139W_V190S	F116A
C500	C502	WT	WT	A139W_V190A	F116A
C503	C504	WT	WT	F100W	F98L
C505	C506	A139W_V190S	F116S	A139W	F118W_V133S
C507	C508	A139W_V190S	F116A	A139V	F118W_V133S
C509	C501	A139W	WT	A139W_V190S	F116A
C509	C502	A139W	WT	A139W_V190A	F116A
C510	C508	A139V_V190S	F116A	A139V	F118W_V133S
C511	C512	A139V_V190S	WT	A139I	F118W_V133S
C513	C508	A139I_V190S	F116A	A139V	F118W_V133S
C514	C512	A139I_V190S	WT	A139I	F118W_V133S
C515	C516	A139G_V190A	L135W_N137A	A139W	F116A_L135A
C517	C518	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135A
C519	C520	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135V
C521	C522	S188I	WT	WT	S176V_T178L
C523	C508	V190G	F116A	A139V	F118W_V133S
C524	C506	V190G	F116S	A139W	F118W_V133S
C525	C526	S188L_V190Y	V133S	F174V_P175S_S188G	S176L
C527	C528	F174V_P175S_S188G	S176L	F174V_S188L	WT
C527	C529	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L	WT
C530	C531	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
C532	C533	L143A_D144G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【０１１２】

一実施形態において、重鎖のV_Hドメインおよび／または軽鎖のV_Lドメインに対する修飾を含む表３からのＬＣＣＡ設計セットを、重鎖のV_Hドメインおよび／または軽鎖のV_Lドメインに対する修飾も含む表４からのＬＣＣＡ設計セットと合わせる。ＬＣＣＡ設計セットのそのような組み合わせに由来する設計セットの非限定的な例を表６に示す。

【０１１３】

（表６）可変ドメイン修飾を含む設計セット

セット番号	セット番号	H1_突然変異*	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
V001	V002	V37W_W103H	F98L	V37I	F98W
V001	V003	V37W_W103H	F98L	WT#	F98W
V004	V005	V37W_W103H	F98L	V37A_W103H	P44W
V006	V002	V37W_W103F	F98L	V37I	F98W
V006	V003	V37W_W103F	F98L	WT	F98W
V007	V008	V37W	F98A	V37I	F98W
V009	V010	V37W	F98A	V37I	WT
V011	V012	V37I	WT	F100W	F98L
V013	V014	V37A_W103V	P44W	V37W	F98A
V015	V014	V37A_W103H	P44W	V37W	F98A
V016	V017	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98W
V005	V018	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98L
V005	V019	V37A_W103H	P44W	V37I_F100W	F98L
V020	V021	L45W	Y87G	V37A_W103H	P44W
V022	V007	WT	F98W	V37W	F98A
V023	V009	WT	WT	V37W	F98A
V024	V025	Q39R	Q38E	V37W	F98A
V026	V027	Q39R	Q38E	WT	WT
V028	V029	Q39R	Q38E	Q39E	Q38R
V030	V031	Q39R	Q38D	Q39E	Q38R
V032	V033	Q39M	Q38M	Q39R	Q38E
V034	V035	Q39K	Q38N_T85E	Q39D	Q38N_T85K
V034	V036	Q39K	Q38N_T85E	Q39E	Q38N_T85K
V037	V038	Q39E	Q38R	V37W	F98A
V039	V030	Q39D	Q38R	Q39R	Q38D
V040	V041	V37E	L89R_F98T	WT	WT
V042	V043	V37E_F100D	L89R_F98W	WT	WT
V044	V045	V37E_F100D	L89R_F98W	V37S_A97K	F98Y

＊Ｋａｂａｔ番号付け、＃ＷＴは、アミノ酸突然変異を伴わない野生型免疫グロブリン鎖を指す

【０１１４】

他の抗体に対する本明細書に特定された特定のアミノ酸修飾の移動可能性：

上記で特定された免疫グロブリン重鎖および軽鎖に対する特定のアミノ酸修飾は、Ｄ３Ｈ４４抗組織因子細胞外ドメイン抗体免疫グロブリン重鎖および軽鎖に関して記載されているが、これらのアミノ酸修飾は、他の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能であり、以下のことを考慮して、１つの免疫グロブリン重鎖と２つの免疫グロブリン軽鎖のうちの１つとの優先的対合の同様のパターンをもたらすことが企図され、本明細書に示される（実施例、図、および表を参照のこと）。

【０１１５】

免疫グロブリン重鎖と軽鎖間の接続部分におけるＶＨ：ＶＬおよびＣＨ１：ＣＬの接続部分残基は、比較的によく保存されている（Ｐａｄｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３（９）：９５１－９６０）。進化的制約の結果であるこの配列保存は、機能的に活性な抗体結合ドメインが軽鎖と重鎖の組み合わせの対合時に形成されるであろう可能性を増大させる。この配列保存の結果として、優先的対合をもたらす、Ｄ３Ｈ４４について上述される特定の実施例における配列修飾を、他の重鎖および軽鎖対のヘテロ二量体に移動させることができ、優先的対合に関してほぼ同等の結果が得られる。なぜなら、この領域は抗体にわたって高い配列保存を示すからである。さらに、配列の相違が生じるとき、これらは、通常、ＣＨ１：ＣＬの接続部分より遠位にある。これは、特に、ＣＨ１およびＣＬドメインに関する場合である。しかしながら、ＣＤＲ（相補性決定領域）ループ残基（および長さ）に対して、具体的には、ＣＤＲ－Ｈ３に対して抗原結合部位でいくつかの配列変化がある。それ故に、一実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対は、抗原結合部位のアミノ酸配列がＤ３Ｈ４４抗体のものとは著しく異なる場合に、少なくとも１つのヘテロ二量体が、ＣＤＲループに対して遠位にあるＶＨおよび／またはＶＬドメインにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対は、抗原結合部位のアミノ酸配列がＤ３Ｈ

４４抗体のものと実質的に同一である場合に、少なくとも１つのヘテロ二量体が、ＣＤＲループに対して近位または遠位にあるＶＨおよび／またはＶＬドメインにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体を含む。

【０１１６】

一実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾は、ヒトまたはヒト化ＩｇＧ１／κに基づいて抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能である。そのようなＩｇＧ１／κ鎖の非限定的な例には、オファツムマブ（ヒトに対して）またはトラスツズマブ、ペルツズマブまたはベバシズマブ（ヒト化に対して）が含まれる。

【０１１７】

別の実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾は、一般に使用されるＶＨおよびＶＬのサブグループを使用する抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能である。そのような抗体の非限定的な例には、ペルズマブ（Ｐｅｒｕｚｕｍａｂ）が含まれる。

【０１１８】

一実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾は、生殖細胞系列に近いフレームワークを有する抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能である。そのような抗体の例には、オビヌツズマブが含まれる。

【０１１９】

一実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾は、重鎖および軽鎖対に対して観察された平均に近いＶＨ：ＶＬのドメイン間の角度を有する免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能である。このタイプの抗体の例としては、ペルツズマブが挙げられるが、これに限定されない。別の実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾は、標準的なＣＬおよびＣＨ１ドメインを有する抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能である。そのような抗体の好適な例としては、トラスツズマブが挙げられるが、これに限定されない。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるアミノ酸修飾のある特定のサブセットは、上に提供される抗原結合構築物における可変ドメインにおいて使用される。

【０１２１】

実施例、図、および表は、アミノ酸修飾（例えば、可変領域および定常領域を含む１つ以上のＦａｂ断片内の）が他の免疫グロブリン重鎖および軽鎖に移動可能であり、１つの免疫グロブリン重鎖の、２つの免疫グロブリン軽鎖のうちの１つとの優先的対合の同様のパターンをもたらすことを示す。

【０１２２】

優先的対合

上述のように、本発明による抗原結合構築物／ヘテロ二量体対のうちの少なくとも１つのヘテロ二量体は、あるヘテロ二量体の重鎖、例えばＨ１が、軽鎖のうちの１つ、例えばＬ１と、他方の軽鎖Ｌ２よりも優先的に対合し、もう一方のヘテロ二量体の重鎖Ｈ２が、軽鎖Ｌ１ではなく、軽鎖Ｌ２と優先的に対合するように、それらの免疫グロブリン重鎖および／または免疫グロブリン軽鎖に対する１つ以上のアミノ酸修飾を含み得る。換言すれば、所望の優先的対合は、Ｈ１とＬ１の間、およびＨ２とＬ２の間にあると考えられる。例えば、Ｈ１をＬ１およびＬ２と合わせるときに、Ｈ１－Ｌ１ヘテロ二量体の収率が、誤対合されたＨ１－Ｌ２ヘテロ二量体の収率よりも大きい場合、１つ以上のアミノ酸修飾を伴わない対応するＨ１／Ｌ１対～Ｈ２／Ｌ２対のそれぞれの対合と比べて、Ｈ１とＬ１の間の優先的対合が生じていると考えられる。同様に、Ｈ２をＬ１およびＬ２と合わせるときに、Ｈ２－Ｌ２ヘテロ二量体の収率が、誤対合されたＨ２－Ｌ１ヘテロ二量体の収率よりも大きい場合、１つ以上のアミノ酸修飾を伴わない対応するＨ１－Ｌ１対～Ｈ２－Ｌ２対のそれぞれの対合と比べて、Ｈ２とＬ２の間の優先的対合が生じていると考えられる。この文脈において、Ｈ１およびＬ１（Ｈ１－Ｌ１）、またはＨ２およびＬ２（Ｈ２－Ｌ２）を含むヘテロ二量体は、本明細書では、優先的に対合された、適切に対合された、絶対

的に対合された、または所望のヘテロ二量体と称され、一方、Ｈ１およびＬ２（Ｈ１－Ｌ２）、またはＨ２およびＬ１（Ｈ２－Ｌ１）を含むヘテロ二量体は、本明細書では、誤対合されたヘテロ二量体と称される。Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２の選択的対合を達成することを意図する２つの重鎖および２つの軽鎖に対応する突然変異セットは、設定セットと称される。

【０１２３】

それ故に、一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、５５％超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、６０％超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、７０％超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、８０％超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、９０％超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体の相対収率は、９５％超である。

【０１２４】

上の実施例において、Ｈ１がＬ１およびＬ２と同時発現されるときに、所望のＨ１－Ｌ１ヘテロ二量体の量が誤対合されたＨ１－Ｌ２ヘテロ二量体の量よりも多い場合、Ｈ１－Ｌ１間の優先的対合が生じていると考えられる。同様に、Ｈ２がＬ１およびＬ２と同時発現されるときに、所望のＨ２－Ｌ２ヘテロ二量体の量が誤対合されたＨ２－Ｌ２ヘテロ二量体の量よりも多い場合、Ｈ２－Ｌ２間の優先的対合が生じていると考えられる。それ故に、一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、１．２５：１超である。一実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、１．５：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、２：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、３：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、５：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、１０：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、２５：１超である。別の実施形態において、ヘテロ二量体のうちの１つの免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖と同時発現されるとき、所望のヘテロ二量体と誤対合されたヘテロ二量体との比は、５０：１超である。

【０１２５】

ヘテロ二量体の熱安定性

一実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものに匹敵する熱安定性を有する。一実施形態において、熱安定性は、融解温度、またはＴｍの測定により決定される。

それ故に、一実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約１０℃以内である。それ故に、一実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約５℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約３℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約２℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約１．５℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約１℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約０．５℃以内である。別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体の熱安定性は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約０．２５℃以内である。

【０１２６】

抗原に対するヘテロ二量体の親和性

一実施形態において、ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものと同一またはそれに匹敵する、それぞれの抗原に対する親和性を有する。一実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約５０倍以内、または一桁以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。一実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約２５倍以内、または一桁以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。一実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約１０倍以内、または一桁以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約５倍以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約２．５倍以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約２倍以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対の

ヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものの約１．５倍以内である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。別の実施形態において、ヘテロ二量体対のヘテロ二量体は、同一の免疫グロブリン重鎖および軽鎖を含むが本明細書に記載されるＣＨ１、ＣＬ、ＶＨ、またはＶＬドメインに対してアミノ酸修飾を伴わないヘテロ二量体のものとほぼ同一である、それぞれの抗原に対する親和性を有する。

【０１２７】

さらなる任意の修飾

一実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対の免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、共有結合が重鎖と軽鎖の間の優先的対合に干渉しないか、またはその抗原と結合するヘテロ二量体の能力に影響するか、またはその安定性に影響するように、さらに修飾され得る（すなわち、様々なタイプの分子の共有結合により）。そのような修飾は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ＰＥＧ化、リン酸化反応、アミド化、既知の保護（ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ／ｂｌｏｃｋｉｎｇ）基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞内リガンドもしくは他のタンパク質への結合等が含まれるが、これらに限定されない。多くの化学的修飾のいずれかは、特異的化学分解、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成等を含むが、これらに限定されない、既知の技術により行われ得る。

【０１２８】

別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対の免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、所定の生物学的反応を修飾する治療剤または薬物部分に（直接または間接的に）連結され得る。治療剤または薬物部分は、古典的な化学治療剤に限定されると解釈すべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンＡ、Ｏｎｃｏｎａｓｅ（または別の細胞毒性ＲＮａｓｅ）、緑膿菌外毒素、コレラ毒素、またはジフテリア毒素等の毒素；腫瘍壊死因子、アルファ－インターフェロン、ベーター－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子等のタンパク質、アポトーシス剤、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開ＷＯ９７／３３８９９を参照のこと）、ＡＩＭ　ＩＩ（国際公開ＷＯ９７／３４９１１を参照のこと）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６：１５６７）、およびＶＥＧＩ（国際公開ＷＯ９９／２３１０５を参照のこと）；血栓剤もしくは抗血管新生剤、例えば、アンギオスタチンもしくはエンドスタチン；または、例えば、リンホカイン（例えば、インターロイキン－１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、および顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」））、または成長因子（例えば、成長ホルモン（「ＧＨ」））等の生物学的反応調節薬を含み得る。

【０１２９】

さらに、代替的な実施形態において、抗体は、放射性物質、または放射性金属イオンとコンジュゲートするために有用な大環状キレート剤等の治療部分とコンジュゲートさせ得る（放射性物質の例については上記を参照のこと）。ある実施形態において、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体に結合され得る１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－Ｎ，Ｎ′，Ｎ′′，Ｎ′′′－四酢酸（ＤＯＴＡ）である。そのようなリンカー分子は、当該技術分野で一般に知られており、Ｄｅｎａｒｄｏ　ｅｔ　ａｌ．１９９８，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４：２４８３、Ｐｅｔｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１０：５５３、およびＺｉｍｍｅｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２６：９４３に記載されている。

【０１３０】

いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、精製

および／または試験等を促進するためにタグを含む融合タンパク質として表される。本明細書に述べられるように、「タグ」は、タンパク質の特定または精製に貢献する、Ｃ末端、Ｎ末端、または内部のいずれかにタンパク質に提供される任意のさらなる一連のアミノ酸である。好適なタグとしては、アルブミン結合ドメイン（ＡＢＤ）、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、およびマルトース結合タンパク質等の、精製および／または試験に有用である当業者に知られているタグが含まれるが、これらに限定されない。そのようなタグ付けされたタンパク質はまた、精製前、その間、またはその後、タグの除去を簡略化するために、トロンビン、エンテロキナーゼ、または因子Ｘ切断部位等の切断部位を含むように遺伝子操作され得る。

【０１３１】

いくつかの実施形態において、Ｆａｂドメインの下方にあり、鎖間ジスルフィド結合を形成する、軽鎖（２１４位、Ｋａｂａｔ番号付け）および重鎖（２３３位、Ｋａｂａｔ番号付け）におけるシステイン残基のうちの１つ以上は、セリンまたはアラニンまたは非システインまたは異なるアミノ酸に修飾され得る。

【０１３２】

さらなるアミノ酸修飾は、ヘテロ二量体対の優先的対合、および／または熱安定性のレベルを増加させるために、免疫グロブリン重鎖に行われ得ることが企図される。例えば、さらなるアミノ酸修飾は、ホモ二量体対よりもヘテロ二量体対間に優先的対合をもたらすために、免疫グロブリン重鎖Ｆｃドメインに行われ得る。そのようなアミノ酸修飾は、当該技術分野で知られており、例えば、米国特許公開第２０１２／０１４９８７６号に記載されているものを含む。代替として、ヘテロ二量体対間の優先的対合をもたらすための代替的戦略、例えば、「ノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂｓ　ｉｎｔｏ　ｈｏｌｅｓ）」等のホモ二量体対、イオン相互作用による荷電残基、および鎖交換遺伝子操作ドメイン（ＳＥＥＤ）技術もまた、使用され得る。後者の戦略は、当該技術分野で記載されており、Ｋｌｅｉｎらの上記に概説されている。Ｆｃドメインのさらなる考察が、以下に続く。

【０１３３】

Ｆｃドメイン

本明細書に記載される構築物は、Ｆｃをさらに含み得る。いくつかの態様において、Ｆｃは、少なくとも１つまたは２つのC_{H3}ドメイン配列を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および／または第２のヘテロ二量体と結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、ヒトＦｃである。いくつかの態様において、Ｆｃは、ヒトＩｇＧまたはＩｇＧ１　Ｆｃである。いくつかの態様において、Ｆｃは、ヘテロ二量体Ｆｃである。いくつかの態様において、Ｆｃは、少なくとも１つまたは２つのC_{H2}ドメイン配列を含む。

【０１３４】

いくつかの態様において、Ｆｃは、C_{H3}ドメイン配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、C_{H2}ドメイン配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、単一のポリペプチドである。いくつかの態様において、Ｆｃは、複数のペプチド、例えば、２つのポリペプチドである。

【０１３５】

いくつかの態様において、Ｆｃは、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、C_{H2}配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上の修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、単一のポリペプチドである。いくつかの態様において、Ｆｃは、複数のペプチド、例えば、２つのポリペプチドである。

【０１３６】

いくつかの態様において、Ｆｃは、２０１１年１１月４日に出願された特許出願ＰＣＴ／ＣＡ２０１１／００１２３８、２０１２年１１月２日に出願された特許出願ＰＣＴ／ＣＡ２０１２／０５０７８０に記載されるＦｃであり、これらのそれぞれは、すべての目的

のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１３７】

いくつかの態様において、本明細書に記載される構築物は、非対称的に修飾される修飾されたＣＨ３ドメインを含むヘテロ二量体Ｆｃを含む。ヘテロ二量体Ｆｃは、２つの重鎖定常ドメインポリペプチド：第１の重鎖ポリペプチドおよび第２の重鎖ポリペプチドを含み得、これらは、Ｆｃが１つの第１の重鎖ポリペプチドおよび１つの第２の重鎖ポリペプチドを含むならば、交換可能に使用され得る。概して、第１の重鎖ポリペプチドは第１のＣＨ３配列を含み、第２の重鎖ポリペプチドは第２のＣＨ３配列を含む。

【０１３８】

非対称様式で導入される１つ以上のアミノ酸修飾を含む２つのＣＨ３配列は、概して、２つのＣＨ３配列が二量体化するときに、ホモ二量体よりもむしろ、ヘテロ二量体Ｆｃをもたらす。本明細書で使用される「非対称性アミノ酸修飾」は、第１のＣＨ３配列上の特定の位置でのアミノ酸が、同じ位置での第２のＣＨ３配列上のアミノ酸とは異なり、第１および第２のＣＨ３配列が、ホモ二量体ではなくヘテロ二量体を形成するために優先的に対合する、任意の修飾を指す。このヘテロ二量体化は、各配列上の同じそれぞれのアミノ酸位置での２つのアミノ酸のうちの１つのみの修飾、または第１および第２の各々のＣＨ３配列上の同じそれぞれの位置での各配列上の両方のアミノ酸の修飾の結果であり得る。ヘテロ二量体Ｆｃの第１および第２のＣＨ３配列は、１つ以上の非対称性アミノ酸修飾を含み得る。

【０１３９】

表Ｘは、完全長ヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸２３１～４４７に対応する、ヒトＩｇＧ１Ｆｃ配列のアミノ酸配列を提供する。ＣＨ３配列は、完全長ヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸３４１～４４７を含む。

【０１４０】

典型的には、Ｆｃは、二量体化することができる２つの連続した重鎖配列（ＡおよびＢ）を含み得る。いくつかの態様において、Ｆｃのうちの１つまたは両方の配列は、ＥＵ番号付けを用いた、Ｌ３５１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｔ３６６、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｔ３５０、Ｓ４００、および／またはＮ３９０の位置で１つ以上の突然変異または修飾を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、表Ｘに示される突然変異配列を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、変異体１Ａ－Ｂの突然変異を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、変異体２Ａ－Ｂの突然変異を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、変異体３Ａ－Ｂの突然変異を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、変異体４Ａ－Ｂの突然変異を含む。いくつかの態様において、Ｆｃは、変異体５Ａ－Ｂの突然変異を含む。

【０１４１】

（表Ｘ）

ヒトIgG1 Fc配列231～447 (EU番号付け)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
変異体IgG1 Fc配列(231-447)	鎖	突然変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

【０１４２】

第１および第２のＣＨ３は、完全長ヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸２３１～４４７に関して本明細書に記載されるアミノ酸突然変異を含み得る。一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｆ４０５およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列を有する、修飾されたＣＨ３ドメインを含む。一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、およびＹ４０７Ｖから選択される１つ以上のアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列、ならびにＴ３６６Ｌ、Ｔ３６６Ｉ、Ｋ３９２Ｌ、Ｋ３９２Ｍ、およびＴ３９４Ｗから選択される１つ以上のアミノ酸修飾を有する、第２のＣＨ３配列を有する修飾されたＣＨ３ドメインを含む。

【０１４３】

一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列と、Ｔ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列とを有する、修飾されたＣＨ３ドメインを含み、第１または第２のＣＨ３配列のうちの１つは、Ｑ３４７の位置でアミノ酸修飾をさらに含み、他のＣＨ３配列は、Ｋ３６０の位置でアミノ酸修飾をさらに含む。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列と、Ｔ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列とを有する、修飾されたＣＨ３ドメインを含み、第１または第２のＣＨ３配列のうちの１つは、Ｑ３４７の位置でアミノ酸修飾を有するアミノ酸修飾をさらに含み、他のＣＨ３配列は、Ｋ３６０の位置でアミノ酸修飾をさらに含み、当該ＣＨ３配列のうちの１つまたは両方は、アミノ酸修飾Ｔ３５０Ｖをさらに含む。

【０１４４】

一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列と、Ｔ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列とを有する、修飾されたＣＨ３ドメインを

含み、当該第１または第２のＣＨ３配列のうちの１つは、Ｄ３９９ＲまたはＤ３９９Ｋのアミノ酸修飾をさらに含み、他のＣＨ３配列は、Ｔ４１１Ｅ、Ｔ４１１Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、およびＫ３９２Ｄのうちの１つ以上を含む。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列と、Ｔ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列とを有する、修飾されたＣＨ３ドメインを含み、当該第１または第２のＣＨ３配列のうちの１つは、Ｄ３９９ＲまたはＤ３９９Ｋのアミノ酸修飾をさらに含み、他のＣＨ３配列は、Ｔ４１１Ｅ、Ｔ４１１Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、およびＫ３９２Ｄのうちの１つ以上を含み、当該ＣＨ３配列のうちの１つまたは両方は、Ｔ３５０Ｖアミノ酸修飾をさらに含む。

【０１４５】

一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、Ｌ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７の位置でアミノ酸修飾を有する第１のＣＨ３配列と、Ｔ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４の位置でアミノ酸修飾を有する第２のＣＨ３配列とを有する、修飾されたＣＨ３ドメインを含み、当該ＣＨ３配列のうちの１つまたは両方は、Ｔ３５０Ｖのアミノ酸修飾をさらに含む。

【０１４６】

一実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、以下のアミノ酸修飾を含む修飾されたＣＨ３ドメインを含み、「Ａ」は、第１のＣＨ３配列に対するアミノ酸修飾を表し、「Ｂ」は、第２のＣＨ３配列に対するアミノ酸修飾を表す：Ａ：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、および／またはＢ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ。

【０１４７】

１つ以上の非対称性アミノ酸修飾は、ヘテロ二量体ＣＨ３ドメインが野生型ホモ二量体ＣＨ３ドメインに匹敵する安定性を有する、ヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進し得る。一実施形態において、１つ以上の非対称性アミノ酸修飾は、ヘテロ二量体Ｆｃドメインが野生型ホモ二量体Ｆｃドメインに匹敵する安定性を有する、ヘテロ二量体Ｆｃドメインの形成を促進する。一実施形態において、１つ以上の非対称性アミノ酸修飾は、ヘテロ二量体Ｆｃドメインが示差走査熱量測定研究における融解温度（Ｔｍ）を介して観察された安定性を有する、ヘテロ二量体Ｆｃドメインの形成を促進し、この融解温度は、対応する対称性の野生型ホモ二量体Ｆｃドメインに関して観察されたものの４℃以内である。いくつかの態様において、Ｆｃは、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する、C_{H3}配列のうちの少なくとも１つにおける１つ以上の修飾を含む。

【０１４８】

一実施形態において、ＣＨ３ドメインの安定性は、例えば、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によりＣＨ３ドメインの融解温度を測定することにより評価され得る。それ故に、さらなる実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約６８℃以上の融解温度を有する。別の実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約７０℃以上の融解温度を有する。別の実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約７２℃以上の融解温度を有する。別の実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約７３℃以上の融解温度を有する。別の実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約７５℃以上の融解温度を有する。別の実施形態において、ＣＨ３ドメインは、約７８℃以上の融解温度を有する。いくつかの態様において、二量体化されたC_{H3}配列は、約６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７７．５、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、または８５℃、またはそれより高い融解温度（Ｔｍ）を有する。

【０１４９】
いくつかの実施形態において、修飾されたＣＨ３配列を含むヘテロ二量体Ｆｃは、発現産物においてホモ二量体Ｆｃと比較して少なくとも約７５％の純度で形成され得る。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、約８０％超の純度で形成される。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、約８５％超の純度で形成される。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、約９０％超の純度で形成される。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、約９５％超の純度で形成される。別の実施形態において、ヘテロ二量体Ｆｃは、約９７％超の純度で形成される。いくつかの態様において、Ｆｃは、発現されるとき、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超の純度で形成されるヘテロ二量体である。いくつかの態様において、Ｆｃは、単一細胞により発現されるとき、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超の純度で形成されるヘテロ二量体である。

【０１５０】
ヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進するために単量体Ｆｃポリペプチドを修飾するためのさらなる方法は、国際特許公開ＷＯ９６／０２７０１１（ノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂｓ ｉｎｔｏ ｈｏｌｅｓ））、Ｇｕｎａｓｅｋａｒａｎら（Ｇｕｎａｓｅｋａｒａｎ Ｋ．ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２８５，１９６３７－４６，ｅｌｅｃｔｒｏｓｔａｔｉｃ ｄｅｓｉｇｎ ｔｏ ａｃｈｉｅｖｅ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）、Ｄａｖｉｓら（Ｄａｖｉｓ，ＪＨ．ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｐｒｏｔ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ；２３（４）：１９５－２０２、鎖交換遺伝子操作ドメイン（ＳＥＥＤ）技術）、およびＬａｂｒｉｊｎら［Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｔａｂｌｅ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩｇＧ１ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｆａｂ－ａｒｍ ｅｘｃｈａｎｇｅ．Ｌａｂｒｉｊｎ ＡＦ，Ｍｅｅｓｔｅｒｓ ＪＩ，ｄｅ Ｇｏｅｉｊ ＢＥ，ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｒｅｍｅｒ ＥＴ，Ｎｅｉｊｓｓｅｎ Ｊ，ｖａｎ Ｋａｍｐｅｎ ＭＤ，Ｓｔｒｕｍａｎｅ Ｋ，Ｖｅｒｐｌｏｅｇｅｎ Ｓ，Ｋｕｎｄｕ Ａ，Ｇｒａｍｅｒ ＭＪ，ｖａｎ Ｂｅｒｋｅｌ ＰＨ，ｖａｎ ｄｅ Ｗｉｎｋｅｌ ＪＧ，Ｓｃｈｕｕｒｍａｎ Ｊ，Ｐａｒｒｅｎ ＰＷ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｍａｒ ２６；１１０（１３）：５１４５－５０に記載されている。

【０１５１】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される単離された構築物は、抗原と結合する抗原結合構築物、ならびに同一のＦｃポリペプチドを含まない抗原結合構築物と比較して、安定性および製造の容易さ等の優れた生物物理学的特性を有する二量体Ｆｃポリペプチド構築物を含む。Ｆｃの重鎖配列における多くの突然変異は、異なるＦｃガンマ受容体に対する抗体Ｆｃの親和性を選択的に変化させることのために、当該技術分野で知られている。いくつかの態様において、Ｆｃは、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する１つ以上の修飾を含む。

【０１５２】
ＣＨ２ドメインは、表Ｘに示されるアミノ酸２３１～３４０である。例示的な突然変異は、以下に列挙される。

【０１５３】
Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ／Ｋ３２６Ａ（Ｌｕ Ｙ，Ｖｅｒｎｅｓ ＪＭ，Ｃｈｉａｎｇ Ｎ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１１ Ｆｅｂ ２８；３６５（１－２）：１３２－４１）

【０１５４】
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ、Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｌ２３５Ｖ／Ｐ３９６Ｌ（Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎ ＪＢ、Ｇｏｒｌａｔｏｖ Ｓ、Ｔｕａｉｌｌｏｎ Ｎ、ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００７

Ｓｅｐ １５；６７（１８）：８８８２－９０、Ｎｏｒｄｓｔｒｏｍ ＪＬ，Ｇｏｒｌａｔｏｖ Ｓ，Ｚｈａｎｇ Ｗ，ｅｔ ａｌ．Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１ Ｎｏｖ ３０；１３（６）：Ｒ１２３）

【０１５５】

Ｆ２４３Ｌ（Ｓｔｅｗａｒｔ Ｒ，Ｔｈｏｍ Ｇ，Ｌｅｖｅｎｓ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ．２０１１ Ｓｅｐ；２４（９）：６７１－８．）、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ（Ｓｈｉｅｌｄｓ ＲＬ，Ｎａｍｅｎｕｋ ＡＫ，Ｈｏｎｇ Ｋ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００１ Ｍａｒ ２；２７６（９）：６５９１－６０４）

【０１５６】

Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ａ３３０Ｌ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ（Ｌａｚａｒ ＧＡ，Ｄａｎｇ Ｗ，Ｋａｒｋｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００６ Ｍａｒ １４；１０３（１１）：４００５－１０）

【０１５７】

Ｓ２３９Ｄ／Ｓ２６７Ｅ、Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ（Ｃｈｕ ＳＹ，Ｖｏｓｔｉａｒ Ｉ，Ｋａｒｋｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８ Ｓｅｐ；４５（１５）：３９２６－３３）

【０１５８】

Ｓ２３９Ｄ／Ｄ２６５Ｓ／Ｓ２９８Ａ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｅ／Ｓ２９８Ａ／Ｋ３２６Ａ／Ａ３２７Ｈ、Ｇ２３７Ｆ／Ｓ２９８Ａ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ｓ２９８Ａ、Ｓ２３９Ｄ／Ｋ３２６Ｅ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ／Ｓ２９８Ａ、Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｄ２７０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｅ／Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｄ、Ｌ２３４Ｆ／Ｓ２６７Ｅ／Ｎ３２５Ｌ、Ｇ２３７Ｆ／Ｖ２６６Ｌ／Ｓ２６７Ｄ、ならびに国際公開ＷＯ２０１１／１２０１３４および同ＷＯ２０１１／１２０１３５（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される他の突然変異。Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．Ｓｔｒｏｈｌ ａｎｄ Ｌｉｌａ Ｍ．Ｓｔｒｏｈｌによる、Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ｓｅｒｉｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｎｏ １１，ＩＳＢＮ １ ９０７５６８ ３７ ９，Ｏｃｔ ２０１２）は、２８３頁に突然変異を記載する。

【０１５９】

いくつかの実施形態において、ＣＨ２ドメインは、１つ以上の非対称性アミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態において、ＣＨ２ドメインは、ＦｃγＲの選択的結合を促進するために１つ以上の非対称性アミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態において、ＣＨ２ドメインは、本明細書に記載される単離された構築物の分離および精製を可能にする。

【０１６０】

ＦｃＲｎ結合およびＰＫパラメーター

当該技術分野で知られているように、ＦｃＲｎへの結合は、エンドサイトーシスされた抗体をエンドソームから血流へと戻して再利用する（Ｒａｇｈａｖａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ １２：１８１－２２０、Ｇｈｅｔｉｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ １８：７３９－７６６）。このプロセスは、完全長分子のサイズが大きいことによる腎臓濾過の除外と合わさって、１～３週間の範囲の好都合な抗体血清半減期をもたらす。ＦｃのＦｃＲｎへの結合はまた、抗体輸送において重要な役割を果たす。このようにして、一実施形態において、本発明の構築物は、ＦｃＲｎと結合することができる。

【０１６１】

エフェクター機能を改善するためのさらなる修飾

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される構築物は、そのエフェクター機能を改善するように修飾され得る。そのような修飾は当該技術分野で知られており、アフコシル化、または活性化受容体、主にＡＤＣＣのＦＣＧＲ３ａに対する、およびＣＤＣのＣ１ｑに対する、抗体のＦｃ部分の親和性の遺伝子操作を含む。以下の表Ｙは、エフェクタ

ー機能の遺伝子操作に関する文献において報告される様々な設計を要約する。

【０１６２】

（表Ｙ）

参考文献	突然変異	作用
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	アフコシル化	ADCCの増加
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	ADCCの増加
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	ADCCの増加
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	ADCCの増加
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	ADCCの増加
Stewart, 2011	F243L	ADCCの増加
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	ADCCの増加
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	ADCCの増加
Lazar, 2006	S239D/I332E	ADCCの増加
Bowles, 2006	AME-D, 特定の突然変異ではない	ADCCの増加
Heider, 2011	37.1, 突然変異は開示されず	ADCCの増加
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	ADCCの増加

【０１６３】

このようにして、１つの実施形態において、本明細書に記載される構築物は、改善されたエフェクター機能を与える上記表に示される１つ以上のアミノ酸修飾を含む、二量体Ｆｃを含むことができる。別の実施形態において、本構築物は、エフェクター機能を改善するためにアフコシル化され得る。

【０１６４】

リンカー

本明細書に記載される構築物は、本明細書に記載されるＦｃに操作可能に結合された、本明細書に記載される１つ以上のヘテロ二量体を含むことができる。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、１つ以上のヘテロ二量体と結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のヘテロ二量体と直接結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のリンカーにより１つ以上のヘテロ二量体と結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、リンカーによりそれぞれのヘテロ二量体の重鎖と結合する。

【０１６５】

いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上のポリペプチドリンカーである。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上の抗体ヒンジ領域を含む。いくつかの態様において、１つ以上のリンカーは、１つ以上のＩｇＧ１ヒンジ領域を含む。

【０１６６】

ヘテロ二量体対を調製する方法

上述のように、本発明によるヘテロ二量体対は、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含むことができ、それぞれのヘテロ二量体は、少なくとも、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを有する免疫グロブリン重鎖、ならびにＶＬドメインおよびＣＬドメインを有する免疫グロブリン軽鎖を含む。ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン

軽鎖は、当該技術分野で知られている組換えＤＮＡ技術を用いて容易に調製することができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，３ｒｄ ｅｄ．，２００１）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，２ｎｄ ｅｄ．，１９８９）、Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，４ｔｈ ｅｄ．，１９９９）、およびＧｌｉｃｋ ａｎｄ Ｐａｓｔｅｒｎａｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ（ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．，２ｎｄ ｅｄ．，１９９８）において記載されるような標準技術は、組換え核酸法、核酸合成、細胞培養、導入遺伝子の組み込み、および組換えタンパク質発現のために使用することができる。代替として、本発明によるヘテロ二量体およびヘテロ二量体対は、化学的に合成され得る。

【０１６７】

ヘテロ二量体が由来する抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の核酸およびアミノ酸配列は、当該技術分野で知られているか、または核酸および／またはタンパク質シークエンシング方法を用いて容易に決定することができる。本明細書に記載されるタグを免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖に遺伝的に融合させる方法は、当該技術分野で知られており、いくつかが、以下および実施例に記載されている。

【０１６８】

例えば、宿主細胞において免疫グロブリン重鎖および軽鎖を発現および同時発現する方法が、当該技術分野でよく知られている。加えて、組換えＤＮＡ技術を用いて重鎖および／または軽鎖にタグ付けする方法もまた、当該技術分野でよく知られている。重鎖および軽鎖の発現に適している発現ベクターおよび宿主細胞もまた、以下に記載されるように、当該技術分野でよく知られている。

【０１６９】

４つの鎖すべてを発現する単一のクローナルなまたは一過性細胞株のみの使用に依存しない二重特異性抗体生成方法が、当該技術分野で知られている（Ｇｒａｍｅｒ，ｅｔ ａｌ．（２０１３） ｍＡｂｓ ５，９６２、Ｓｔｒｏｐ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４２０，２０４．）。これらの方法は、二重特異性抗体の形成に関与している軽鎖および重鎖の２つの対の、酸化還元条件下（レドックス生成）での生成後のアーム交換に依存する。このアプローチにおいて、Ｈ１：Ｌ１およびＨ２：Ｌ２の対は、２つの異なる細胞株において発現されて、２つのＦａｂアームを独立して生成することができる。続いて、２つのＦａｂアームを選択酸化還元条件下で混合し、２つの固有の重鎖Ｈ１およびＨ２の再会合を達成し、Ｌ１：Ｈ１：Ｈ２：Ｌ２鎖を含む二重特異性抗体を形成する。酸化還元生成方法またはその方法の修正バージョンを用いて二重特異性抗体の生成において、本明細書に記載される設計のライブラリー／データセットの使用が想定され得る。

【０１７０】

ある実施形態において、無細胞タンパク質系を使用して、生細胞を用いずに、ポリペプチド（例えば、重鎖および軽鎖ポリペプチド）を同時発現させる。代わりに、ＤＮＡをＲＮＡに転写し、ＲＮＡをタンパク質に翻訳するのに必要とされるすべての成分（例えば、リボソーム、ｔＲＮＡ、酵素、補助因子、アミノ酸）は、インビトロでの使用のために溶液中に提供される。ある実施形態において、インビトロ発現は、（１）重鎖および軽鎖ポリペプチドをコードする遺伝子鋳型（ｍＲＮＡまたはＤＮＡ）、ならびに（２）必須の転写および翻訳の分子機構を含む反応溶液を必要とする。ある実施形態において、細胞抽出

物は、実質的には、反応溶液の構成成分、例えば、ｍＲＮＡ転写のためのＲＮＡポリメラーゼ、ポリペプチド翻訳のためのリボソーム、ｔＲＮＡ、アミノ酸、酵素補助因子、エネルギー源、および適切なタンパク質折り畳みに必須である細胞成分を供給する。無細胞タンパク質発現系は、細菌性細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、またはこれらの組み合わせに由来する溶解物を用いて調製され得る。そのような細胞溶解物は、翻訳に必要な酵素および構成要素の正しい組成物および比率を提供し得る。いくつかの実施形態において、細胞膜を除去して、細胞の細胞質および細胞小器官成分のみを残す。

【０１７１】

いくつかの無細胞タンパク質発現系は、Ｃａｒｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｄｖ．３０：１１８５－１１９４に概説されるように、当該技術分野で知られている。例えば、無細胞タンパク質系は、原核生物または真核生物細胞に基づいて入手可能である。原核生物の無細胞発現系の例には、大腸菌由来のものが含まれる。真核生物の無細胞発現系の例には、例えば、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽、および昆虫細胞からの抽出物に基づいて入手可能である。そのような原核生物および真核生物の無細胞タンパク質発現系は、Ｒｏｃｈｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｑｉａｇｅｎ、およびＮｏｖａｇｅｎ等の会社から市販されている。当業者は、互いに対合することができるポリペプチド（例えば、重鎖および軽鎖ポリペプチド）を生成し得る好適な無細胞発現系を容易に選択することができるであろう。さらに、無細胞タンパク質発現系はまた、シャペロン（例えば、ＢｉＰ）およびイソメラーゼ（例えば、ジスルフィドイソメラーゼ）を補充して、ＩｇＧの折り畳みの有効性を改善させることもできる。

【０１７２】

いくつかの実施形態において、無細胞発現系を使用して、ＤＮＡ鋳型（転写および翻訳）またはｍＲＮＡ鋳型（翻訳のみ）から重鎖および軽鎖ポリペプチドを同時発現する。

【０１７３】

ベクターおよび宿主細胞

重鎖および軽鎖の組換え発現は、重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築物（例えば、抗体または融合タンパク質）を必要とする。一旦重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドが得られると、重鎖または軽鎖の生成のためのベクターは、当該技術分野でよく知られている組換えＤＮＡ技術により生成され得る。それ故に、ヌクレオチド配列をコードする重鎖または軽鎖を含むポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製するための方法が、本明細書に記載される。当業者によく知られている方法は、重鎖または軽鎖をコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するために使用することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組み換えが含まれる。本発明は、このようにして、プロモーターに作動可能に連結された、重鎖または軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。

【０１７４】

発現ベクターは、従来技術により宿主細胞に移され、トランスフェクト細胞を従来技術により培養して、本発明の方法で用いる修飾された重鎖または軽鎖を生成する。特定の実施形態において、本方法で用いる重鎖および軽鎖は、以下に詳述するように、免疫グロブリン分子全体の発現のために、宿主細胞中で同時発現される。

【０１７５】

様々な宿主発現ベクター系を用いて、修飾された重鎖および軽鎖を発現し得る。そのような宿主発現ベクター系は、これにより対象となるコード配列が生成され、続いて精製され得る手段に相当するのみでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされたとき、修飾された重鎖および軽鎖をインサイチューで発現し得る細胞にも相当する。これらには、例えば、修飾された重鎖および軽鎖コード配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された、細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）および枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉ

ｓ））等の微生物；修飾された重鎖および軽鎖コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された、酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ Ｐｉｃｈｉａ）；修飾された重鎖および軽鎖コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；修飾された重鎖および軽鎖コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）に感染したか、または組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換された、植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を保有する、哺乳動物細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＨＥＫ－２９３、ＮＳＯ、および３Ｔ３細胞）が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、大腸菌等の細菌性細胞、または真核生物細胞は、組換え抗体または融合タンパク質分子である修飾された重鎖および軽鎖の発現のために使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）等の哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーター要素等のベクターと併せて、抗体の有効な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｇｅｎｅ ４５：１０１、およびＣｏｃｋｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：２）。特定の実施形態において、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターにより調節される。

【０１７６】

哺乳動物の宿主細胞において、多くのウイルスベースの発現系が使用され得る。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、対象となる修飾された重鎖および軽鎖コード配列を、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーターおよび三部分（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ）リーダー配列にライゲートし得る。次いで、このキメラ遺伝子を、アデノウイルスゲノムにインビトロまたはインビボ組換えにより挿入し得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域Ｅ１またはＥ３）への挿入は、感染した宿主において生存可能であり、修飾された重鎖および軽鎖を発現することができる組換えウイルスをもたらす（例えば、Ｌｏｇａｎ ＆ Ｓｈｅｎｋ，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３５５－３５９を参照）。特定の開始シグナルはまた、挿入された抗体コード配列の効率のよい翻訳のために必要であり得る。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、開始コドンは、挿入部全体の翻訳を確実におこなうために、所望のコード配列のリーディングフレームと一致すべきである。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の、様々な起源であり得る。発現の効率性は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等を含めることにより向上され得る（例えば、Ｂｉｔｔｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４を参照）。

【０１７７】

ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の発現は、当該技術分野で知られている任意のプロモーターまたはエンハンサー要素により制御され得る。修飾された重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の発現を制御するために使用され得るプロモーター（例えば、抗体もしくは融合タンパク質）としては、ＳＶ４０早期プロモーター領域（Ｂｅｒｎｏｉｓｔ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：３０４－３１０）、ラウス肉腫ウイルスの３'長末端反復に含まれるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏ，ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２：７８７－７９７）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８．１４４１－１４４５）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｎａｔｕｒｅ ２９６：３９－４２）、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）プロモーター（Ｇｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５５４７－５５５１）；β－ラクタマ

ーゼプロモーター等の原核生物発現プロモーター（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆ ｅｔ ａｌ，１９７８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７５：３７２７－３７３１）、またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８０：２１－２５；Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ，１９８０，２４２：７４－９４中の「Ｕｓｅｆｕｌ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｒｏｍ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｂａｃｔｅｒｉａ」も参照）；ノパリンシンテターゼプロモーター領域を含む植物発現ベクター（Ｈｅｒｒｅｒａ－Ｅｓｔｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３０３：２０９－２１３）、またはカリフラワーモザイクウイルス３５Ｓ ＲＮＡプロモーター（Ｇａｒｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．９：２８７１）、および光合成酵素リブロースビホスフェートカルボキシラーゼのプロモーター（Ｈｅｒｒｅｒａ－Ｅｓｔｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ ３１０：１１５－１２０）；Ｇａｌ４プロモーター等の酵母菌または真菌由来のプロモーター要素、ＡＤＣ（アルコール脱水素酵素）プロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター、ならびに組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されている以下の動物転写制御領域：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼＩ遺伝子制御領域（Ｓｗｉｆｔ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６３９－６４６、Ｏｒｎｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５０：３９９－４０９、ＭａｃＤｏｎａｌｄ，１９８７，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：４２５－５１５）；膵臓ベータ細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Ｈａｎａｈａｎ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：１１５－１２２）、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６４７－６５８、Ａｄａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１８：５３３－５３８、Ａｌｅｘａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．７：１４３６－１４４４）、精巣、乳房、リンパ、およびマスト細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域（Ｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４５：４８５－４９５）、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：２６８－２７６）、肝臓において活性なアルファ－フェトプロテイン遺伝子制御領域（Ｋｒｕｍｌａｕｆ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：１６３９－１６４８、Ｈａｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：５３－５８；肝臓において活性なアルファ１－アンチトリプシン遺伝子制御領域（Ｋｅｌｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：１６１－１７１）、骨髄様細胞において活性なベーターグロブリン遺伝子制御領域（Ｍｏｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：３３８－３４０、Ｋｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４６：８９－９４；脳の稀突起膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Ｒｅａｄｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ４８：７０３－７１２）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Ｓａｎｉ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２８３－２８６）；神経細胞において活性なニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）（Ｍｏｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８０：５７１－８３）；神経細胞において活性な脳由来神経栄養性因子（ＢＤＮＦ）遺伝子制御領域（Ｔａｂｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍ．２５３：８１８－８２３）；星状細胞において活性な神経膠原繊維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）プロモーター（Ｇｏｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｂｒａｚ Ｊ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ Ｒｅｓ ３２（５）：６１９－６３１、Ｍｏｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８０：５７１－８３）、および視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：１３７２－１３７８）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７８】

加えて、宿主細胞株が選択され得、これは、挿入された配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式での遺伝子産物を修飾および処理する。ある特定のプロモーターからの発現は、ある特定のインデューサーの存在下で上昇され得、このようにして、遺伝子操作された融合タンパク質の発現が制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳および翻訳後プロセシングならびに修飾（例えば、タンパク質のグリコシル化、リン酸化）のための特性および特定の機序を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現される外来タンパク質の所望の修飾およびプロセシングを確実にするように選択され得る。例えば、細菌系における発現は、グリコシル化されていない産物を生成し、酵母における発現は、グリコシル化された産物を生成する。遺伝子産物の一次転写の適切なプロセシング（例えば、グリコシル化、およびリン酸化）のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用され得る。そのような哺乳動物宿主細胞には、ＣＨＯ、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ、Ｈｅｌａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、ＨＥＫ－２９３、３Ｔ３、ＷＩ３８、ＮＳＯ、具体的には、例えば、ＳＫ－Ｎ－ＡＳ、ＳＫ－Ｎ－ＦＩ、ＳＫ－Ｎ－ＤＺヒト神経芽細胞腫（Ｓｕｇｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．７３：５１－５７）、ＳＫ－Ｎ－ＳＨヒト神経芽細胞腫（Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９８２，７０４：４５０－４６０）、Ｄａｏｙヒト小脳髄芽細胞腫（Ｈｅ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：１１４４－１１４８）ＤＢＴＲＧ－０５ＭＧ神経膠芽腫細胞（Ｋｒｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２８Ａ：６０９－６１４）、ＩＭＲ－３２ヒト神経芽細胞腫（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９７０，３０：２１１０－２１１８）、１３２１ Ｎ１ヒト星状細胞腫（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９７７，７４：４８１６）、ＭＯＧ－Ｇ－ＣＣＭヒト星状細胞腫（Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，１９８４，４９：２６９）、Ｕ８７ＭＧヒト神経膠芽腫－星状細胞腫（Ａｃｔａ Ｐａｔｈｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｓｃａｎｄ．，１９６８，７４：４６５－４８６）、Ａ１７２ヒト神経膠芽腫（Ｏｌｏｐａｄｅ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：２５２３－２５２９）、Ｃ６ラットグリオーマ細胞（Ｂｅｎｄａ ｅｔ ａｌ．，１９６８，Ｓｃｉｅｎｃｅ １６１：３７０－３７１）、Ｎｅｕｒｏ－２ａマウス神経芽細胞腫（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９７０，６５：１２９－１３６）、ＮＢ４１Ａ３マウス神経芽細胞腫（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９６２，４８：１１８４－１１９０）、ＳＣＰヒツジ脈絡叢（Ｂｏｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ４８：２１１－２２１）、Ｇ３５５－５、ＰＧ－４ネコ正常星状細胞（Ｈａａｐａｌａ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５３：８２７－８３３）、Ｍｐｆフェレット脳（Ｔｒｏｗｂｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ １８：９５２－９６０）のような神経細胞株、ならびに、例えば、ＣＴＸ ＴＮＡ２ラット正常皮質脳（Ｒａｄａｎｙ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６４６７－６４７１）（例えば、ＣＲＬ７０３０およびＨｓ５７８Ｂｓｔ等）のような正常細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、異なるベクター／宿主発現系は、プロセシング反応を異なる程度まで生じ得る。

【０１７９】

長期にわたる高収率の組換えタンパク質生成のために、安定な発現が好ましい場合がある。例えば、本発明の修飾された重鎖および軽鎖を安定的に発現する細胞株（例えば、抗体または融合タンパク質）が遺伝子操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用する代わりに、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）および選択可能なマーカーにより制御されたＤＮＡで形質転換され得る。外来ＤＮＡの導入に続いて、遺伝子操作された細胞を富化培地中で１～２日間増殖させ、次いで、選択培地に置き換える。組換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を与えること、および細胞がプラスミドをその細胞の染色体に安定に組込み、その後にクローン化して細胞株へ広げ得る細胞増殖巣を形成するまで増殖することを可能にする。

【０１８０】
多くの選択系が使用され得、これらには、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９７７，Ｃｅｌｌ　１１：２２３）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ　＆　Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，１９６２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８：２０２６）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ　２２：８１７）の遺伝子が挙げられるが、これらに限定されず、これらはそれぞれ、ｔｋ－、ｈｇｐｒｔ－、またはａｐｒｔ－細胞において使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性が、メトトレキサートに対する耐性を与えるｄｈｆｒ遺伝子（Ｗｉｇｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８０，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５６７、Ｏ'Ｈａｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７）；ミコフェノール酸に対する耐性を与えるｇｐｔ遺伝子（Ｍｕｌｌｉｇａｎ　＆　Ｂｅｒｇ，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２）；アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与えるｎｅｏ遺伝子（Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１）；およびハイグロマイシンに対する耐性を与えるｈｙｇｒｏ遺伝子（Ｓａｎｔｅｒｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｇｅｎｅ　３０：１４７）についての選択の基礎として使用され得る。

【０１８１】
重鎖および軽鎖の同時発現
本発明によるヘテロ二量体対の免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、上述のように、哺乳動物細胞において同時発現され得る。一実施形態において、１つの重鎖は、重鎖が２つの軽鎖のうちの１つと優先的に対合する場合、上述のように、ＬＣＣＡ設計セットにおいて２つの異なる軽鎖と同時発現される。別の実施形態において、２つの重鎖は、各重鎖が２つの軽鎖のうちの１つと優先的に対合する場合、２つの異なる軽鎖と同時発現される。

【０１８２】
ヘテロ二量体対の試験
上述のように、本発明によるヘテロ二量体対の少なくとも１つのヘテロ二量体は、ヘテロ二量体対の２つの重鎖および２つの軽鎖が哺乳動物細胞において同時発現されるとき、第１のヘテロ二量体の重鎖が、軽鎖のうちの一方と、他方よりも優先的に対合するように、それらの免疫グロブリン重鎖および／または免疫グロブリン軽鎖への１つ以上のアミノ酸修飾を含み得る。同様に、第２のヘテロ二量体の重鎖は、第１ではなく、第２の軽鎖と優先的に対合する。優先的対合の程度は、例えば、下述の方法を用いることにより評価され得る。ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体のそれぞれの抗原に対する親和性は、下述のように試験され得る。ヘテロ二量体対の各ヘテロ二量体の熱安定性もまた、下述のように試験され得る。

【０１８３】
優先的対合を試験する方法
ＬＣＣＡ
一実施形態において、免疫グロブリン重鎖と軽鎖の間の優先的対合は、軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）を行うことにより決定される。２０１３年１０月３日に出願された共同特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０６３３０６は、ＬＣＣＡの様々な実施形態を記載し、すべての目的において参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。本方法は、同時発現させたタンパク質の混合物内で重鎖と特定の軽鎖との対合の定量的分析を可能にし、重鎖および軽鎖が同時発現されるときに、１つの特定の免疫グロブリン重鎖が２つの免疫グロブリン軽鎖のうちのいずれか１つと選択的に会合するかどうかを判定するために使用され得る。本方法は、以下のように簡潔に記載される：少なくとも１つの重鎖および２つの異なる軽鎖は、重鎖が対合を制約する反応物質であるような比で細胞において同時発現され、本方法は、任意で、分泌タンパク質を細胞から分離することと、重鎖に結合する免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドを分泌タンパク質の残りから分離し、単離された重鎖

と対合した画分を生成することと、単離された重鎖画分においてそれぞれの異なる軽鎖の量を検出することと、単離された重鎖画分においてそれぞれの異なる軽鎖の相対量を分析して、少なくとも１つの重鎖の、軽鎖のうちの１つと選択的に対合する能力を判定することと、を含む。

【０１８４】

本方法は、適正なスループットを提供し、強固（すなわち、ユーザまたは流量等の、操作時の微小変化に対して非感受性である）かつ正確である。本方法は、タンパク質配列におけるわずかな変動の影響を測定することができる感受性アッセイを提供する。大きな表面積にわたる無差別なタンパク質－タンパク質、ドメイン－ドメイン、鎖－鎖の相互作用は、通常、選択性を導入するために、複数の突然変異（スワップ）を必要とする。タンパク質産物は、単離されたり、精製されたりする必要がなく、このことは、より効率的なスクリーニングを可能にする。本方法の実施形態に関するさらなる詳細は、実施例において記載されている。

【０１８５】

優先的対合を判定するための代替方法

優先的対合を検出するための代替方法は、ＬＣ－ＭＳ（液体クロマトグラフィー質量分析）を用いて、それぞれの異なる種を特定するためにそれらの分子量の差を用いて、それぞれの軽鎖を含む相対的なヘテロ二量体集団を定量化することを含む。また、抗原活性アッセイを用いて、それぞれの軽鎖を含む相対的なヘテロ二量体集団を定量化し、それにより、（対照と比較して）測定された結合の程度を用いて、それぞれの相対的なヘテロ二量体集団を推定し得る。

【０１８６】

ＳＭＣＡ等のさらなる方法が、実施例、図、および表において記載されている。

【０１８７】

熱安定性

ヘテロ二量体の熱安定性は、当該技術分野で知られている方法に従って決定され得る。それぞれのヘテロ二量体の融解温度は、その熱安定性を示す。ヘテロ二量体の融点は、示差走査熱量測定等の技術を用いて測定され得る（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ（２００３）Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ ２０：１９５２－６０、Ｇｈｉｒｌａｎｄｏ ｅｔ ａｌ（１９９９）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ６８：４７－５２）。代替として、ヘテロ二量体の熱安定性は、円偏光二色性を用いて測定され得る（Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｓｃｉ ４０：３４３－９）。

【０１８８】

抗原に対する親和性

ヘテロ二量体の、それらのそれぞれの抗原に対する結合親和性および相互作用のオフ速度は、当該技術分野でよく知られている方法に従って競合結合アッセイにより決定することができる。競合結合アッセイの一例は、増加する量の非標識抗原の存在下での、対象となる分子（例えば、本発明のヘテロ二量体）との標識抗原、例えば、３Ｈまたは１２５Ｉのインキュベーション、および標識リガンドに結合する分子の検出を含むラジオイムノアッセイである。抗原に対する本発明のヘテロ二量体の親和性および結合オフ速度は、Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析による飽和データから決定することができる。

【０１８９】

本発明によるヘテロ二量体の動的パラメーターはまた、当該技術分野で知られている表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）ベースのアッセイ（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ動的分析）であり得る。ＳＰＲベースの技術の総説については、Ｍｕｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２：７７－９１、Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，８２：３０３－２３、Ｆｉｖａｓｈ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：９７－１０１、Ｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １１：５４－６１を参照のこと。さらに、米国

特許第６，３７３，５７７号、同第６，２８９，２８６号、同第５，３２２，７９８号、同第５，３４１，２１５号、同第６，２６８，１２５号に記載されているタンパク質－タンパク質の相互作用を測定するためのＳＰＲ装置およびＳＰＲベースの方法のうちのいずれかは、本発明の方法において企図される。当該技術分野で知られているように、ＦＡＣＳもまた、測定された親和性に使用することができる。

【０１９０】

薬学的組成物

本発明はまた、本明細書に記載されるヘテロ二量体またはヘテロ二量体対を含む薬学的組成物も提供する。そのような組成物は、治療有効量のヘテロ二量体またはヘテロ二量体対、および薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態において、「薬学的に許容される」という用語は、動物、およびより具体的にはヒトにおける使用について、連邦もしくは州政府によって承認されているか、または米国薬局方もしくは他の広く認識される薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等といった、石油、動物、植物、または合成起源のものを含む、水および油等の滅菌の液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内投与されるときに、好ましい担体である。生理食塩溶液ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体担体として用いることもできる。好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。組成物は、所望に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはｐＨ緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤等の形態をとり得る。組成物は、トリグリセリド等の従来的な結合剤および担体とともに、坐剤として製剤化され得る。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含み得る。好適な薬学的担体の例は、"Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ"ｂｙ　Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎに記載されている。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態をもたらすように、好適な量の担体とともに、好ましくは精製された形態で治療有効量の化合物を含有するであろう。製剤は、投与方法に適したものでなければならない。

【０１９１】

ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体またはヘテロ二量体対を含む組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合される薬学的組成物として、日常的な手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるためのリグノカイン等の局所麻酔薬も含み得る。一般に、成分は、別々に、または単位剤形で一緒に混合して、のいずれかで、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたは小袋のような密封容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物を注入により投与すべき場合、これを、滅菌した医薬品グレードの水または食塩水の入った注入ボトルにより分注され得る。組成物を注射により投与する場合、成分を投与前に混合することができるように注射用の滅菌水または食塩水のアンプルが提供され得る。

【０１９２】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、中性または塩形態として製剤化される。薬学的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するもののようなアニオンにより形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するもののようなカチオンにより形成されるものが含まれる。

【０１９３】
治療用タンパク質の異常な発現および／または活性と関連する疾患または障害の治療、阻害、および予防に有効であろう本明細書に記載される組成物の量は、標準的な臨床技法によって決定することができる。加えて、インビトロアッセイを任意で用いて、最適な投薬量範囲の特定に役立ててもよい。製剤中に用いられる適切な用量は、投与の経路、および疾患または障害の重症度により異なり、施術者の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデルの試験システムから導出された用量応答曲線から推定される。
【０１９４】
ヘテロ二量体対の使用
上述のように、本発明によるヘテロ二量体対は、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体を含むことができ、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖は、既知の治療抗体または分子と結合する既知の抗体に由来するか、または遺伝子操作される。このようにして、これらの抗体に由来するか、または遺伝子操作されるヘテロ二量体は、既知の治療抗体または既知の抗体を使用し得る同じ疾患、障害、または感染の治療または予防のために使用され得ることが企図される。
【０１９５】
このようにして、一実施形態において、癌および関連障害の治療および／または予防のために使用することができる治療抗体に由来する重鎖および軽鎖を有するヘテロ二量体を含む本発明によるヘテロ二量体対はまた、癌および関連障害の治療および／または予防のためにも使用することができる。
【０１９６】
別の実施形態において、対象における炎症性障害の症状を予防、治療、または管理するために使用することができる治療抗体に由来する重鎖および軽鎖を有するヘテロ二量体を含む本発明によるヘテロ二量体対はまた、対象における炎症性障害の症状を予防、治療、または管理するためにも使用することができる。
【０１９７】
別の実施形態において、対象における自己免疫疾患または炎症性疾患の治療または予防のために使用することができる治療抗体に由来する重鎖および軽鎖を有するヘテロ二量体を含む本発明によるヘテロ二量体対はまた、対象における自己免疫疾患または炎症性疾患の治療または予防のためにも使用することができる。
【０１９８】
別の実施形態において、対象における感染性疾患の治療または予防のために使用することができる治療抗体に由来する重鎖および軽鎖を有するヘテロ二量体を含む本発明によるヘテロ二量体対はまた、対象における感染性疾患の治療または予防のためにも使用することができる。
【０１９９】
別の実施形態において、対象における血管疾患の治療のために使用することができる治療抗体に由来する重鎖および軽鎖を有するヘテロ二量体を含む本発明によるヘテロ二量体対はまた、対象における血管疾患の治療のためにも使用することができる。
【０２００】
別の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対はまた、癌、自己免疫疾患、炎症性障害、または感染性疾患の治療または予防のために当該技術分野で知られている他の治療剤と組み合わせて有利に使用され得る。特定の実施形態において、本発明によるヘテロ二量体対は、例えば、分子と相互作用し、免疫応答を増加させるエフェクター細胞の数または活性を増加させる働きをする、モノクローナルもしくはキメラ抗体、リンホカイン、または造血成長因子（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－３、およびＩＬ－７等）と組み合わせて使用され得る。本発明によるヘテロ二量体対はまた、例えば、抗癌剤、抗炎症剤、または抗ウイルス剤等の疾患、障害、または感染を治療するために使用される１つ以上の薬物と組み合わせて有利に使用され得る。

【０２０１】
キット
本発明は、１つ以上のヘテロ二量体対を含むキットをさらに提供する。本キットの個々の成分は、別個の容器に包装され得、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関により定められた形式の通知が、そのような容器に付属され得、この通知は、製造、使用、または販売の政府機関による承認を反映する。本キットは、任意で、ヘテロ二量体対についての使用方法または投与レジメンを概説する取扱説明書または指示書を含んでもよい。
【０２０２】
本キットの１つ以上の成分が、溶液、例えば、水溶液、または滅菌水溶液として提供されるとき、この容器はそれ自体が、吸入器、シリンジ、ピペット、点眼器、またはその他類似の装置であり得、これらから溶液が対象に投与され得るか、または本キットの他の成分に適用されて、混合され得る。
【０２０３】
本キットの成分はまた、乾燥または凍結乾燥された形態でも提供され得、本キットは、凍結乾燥された成分の再構成のための好適な溶媒をさらに含み得る。容器の数または種類に関わらず、本発明のキットはまた、患者への組成物の投与を補助する器具を含んでもよい。そのような器具は、吸入器、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーン、点眼器、または同様の医学的に承認された送達媒体であり得る。
【０２０４】
コンピュータ実装
一実施形態において、コンピュータは、チップセットに連結された少なくとも１つのプロセッサを備える。また、チップセットには、メモリ、記憶装置、キーボード、グラフィックスアダプタ、ポインティングデバイス、およびネットワークアダプタが連結されている。ディスプレーは、グラフィックスアダプタに連結されている。一実施形態において、チップセットの機能性は、メモリコントローラハブおよびＩ／Ｏコントローラハブにより提供される。別の実施形態において、メモリは、チップセットの代わりにプロセッサに直接連結されている。
【０２０５】
記憶装置は、データを保持することができる任意のデバイス、例えば、ハードドライブ、コンパクトディスク読み取り専用メモリ（ＣＤ－ＲＯＭ）、ＤＶＤ、またはソリッドステート記憶装置である。メモリは、プロセッサにより使用される命令およびデータを保持する。ポインティングデバイスは、マウス、トラックボール、または他のタイプのポインティングデバイスであり得、データをコンピュータシステムに入力するためにキーボードと組み合わせて使用される。グラフィックスアダプタは、画像および他の情報をディスプレー上に表示する。ネットワークアダプタは、コンピュータシステムをローカルまたはワイドエリアネットワークに連結する。
【０２０６】
当該技術分野で知られているように、コンピュータは、前述のものとは異なるおよび／または他のコンポーネントを有することができる。加えて、コンピュータは、特定のコンポーネントを欠くこともあり得る。さらに、記憶装置は、コンピュータからローカルおよび／または遠隔的であることもできる（例えば、記憶エリアネットワーク（ＳＡＮ）内に具現化される等）。
【０２０７】
当該技術分野で知られているように、コンピュータは、本明細書に記載される機能性を提供するためにコンピュータプログラムモジュールを実行するように適合されている。本明細書で使用される、「モジュール」という用語は、指定された機能性を提供するために使用されるコンピュータプラグラム論理を指す。したがって、モジュールは、ハードウェア、ファームウェア、および／またはソフトウェアに実装され得る。一実施形態において、プログラムモジュールは、記憶装置上に記録され、メモリにロードされ、プロセッサに

より実行される。

【０２０８】

本明細書に記載される実施例および実施形態は、例示的な目的のためであり、それらを考慮して、様々な修正または変更が、当業者に示唆され、本出願の主旨および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれることが理解される。

【実施例】

【０２０９】

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の例である。本実施例は、例示目的で提供され、本発明の範囲を決して限定するようには意図されない。使用される数（例えば、量、温度等）に関する正確性を確実にするための努力がなされてきたが、ある程度の実験的誤差および偏差は、当然ながら許容されるべきである。

【０２１０】

本発明の実践は、特に指示がない限り、当該技術分野の範囲内の、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術、および薬理学の従来の方法を採用する。そのような技術は、文献において十分に説明される。例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）、Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）、Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照のこと。

【０２１１】

実施例１：Ｄ３Ｈ４４ ＩｇＧ重鎖およびＤ３Ｈ４４ ＩｇＧ軽鎖をコードする構築物の調製

本明細書に記載される同時発現セットで用いる抗組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４の野生型重鎖および軽鎖は、以下の通りに調製された。Ｄ３Ｈ４４ Ｆａｂ軽鎖配列（ＡＪ３０８０８７．１）および重鎖配列（ＡＪ３０８０８６．１）は、ＧｅｎＢａｎｋから得られ（表Ａ、Ａ１、およびＡ２）、哺乳動物発現のために、遺伝子を合成し、コドン最適化した。５'－ＥｃｏＲＩ切断部位－ＨＬＡ－Ａシグナルペプチド－ＨＡまたはＦＬＡＧタグ-軽鎖Ｉｇクローン－「ＴＧＡストップ」－ＢａｍＨ１切断部位－３'からなる軽鎖ベクターの挿入断片は、ｐＴＴ５ベクターに連結された（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ Ｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００２；３０，Ｎｏ．２ ｅ９）。得られたベクター＋挿入断片はまた、コードＤＮＡの正しいリーディングフレームおよび配列を確認するために配列決定された。同様に、５'－ＥｃｏＲＩ切断部位－ＨＬＡ－Ａシグナルペプチド－重鎖クローン（Ｔ２３８で終結する、表Ａ１を参照）-ＡＢＤ$_2$－Ｈｉｓ$_6$タグ-ＴＧＡストップ－ＢａｍＨ１切断部位－３'からなる重鎖ベクターの挿入断片は、ｐＴＴ５ベクター（ＡＢＤ；アルブミン結合ドメイン）に連結された。得られたベクター＋挿入断片はまた、コードＤＮＡの正しいリーディングフレームおよび配列を確認するために配列決定された。様々なＤ３Ｈ４４構築物を、遺伝子合成または部位特異的突然変異誘発のいずれかにより生成した（Ｂｒａｍａｎ Ｊ，Ｐａｐｗｏｒｔｈ Ｃ ＆ Ｇｒｅｅｎｅｒ Ａ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９６） ５７：３１－４４）。

【０２１２】

重鎖および軽鎖はそれぞれ、競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニングにより優先的対合の評価を促進するために、ＣおよびＮ末端でタグ付けした。ＡＢＤ$_2$－Ｈｉｓ$_6$重鎖タグは

、ＨＣ－ＬＣ複合体を抗ＨｉｓタグＳＰＲチップ表面上に捕捉させ、一方、ＦＬＡＧおよびＨＡ軽鎖タグは、相対的なＬＣ１およびＬＣ２集団を定量化した。

【０２１３】

実施例２：Ｄ３Ｈ４４　ＩｇＧ軽鎖および／または重鎖において可変ドメイン修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価

修飾されたV_Lおよび／またはV_Hドメインを有するＤ３Ｈ４４重鎖および軽鎖を含む同時発現セットにおいて優先的に対合するヘテロ二量体の能力を決定し、結果を図１に示す。図１に提供される結果は、予備的なものであり、結果のより完全なセットは、以下に提供する。図１～３に示されるアミノ酸修飾は、Ｄ３Ｈ４４重鎖およびＤ３Ｈ４４軽鎖のアミノ酸配列に関して特定された。表Ａ、Ａ１、およびＡ２を参照。

【０２１４】

１つのＤ３Ｈ４４重鎖構築物は、２つの固有のＤ３Ｈ４４軽鎖構築物と同時発現させ、相対的軽鎖対合の特異性（例えば、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２）は、競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニング（図１中「競合アッセイのスクリーニング結果」と表題のついた列）から決定された。Ｌ１：Ｌ２のＤＮＡ比は、トランスフェクション時に、４０：６０、５０：５０、および６０：４０に変化させ、選択されたヘテロ二量体ヒットは、軽鎖競合アッセイの検証により確認された（図１中「競合アッセイの検証結果」と表題のついた列）。重鎖は、競合アッセイスクリーニングおよび検証の両方において定量限界（すなわち、ＨＣ＜Ｌ１＋Ｌ２）を維持した。アッセイの設計を表す概略図を図８に示す。

【０２１５】

本方法は、次のように実行した。軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）は、１つの重鎖の、少なくとも２つの固有の軽鎖に対する相対的対合を定量化する。アッセイおよび前のステップを以下のように要約し得る：１．制限された量である重鎖、および軽鎖の、同時に起こる発現（例えば、ＨＣ：ＬＣ１：ＬＣ２＝１：１：１）、２．Ｈｉｓタグのプルダウンを介して重鎖をＳＰＲチップに結合させることにより達成される、ＨＣ－ＬＣ複合体の単離、および３．相対的ＨＣ－ＬＣ集団の定量化（すなわち、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２）。ＳＰＲ形式において、固有の軽鎖をタグ付けした集団に特異的な抗体を定量化のために使用した。注記：このアッセイは、Ｈ－Ｌジスルフィドを用いてまたは用いずに実行され得る。本方法を示す概略図を図９に示す。

【０２１６】

トランスフェクション方法

実施例１に記載されたように調製された１つの重鎖および２つの軽鎖構築物を含む同時発現セットを、以下のようにＣＨＯ－３Ｅ７細胞にトランスフェクトした。ＣＨＯ－３Ｅ７細胞は、１．７～２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で、４ｍＭのグルタミンおよび０．１％Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号２４０４０－０３２）を補充したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）Ｆ１７培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号Ａ－１３８３５０１）中で、３７℃で培養した。２ｍｌの全体積に対し、１：２．５のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｐｒｏ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓカタログ番号１１５－０１０）を用いて合計２ｕｇのＤＮＡをトランスフェクトした。ＤＮＡ－ＰＥＩ混合物を添加してから２４時間後に、細胞を３２℃に移した。上清を、７日目に、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により発現について試験し、続いて、クマシーブルー染色により、バンドを可視化した。ＨＣ：ＬＣの比は表７に示される通りである。

【０２１７】

（表７）

HC:L1:L2の比	実験	トランスフェクションに使用されたDNA量(ng)			
		HC	LC1	LC2	Stuffer^ DNA
1:1:1	競合アッセイスクリーニング	333	333	333	1000
1:1:1	競合アッセイの検証	333	333	333	1000
1:0.8:1.2	競合アッセイの検証	333	266	400	1000
1:1:1	競合アッセイの検証	333	333	333	1000
1:1.2:0.8	競合アッセイの検証	333	400	266	1000

^Ｓｔｕｆｆｅｒ　ＤＮＡ：ＤＮＡ挿入しないｐＴＴ５ベクター

【０２１８】

競合アッセイＳＰＲ方法

同時発現セットにおけるＤ３Ｈ４４重鎖への優先的なＤ３Ｈ４４軽鎖対合の程度は、各軽鎖のＮ末端に位置する固有のエピトープタグのＳＰＲベースの読み出しを用いて評価した。

【０２１９】

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）用供給物。ＧＬＭセンサーチップ、Ｂｉｏｒａｄ　ＰｒｏｔｅＯｎアミンカップリングキット（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（ｓＮＨＳ）、およびエタノールアミン）、および１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃａｎａｄａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ）から購入した。組換えＨｅｒ－２タンパク質は、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から購入した。４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、およびＮａＣｌは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｏａｋｖｉｌｌｅ，ＯＮ）からから購入した。１０％　Ｔｗｅｅｎ２０溶液は、Ｔｅｋｎｏｖａ（Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）から購入した。

【０２２０】

ＳＰＲバイオセンサーアッセイ。すべての表面プラズモン共鳴アッセイを、２５℃の温度で、ＰＢＳＴ泳動緩衝液（ＰＢＳ　Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む）を用いるＢｉｏＲａｄ　ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃａｎａｄａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ））を用いて実行した。抗ペンタＨｉｓ捕捉表面を、分析物（水平）方向に１００μＬ／分で１４０秒間注入された標準ＢｉｏＲａｄ　ｓＮＨＳ／ＥＤＣ溶液の１：５希釈液により活性化されたＧＬＭセンサーチップを用いて生成した。活性化の直後、１０ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ４．５中の抗ペンタＨｉｓ抗体（Ｑｉａｇｅｎ　Ｉｎｃ．）の２５μｇ／ｍＬの溶液を、およそ３０００共鳴単位（ＲＵ）が固定されるまで、２５μＬ／分の流量で分析物（垂直）方向に注入した。分析物方向に１００μＬ／分で１Ｍのエタノールアミン

の１４０秒間の注入により、残りの活性基を反応停止処理し、これはまた、モックでの活性化されたインタースポットがブランク参照のために作製されることを確保するものである。

【０２２１】

抗ＦＬＡＧ（Ｓｉｇｍａ　Ｉｎｃ．）および抗ＨＡ（Ｒｏｃｈｅ　Ｉｎｃ．）のモノクローナル抗体と結合するためにヘテロ二量体のスクリーニングは、リガンド方向に抗ペンタＨｉｓ表面上にヘテロ二量体の間接的捕捉、続いて、分析物方向に抗ＦＬＡＧおよび抗ＨＡの注入の２つのステップにおいて行われた。まず、リガンド方向に１００ｕＬ／分で３０秒間の緩衝液の１回の注入を用いて、ベースラインを安定させた。各ヘテロ二量体の捕捉のために、細胞培養培地中の未精製のヘテロ二量体を、ＰＢＳＴ中で４％まで希釈した。１～５つのヘテロ二量体または対照（すなわち、１００％　ＨＡ－軽鎖または１００％　ＦＬＡＧ－軽鎖のいずれかを含む対照）を、個々のリガンドチャネル中に２５μＬ／分の流量で２４０秒間同時に注入した。これにより、抗ペンタＨｉｓ表面上におよそ３００～４００ＲＵの飽和ヘテロ二量体が捕捉された。第１のリガンドチャネルは、必要に応じて、ブランク対照として使用するためにブランクのままにした。このヘテロ二量体捕捉ステップの直後に、緩衝液を2回、分析物方向に注入してベースラインを安定させ、５ｎＭ　抗ＦＬＡＧおよび５ｎＭ　抗ＨＡをそれぞれ、５０μＬ／分で１２０秒間二重に注入し、１８０秒の解離相をおいて、結果として、捕捉されたヘテロ二量体の各々に対して緩衝液参照により一連の結合センサーグラムが得られた。可能であれば、ヘテロ二量体が結合する抗原はまた、活性対照として最後に残りの分析物チャネル上に注入され得る。ヘテロ二量体を、０．８５％リン酸の１８秒間隔のパルスで１００μＬ／分で１８秒間再生成し、次の注入サイクル用に抗ペンタＨｉｓ表面を調製した。緩衝液ブランクの注入およびインタースポットを用いて、センサーグラムをアラインし、二重参照して、結果として得られたセンサーグラムを、ＰｒｏｔｅＯｎ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェアｖ３．０を使用して分析した。

【０２２２】

Ｌ１とＬ２の総パーセンテージは、理論的には、合計１００％になるべきである。実際には、いくつかの変異体において、Ｌ１とＬ２の総量が、合計して１００％より著しく低くなることが観察された。軽鎖の総パーセンテージのこの相違は、ＳＰＲチップ上での初期ヘテロ二量体捕捉中に、一部分において、可変の非特異的結合が発生したことによるものであると考えられる。

【０２２３】

実施例３：Ｄ３Ｈ４４　ＩｇＧ軽鎖および／または重鎖中の定常（C_LまたはC_{H1}）ドメイン修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価

修飾されたC_Lおよび／またはC_{H1}ドメインを有するＤ３Ｈ４４重鎖および軽鎖を含む同時発現セットにおける優先的に対合するヘテロ二量体の能力は、実施例２において可変ドメイン修飾を有するヘテロ二量体について記載されたように決定され、その結果を図２に示す。１つのＤ３Ｈ４４重鎖構築物は、２つの固有のＤ３Ｈ４４軽鎖構築物と同時発現され、相対的な軽鎖の対合特異性（例えば、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２）を、競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニングから決定した（図２中「競合アッセイのスクリーニング結果」と表題のついた列）。Ｌ１：Ｌ２のＤＮＡ比は、トランスフェクション時に、４０：６０、５０：５０、および６０：４０に変化させ、選択されたヘテロ二量体ヒットは、修飾された競合アッセイの検証により確認された（図２中「競合アッセイの検証結果」と表題のついた列）。実施例２に記載されたように、重鎖は、競合アッセイスクリーニングおよび検証の両方において定量限界（すなわち、ＨＣ＜Ｌ１＋Ｌ２）を維持した。実施例２に記載されたように、優先的対合の評価を行った。

【０２２４】

実施例４：生物物理学的特徴付けのためのスケールアップ

対合および誤対合の両方の選択されたヘテロ二量体は、熱安定性および抗原結合に関して試験するために、スケールアップされ（典型的には、５０ｍｌまで）、以下のように精

製された。図３に示されるように、ヘテロ二量体ＨＤ１００－ＨＤ１１５を、発現および精製した。各ヘテロ二量体の重鎖および軽鎖を、上述の培養条件下で、ＣＨＯ－３Ｅ７細胞の５０ｍｌの培養物中で発現させた。細胞を遠心分離し、ヘテロ二量体を、下述のようにニッケルをチャージしたＦｒａｃｔｏｇｅｌカラム上に上清を負荷することにより精製した。

【０２２５】

ニッケル（Ｈｉｓ）をチャージしたＦｒａｃｔｏｇｅｌカラム上での精製

ニッケルによるカラムのチャージ：５カラム体積（ＣＶ）の０．５Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ調節なし）、続いて、４ＣＶ　２００ｍＭの$NiCl_2$（ニッケル）、および２ＣＶの０．５Ｍ　ＮａＣｌ　ｐＨ５．０による順次洗浄。試料の負荷および溶出：１０ＣＶ　ＰＢＳによりカラムを平衡化する。試料を負荷し、１０ＣＶの洗浄緩衝液＃１（５０ｍＭ　リン酸ナトリウム　ｐＨ７．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ）、続いて、１０ＣＶの洗浄緩衝液＃２（５０ｍＭ　リン酸ナトリウム　ｐＨ７．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭ　イミダゾール）で洗浄し、カラムに生じた不純物を除去する。ヘテロ二量体を、洗浄緩衝液＃１＋３００ｍＭ　イミダゾールに溶出した。各画分のタンパク質含有量を、Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイにより試験した。タンパク質を含む画分をプールした。次いで、実施例５に記載されるように、精製したヘテロ二量体を、抗原結合および熱安定性についてアッセイした。

【０２２６】

実施例５：ヘテロ二量体の熱安定性および抗原親和性測定

選択されたヘテロ二量体対の熱安定性および抗原親和性を測定し、これらの特性を野生型の未修飾の重鎖－軽鎖対のものと比較した。同時発現から正しく対合および誤対合されたヘテロ二量体を、個々にスケールアップし、精製し（すなわち、Ｈｉｓタグ親和性精製）、下述のように、熱安定性および抗原結合について評価した。結果を図３に示す。

【０２２７】

熱安定性の測定

選択されたヘテロ二量体対の熱安定性を、以下のように、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）を用いて測定した。

【０２２８】

実施例３に記載されたように各ヘテロ二量体を精製し、ＰＢＳ中、０．２ｍｇ／ｍＬまで希釈し、ＶＰ－キャピラリーＤＳＣ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、ＤＳＣ分析のために、合計４００μＬを使用した。各ＤＳＣ起動の開始時に、緩衝液ブランクの注入を5回行いベースラインを安定させ、参照用の各ヘテロ二量体注入前には、緩衝液注入を設定した。各試料を、６０℃／時の速度で２０～１００℃、低フィードバックの、８秒間のフィルター、５分間のｐｒｅＴｓｔａｔ、および７０ｐｓｉの窒素圧で走査した。結果として得られたサーモグラムを参照し、Ｏｒｉｇｉｎ７ソフトウェアを使用して分析した。

【０２２９】

試験したヘテロ二量体についての熱変性曲線を図４に示す。結果は、正しく対合されたヘテロ二量体（設計観点から）は、通常、対象とする誤対合されたヘテロ二量体（例えば、ＨＤ１０７対ＨＤ１０８）よりも著しく安定していることを示す。加えて、正しく対合されたヘテロ二量体の多くは、野生型Ｆａｂ（例えば、ＨＤ１１４）に近い熱安定性を示す。

【０２３０】

抗原親和性の測定

抗原（組織因子細胞外ドメイン）に対するヘテロ二量体対の親和性を、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイを用いて測定した。すべての表面プラズモン共鳴アッセイを、２５℃の温度で、ＰＢＳＴ泳動緩衝液（ＰＢＳ　Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む）を用いるＢｉｏＲａｄ　ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃａｎａｄａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇ

ａ，ＯＮ））を用いて実行した。精製した組織因子（ＴＦ）表面を、リガンド（垂直）方向に１００μＬ／分で１４０秒間注入された標準ＢｉｏＲａｄ　ｓＮＨＳ／ＥＤＣ溶液の１：１０希釈液により活性化されたＧＬＭセンサーチップを用いて生成した。活性化の直後、１０ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ４．５中のＴＦの２５μｇ／ｍＬの溶液を、およそ１０００共鳴単位（ＲＵ）が固定される（または６０ｎＭ　ＦＡＢを流出するとき、１００ＲＵの最大応答として十分である）まで、２５μＬ／分の流量でリガンド方向に注入した。残りの活性基を、分析物方向に１００μＬ／分で１Ｍ　エタノールアミンの１４０秒の注入により反応停止処理した。各注入系列については、水平方向に緩衝液ブランクを2回注入することが、精製したヘテロ二量体に先行した。緩衝液ブランク対照を用いた各ヘテロ二量体（６０ｎＭ、２０ｎＭ、６．７ｎＭ、２．２ｎＭ）の３倍希釈系列を、５０μＬ／分で１２０秒間同時に注入し、２０分間の解離をおいて、結果として、ヘテロ二量体の各々に対して緩衝液参照を伴う一連の結合センサーグラムが得られた。ＳＰＲ表面上のヘテロ二量体：ＴＦ複合体を、０．８５％リン酸の１８秒間隔のパルスで１００μＬ／分で１８秒間再生成し、次の注入サイクル用にＴＦ表面を調製した。緩衝液ブランクの注入およびインタースポットを用いて、センサーグラムをアラインし、二重参照して、結果として得られたセンサーグラムを、ＰｒｏｔｅＯｎ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェアｖ３．０内で１：１の結合モデルを使用して分析した。

【０２３１】

結果は、正しく対合されたヘテロ二量体（設計観点から）が、抗原に対する様々な範囲の親和性を示し、抗原（例えば、ＨＤ１０７およびＨＤ１１４）に対して野生型様結合親和性を示すいくつかの設計があることを示す。

【０２３２】

実施例６：タグ付けされた野生型Ｄ３Ｈ４４ヘテロ二量体のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）プロファイルおよび個々の優先的に対合されたヘテロ二量体の代表的な試料

重鎖上にＣ末端ＡＢＤ２－Ｈｉｓ$_6$タグおよび軽鎖上にＮ末端ＦＬＡＧタグを有する野生型Ｄ３Ｈ４４ヘテロ二量体（１つの重鎖および１つの軽鎖）を、当該技術分野で知られている方法および実施例１および４に記載されたものと同様の方法に従って、発現および精製した。同時発現セットから優先的にまたは正しく対合されたヘテロ二量体（図３に示されるヘテロ二量体ＨＤ１００、ＨＤ１０５、およびＨＤ１０７）を、実施例４およびＳＥＣに記載されたように、個々にスケールアップし、Ｈｉｓタグ親和性精製により精製した。

【０２３３】

ＳＥＣは、以下のように実行した。ヘテロ二量体試料を、Ｐｈａｒｍａｃｉａ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）　ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒシステム上に取り付けたＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　ＨＲ　１０／３０　Ｐｈａｒｍａｃｉａ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラムを用いて分離した。ＰＢＳ中のヘテロ二量体試料（０．３～０．５ｍｌ）を、ＰＢＳを充填した０．５ｍｌループに、手動で負荷した。試料をカラム上に自動注入し、０．５ｍｌ／分で、１ＣＶ　溶出体積で分離した。タンパク質溶出をOD_{280}でモニタリングし、１ｍｌ画分で収集した。

【０２３４】

図５に示されるように、正しく対合されたヘテロ二量体は、アミノ酸修飾を伴わない野生型ヘテロ二量体において観察されるものに近いＳＥＣプロファイルを示した（主要ピーク［＊］：ヘテロ二量体）。野生型ヘテロ二量体の軽鎖がＮ末端ＨＡタグを有するとき、同等の結果を得た。

【０２３５】

実施例７：ヘテロ二量体の安定性に関するさらなるデータ

表８に示される設計は、改善されたＨＣ－ＬＣの選択性を有する設計推進の組み合わせに関して強調したものである。

【０２３６】

（表８）

設計	セット番号	セット番号	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
11	C525	C526	S188L_V190Y	V133S	F174V_P175S_S188G	S176L
12	V042	V043	V37E_F100D	L89R_F98W	WT	WT
13	C532	C533	L143A_D144G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R
14			D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q124R_Q160K_T178R
15	C530	C531	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R

【０２３７】

残基番号付けは、Ｋａｂａｔの命名（Ｋａｂａｔ Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ）に従う。

【０２３８】

表９に示されるように、設計の大部分は、野生型様熱安定性（Ｔｍ）およびＴＦ結合親和性を保有した。

【０２３９】

（表９）

設計	Tm (°C)		TF結合 KD (nM)		H1の読み出し		H2の読み出し	
	H1-L1 Tm	H2-L2 Tm	H1-L1	H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L2	H2-L1
11	74.7	73.3	0.043	0.040	83	24	98	1
12	76.2	76.0		0.052	99	10	88	15
13	67.5	71.5	0.087	0.086	104	1	87	14
14					84	1	74	2
15	70.1	76.3	0.082	0.071	93	1	83	24

【０２４０】

設計１２は、野生型Ｈ２－Ｌ２の対合を含む（表８を参照）。結果として、Ｈ２－Ｌ２Ｆａｂは、野生型結合親和性を保持する。野生型抗ＴＦ　Ｄ３Ｈ４４　ＦａｂのＴｍ＝約７６℃（データは示さず）。

【０２４１】

実施例８：さらなるヘテロ二量体および同様の試験

表１０に記載されるように、さらなるヘテロ二量体対を調製し、試験した。これらのヘテロ二量体は、Ｆａｂホットスポット範囲を増大させるように設計された。

【０２４２】

（表１０）

設計	H1_突然変異*	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
26	A141G_V185A	L135W	A141W_K147Y_Q175E	F116A_S131K_L135A
27	A141I_K147T_D148G_Q175E_S183G_V185S	F116A_V133G_S176F_T178A	S181K_S183H_V185G	F118W_Q124E_V133S_S176A_T178S_T180E
28	A141V_K147L_Q175E_S183G_V185S	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	A141W_S181K_S183A	F118W_V133S_S176A_T180E
29	L145K_D148G	Q124E_V133D	L145E_K147T	Q124R
30	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E	L145E_K147T	Q160K_T178R
31	Q39D_A141G_V185A	Q38R_L135W	Q39R_A141W	Q38D_F116A_L135A
32	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E_F98W

【０２４３】

＊表１０の残基番号付けは、Ｄ３Ｈ４４　Ｆａｂ（ＰＤＢ　ＩＤ＝１ＪＰＴ［Ｆａｅｌｂｅｒ　Ｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００１）３１３：８３－９７］、ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／ｐｄｂ／ｅｘｐｌｏｒｅ／ｅｘｐｌｏｒｅ．ｄｏ？ｓｔｒｕｃｔｕｒｅＩｄ＝１ＪＰＴ）の結晶構造における残基のために使用される表現法に従う。

【０２４４】

実施例５に記載されたように、これらのヘテロ二量体についての安定性、標的と結合する能力、および選択的対合する能力を決定し、表１１に示す。

【０２４５】

（表１１）

設計	Tm (°C)		TF 結合 KD (nM)		H1 の読み出し		H2 の読み出し	
	H1-L1 Tm	H2-L2 Tm	H1-L1	H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L2	H2-L1
26	67.8	73.6			92	1	106	1
27	71.0				67	1	85	12
28					85	4	94	1
29	64.1	68.3			93	1	102	1
30	67.0	75.5	0.024	0.060	96	1	102	1
31	74.3		0.025		106	1	78	1
32					98	1	93	1

【０２４６】

野生型抗ＴＦ　Ｄ３Ｈ４４　ＦａｂのＫＤ＝０．０５２ｎＭ、野生型抗ＴＦ　ＦａｂのＴｍ＝約７６℃

【０２４７】

実施例９：さらなるヘテロ二量体

以下のヘテロ二量体対もまた調製され、選択的に対合するそれらの能力について試験された。

【０２４８】

（表１２）

設計	領域	設計戦略	重鎖１	軽鎖１	重鎖２	軽鎖２
ZW #1	可変	立体的	Q39R	Q38E	V37W	F98A
ZW #2	可変	組み合わせ	-	F98W	V37W	F98A
ZW #3	可変	組み合わせ	Q39R	Q38E	V37W_Q39E	Q38R_F98A
ZW #4	可変	組み合わせ	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
ZW #5	可変	組み合わせ	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W107F	Q38E_F98L
ZW #6	定常	静電気的	D148G_Q175R	Q124E_Q160E_T178D	K147T_Q175D_S183L	Q160K_T178R
ZW #7	定常	静電気的	L145K_D148G	Q124E_V133D	L145E_K147T	Q124R
ZW #8	定常	静電気的	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E	L145E_K147T	Q124R_Q160K_T178R
ZW #9	定常	静電気的	K147L_Q175E	S131K	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E
ZW #10	定常	静電気的	S181R	Q124E_Q160E_T178D	K147L_Q175E	S131K

【０２４９】

表１２の残基番号付けは、Ｄ３Ｈ４４　Ｆａｂ（ＰＤＢ　ＩＤ＝１ＪＰＴ［Ｆａｅｌｂｅｒ　Ｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００１）３１３：８３－９７］、ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／ｐｄｂ／ｅｘｐｌｏｒｅ／ｅｘｐｌｏｒｅ．ｄｏ？ｓｔｒｕｃｔｕｒｅＩｄ＝１ＪＰＴ）の結晶構造における残基のために使用される表現法に従う。

【０２５０】

（表１３）

設計	**H1**_突然変異	**L1**_突然変異	**H2**_突然変異	**L2**_突然変異
4691	S181R	Q124E_Q160E_T180E	K147L_Q175E	S131K
4686	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E	L145E_K147T	Q124R_Q160K_T178R
5838	Q39E_S181R	Q38R_Q124E_Q160E_T180E	Q39R_K147L_Q175E	Q38E_S131K
5826	Q39E_S181R	Q38R_Q160E_T180E	Q39R_K147T_Q175E	Q38E_S131K

設計	**H1**_突然変異	**L1**_突然変異	**H2**_突然変異	**L2**_突然変異
設計 1	L145K_D148G	Q124E_V133D	L145E_K147T	Q124R
設計 2	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E	L145E_K147T	Q124R_Q160K_T178R
設計 3	S181R	Q124E_Q160E_T178D	K147L_Q175E	S131K
	K147L_Q175E	S131K	D148G_Q175K	Q124E_Q160E_T180E
設計 4	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
設計 5	Q39R	Q38E	V37W_Q39E	Q38R_F98A
設計 6	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W107F	Q38E_F98L

【０２５１】
表１３の残基番号付けは、Ｄ３Ｈ４４　Ｆａｂ（ＰＤＢ　ＩＤ＝１ＪＰＴ［Ｆａｅｌｂｅｒ　Ｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２００１）３１３：８３－９７］、ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／ｐｄｂ／ｅｘｐｌｏｒｅ／ｅｘｐｌｏｒｅ．ｄｏ？ｓｔｒｕｃｔｕｒｅＩｄ＝１ＪＰＴ）の結晶構造における残基のために使用される表現法に従う。

【０２５２】
実施例１０：Ｄ３Ｈ４４重鎖および軽鎖のＦａｂ形式において定常ドメインおよび／または可変ドメイン修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価
図１および２に示されるものに加えて同時発現セットを設計した。実施例１に記載されたように、同時発現セットの設計に従ってアミノ酸修飾を含むＦａｂ形式においてＤ３Ｈ４４　ＩｇＧ重鎖および軽鎖をコードする構築物を調製した。実施例２および３に記載されたように、Ｄ３Ｈ４４重鎖および軽鎖Ｆａｂ対の優先的に対合する能力を評価した。実施例５に記載されたように、設計の安定性および結合親和性を決定した。表１４および１５に示される結果は、累積的なものであり、新しい設計に加えて図１および２に示される設計における結果を示す。これらの表に示されるアミノ酸修飾は、Ｄ３Ｈ４４重鎖およびＤ３Ｈ４４軽鎖のアミノ酸配列に関して特定される。表Ａ、Ａ１、およびＡ２を参照。

【０２５３】
本出願において「設計」または「設計セット」は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、およびＬ２鎖上の一連の突然変異に関することに留意すべきである。「ＬＣＣＡ設計」は、Ｈ１、Ｌ１、およびＬ２における一連の突然変異を指す。

【０２５４】
Ｈ１、Ｌ１、およびＬ２突然変異の各固有のセット（ＬＣＣＡ形式）には、固有の番号、またはいわゆる「固有の識別名」が割り当てられた。データがＨ１　Ｌ１　Ｈ２　Ｌ２の形式（Ｆａｂ対形式またはＳＭＣＡ）で示されるとき、そのような設計セットは、したがって、構成要素である２つのＬＣＣＡに対する固有の識別名からなる「固有の識別名セット」で示される（例えば、１－２）。Ｄ３Ｈ４４　ＬＣＣＡデータセットに特徴付けられた設計を、まず割り当てた。このセット中に存在するが、異なる均質なまたは混合したシステムデータ、または／および異なる形式（ＭＣＡ）で存在する設計は、加えて、＊で表す。固有の識別名を割り当てるこの実行において、多くの表の自動処理により、いくつかの冗長性が生じる。Ｄ３Ｈ４４以外のシステムにおいて異なるＷＴアミノ酸が同じ位置を占める場合：３０９＊＝３１９＊＝４７、３１６＊＝１０１、３１７＊＝１８３、３１８＊＝１８２、３１０＊＝４８、３１１＊＝１０２、３２３＊＝１８０、３２４＊＝１７９。ＬＣ／ＭＳのためにさらなる突然変異が組み込まれた場合：４４２＊＝３２６＊、および４４３＊＝２３。

【０２５５】
ＬＣＣＡ実験の大部分が定常ドメイン（Ｈ／Ｃ２３３Ｓ－Ｌ／Ｃ２１４Ｓ）に位置する鎖間Ｆａｂジスルフィド結合（複数を含む）を欠いている構築物で行われたことに留意されたい。

【０２５６】
表１４には、５５％：４５％（Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１）またはそれ以上の正しい対合特異性を示す設計が提供される。優先的対合に関して特定の設計の成功を強調するために、２つの相補的なＬＣＣＡセット（Ｈ１、Ｌ１、Ｌ２、およびＨ２、Ｌ２、Ｌ１）が対のＦａｂ形式において示される。

【０２５７】
タグ（Ｌ：ＨＡおよびＦＬＡＧならびにＨ：ＡＢＤ２）の存在は、Ｄ３Ｈ４４　ＷＴに対して約５０％：５０％の予測された中立的な対合に影響を及ぼさない（これは、実際の設計における対合の結果によりさらに支持され、そのため、タグ情報は、この表に含まれない）。

【０２５８】
表には、関連Ｆａｂ種の測定された量（Ｈ１－Ｌ１、Ｈ１－Ｌ２、およびＨ２－Ｌ２、

Ｈ２－Ｌ１のもの）が、比の形式（Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１）で含まれた。大抵の場合、いくつかのＬＣＣＡの実験の繰り返しが行われた（スクリーニングおよび検証）。中央値Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１に対する正規化された比の形式（すなわち、Ｈ１－Ｌ１およびＨ１－Ｌ２の合計が１００％）における合計欄もまた、提供される。

【０２５９】

データは、熱安定性データ（Ｔｍ）および抗原親和性（表のバケット内で、「ＴＦ」の表記は、組織因子親和性について使用される）のカテゴリー：

Ｔｍ１（ｘ＝＞７１℃）、Ｔｍ２（７１℃＞ｘ＝＞６６℃）、Ｔｍ３（６６℃＞ｘ）に従ってクラスター化された。Ｔｍ３のカテゴリーはまた、ＮＤ（実験は実施されず）の事例も含む。

【０２６０】

参考までに、Ｄ３Ｈ４４　ＷＴ　Ｆａｂ（ジスルフィド結合せず）のＴｍは、約７６℃である。

【０２６１】

ＴＦ１（ｘ＝＜ＷＴの中央値の５倍のＫＤ）と、ＴＦ２（５＜ｘ＝＜ＷＴの中央値の２０倍のＫＤ）と、ｘ＞ＷＴの中央値の２０倍のＫＤである事例、そしてＮＢ事例（結合せず：ＫＤが５００ｎＭ超の場合、これはＷＴの中央値の約１００００倍のＫＤである）を含むその他のカテゴリーとは、別々に表示された。この最後のカテゴリーはまた、ＮＤの事例（実験は実施されず）も含む。

【０２６２】

参考までに、Ｄ３Ｈ４４のＷＴ　Ｆａｂの中央値ＫＤは、０．０６ｎＭ（０．１の範囲）である。

【０２６３】

注記：抗原親和性および熱安定性を指す表の欄において、実施された実験数が１を超えた場合（ｎ＞１）、範囲（最小－最大の読み出し）が示される。

【０２６４】

それぞれのバケット内で、設計は、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２の対合特異性、続いて、Ｈ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１のものが高い順に順序付けされている。

【０２６５】

表内の読み出しバケットカテゴリーの一例：

・Ｔｍ１のみ（Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２の両方のＴｍがＴｍ１カテゴリーに属する）

・Ｔｍ１／Ｔｍ２（Ｈ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２のＴｍがＴｍ１に属し、その他がＴｍ２カテゴリーに属する）

・同じ論理は「ＴＦ」カテゴリーにも適用される。

【０２６６】

さらなるＬＣＣＡの結果のセット（表１５）はまた、Ｆａｂ対形式で表され、さらなる設計サイクル後に得られたものは、別々の表に含まれる。このデータセットは、対合特異性が減少していく順に配置され、熱安定性に関して若干制限されたデータを含む。

【０２６７】

表１４および１５の結果は、コンピュータによる設計アプローチが、設計の多様なセットおよびそれらの変動にわたって、Ｈ１－Ｌ２を上回るＨ１－Ｌ１の優先的対合およびＨ２－Ｌ１を上回るＨ２－Ｌ２の優先的対合の達成をもたらしたことを示す。これらの設計は、概して、２つの主なカテゴリー：静電気的（水素結合または電荷－電荷相互作用を使用する、特異性をもたらす部分に基づいた）および立体的相補性に分類された。そのような対合の特異性は、両方のＬＣＣＡ設計において中程度から約１００％の適切な対合の範囲に及んだ。表からの証拠として、これらの設計の中には、熱安定性（Ｔｍ）または抗原結合親和性に影響を与えなかったものもあり、これらの２つの特性に様々な程度の影響を示したものもあった。さらに、成功した設計が、定常および可変ドメインの両方、ならびにドメイン設計の組み合わせ形式において存在した。

【０２６８】
実施例１１：混合Ａｂまたは純粋なＡｂの重鎖および軽鎖Ｆａｂ形式において定常ドメインおよび／または可変ドメイン修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価
前述の実施例に記載されるある種の設計は、同時発現セットの設計がこれらのタイプの系における優先的対合をもたらすかどうかを評価するために、ヘテロ二量体対が異なるＡｂ（Ｄ３Ｈ４４と比較して）または２つの異なる抗体に由来した場合の系において試験された。多くの異なる系が試験された。一例において、あるヘテロ二量体対は、Ｆａｂ形式においてＤ３Ｈ４４の重鎖および軽鎖に由来し、第２のヘテロ二量体対は、Ｆａｂ形式においてペルツズマブの重鎖および軽鎖に由来した。別の例において、あるヘテロ二量体対は、Ｆａｂ形式においてＤ３Ｈ４４の重鎖および軽鎖に由来し、第２のヘテロ二量体対は、Ｆａｂ形式においてトラスツズマブの重鎖および軽鎖に由来した。
【０２６９】
同時発現セットの設計に従ってアミノ酸修飾を含むＦａｂ形式においてＤ３Ｈ４４のＩｇＧ、ペルツズマブ、およびトラスツズマブの重鎖および軽鎖をコードする構築物を、実施例１に記載されたように調製した。ペルツズマブの重鎖の塩基ＤＮＡ配列、ペルツズマブの軽鎖の塩基ＤＮＡ配列、トラスツズマブの重鎖の塩基ＤＮＡ配列、およびトラスツズマブの軽鎖の塩基ＤＮＡ配列を表Ａ、Ａ１、およびＡ２に示す。アミノ酸修飾は、部位特異的突然変異誘発によりこれらの配列に導入されたか、または実施例１に記載されたように、塩基配列に由来するアミノ酸修飾を含む、ＤＮＡ配列が合成された。
【０２７０】
混合された系を試験したとき、採用された絶対的ではない鎖が異なるＦａｂに属したという事実を除いては、実施例２および３に記載されたように、ヘテロ二量体設計の優先的に対合する能力が評価された。
【０２７１】
結果を表１６に示す。表１６に示されるアミノ酸修飾は、Ｄ３Ｈ４４の重鎖およびＤ３Ｈ４４の軽鎖、ペルツズマブの重鎖およびペルツズマブの軽鎖、トラスツズマブの重鎖およびトラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列に関して特定される。表Ａ、Ａ１、およびＡ２を参照。
【０２７２】
Ｄ３Ｈ４４系において成功した優先的対合を示した代表的かつ多様な設計のサブセットが、異なる系（トラスツズマブ（ＴＲＡＳ）およびペルツズマブ（ＰＥＲＴ）、ならびに混合系（Ｄ３Ｈ４４／ＴＲＡＳ、Ｄ３Ｈ４４／ＰＥＲＴ、およびＴＲＡＳ／ＰＥＲＴ）（Ｄ３Ｈ４４のＬＣＣＡと同様に、構築物がＦａｂジスルフィドを欠いている）において試験された。
【０２７３】
データは、ＬＣＣＡ（表１６）およびＦａｂ対形式（表１７）の両方において示される。ＬＣＣＡデータは、最小の「競合単位」（すなわち、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２）を反映し、ＬＣＣＡ設計がＦａｂにわたってうまく移動することができるかどうかを解釈するために最適な形式である。第２のＦａｂ対（すなわち、Ｈ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１）を含むＦａｂ対形式における分析は、これらの異なるＦａｂ系における設計全体（すなわち、Ｈ１－Ｌ１およびＨ２－Ｌ２）への移動度およびその有効性をさらに示した。Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２の比とは別に、不適切な対合と比較して適切な対合の相対的傾向をスカラーとして示す。なお、スカラー＝ｌｎ（Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２）である。
【０２７４】
混合系のいくつかにおいて、特有の交差系の対合優先性（例えば、Ｈ＿Ｄ３Ｈ４４が、Ｌ＿Ｄ３Ｈ４４よりもＬ＿ＰＥＲＴと優先的に対合する）が観察された（表１７）。同じ例において、Ｈ＿Ｄ３Ｈ４４とＬ＿ＰＥＲＴとの優先的対合はまた、Ｈ＿Ｄ３Ｈ４４－Ｌ＿ＰＥＲＴ種がＨ＿Ｄ３Ｈ４４－Ｌ＿Ｄ３Ｈ４４よりも安定していたことを示した熱安定性の測定（Ｔｍ）により支持された。したがって、測定された実際の種を報告するととも

に、それぞれのＷＴ　ＬＣＣＡ系（ＲＥＦ）の挙動に対する正規化データは、Δスカラー（ＶＡＲ－ＲＥＦ＿ＷＴ）の形態で示される。なお、Δスカラー＝ｌｎ（Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２／Ｈ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１）である。この計量は、ＬＣＣＡ設計の実際の効率の指標である。表内に含まれるデータは、５５％：４５％またはそれ以上の対合特異性（すなわち、Δスカラー（ＶＡＲ－ＲＥＦ＿ＷＴ）＞０．２）と等価であった設計を含む。

【０２７５】

Ｄ３Ｈ４４系とは異なって、ある種の比は、ＷＴ　ＰＥＲＴのみおよびＷＴ　ＴＲＡＳ（より少ない程度まで）系において軽鎖タグにより影響を受ける場合があるように思われる（表１８）。これは、タグが対合の障害になっているというよりむしろ、ＨＡタグ切断によるランダム事象によるものであるように思われる（系がＭａｂ形式において試験されるときにはＬＣ／ＭＳの証拠が利用できる）。したがって、関連する表における結果を示すときには、タグを考慮した。

【０２７６】

ＬＣＣＡおよびＦａｂ対形式の両方における結果の要約を、表１９および２０に報告する。結果は、設計が、異なる試験したＦａｂ系にわたって移動可能であることを示す。これらの結果は、設計の一部が他よりも良好であることを必ずしも反映せず、また、より総合的な推定される移動可能性も反映しない。表１９に示される、２つ以上のシステムにおける成功したＬＣＣＡ設計（例えば、中央値Δスカラー（ＶＡＲ－ＲＥＦ＿ＷＴ）＞０．２）は、これらの異なる系において、試験したＬＣＣＡ設計の約３０％を構成する。これは、特定の系および設計による移動可能性を示す。このようにして、固有の一連の設計を有することにより、多くの系に関して二重特異性対の作製を可能にし、関心対象の任意の抗体（または抗体対）との関連において評価され得る設計セットのライブラリーの有用性を強調する。この実施例は、突然変異／設計セットを用いて、混合Ａｂまたは純粋なＡｂの重鎖および軽鎖Ｆａｂ形式において定常ドメインおよび／または可変ドメイン修飾を含む同時発現セットにおいてヘテロ二量体の優先的対合を達成することができることを示す。

【０２７７】

実施例１２：Ｄ３Ｈ４４の重鎖および軽鎖の完全長重鎖（Ｍａｂ）形式において、定常ドメインおよび／または可変ドメイン修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価

ヘテロ二量体の同時発現セットの設計は、重鎖が完全長重鎖でありＦａｂ部分ではない形式（Ｍａｂ形式）において、それらもまた、優先的に対合することができるかどうかを判定するために評価された。

【０２７８】

構築物の調製：

同時発現セットの設計に従ってアミノ酸修飾を含むＤ３Ｈ４４のＩｇＧの重鎖および軽鎖をコードする構築物を、以下のように調製した。実施例１に記載されたように、Ｄ３Ｈ４４のＦａｂ軽鎖構築物を調製した。完全長Ｄ３Ｈ４４重鎖が、Ｄ３Ｈ４４のＦａｂ重鎖のＣ末端上にヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３ドメインをコードするＩｇＧ１＊０１のＤＮＡ配列を加えることにより作製されたことを除き、実施例１に記載されたようにＤ３Ｈ４４の重鎖配列を調製した。ただし、Ｃ末端リジンのクリッピングによるＬＣ－ＭＳシグナルの不均質を防ぐために、標準的なＣ末端重鎖リジン残基を除去した（Ｌａｗｒｅｎｃｅ　Ｗ．Ｄｉｃｋ　Ｊｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．（２００８）１００：１１３２－４３）。

【０２７９】

Ｍａｂアッセイ形式

Ｄ３Ｈ４４の重鎖および軽鎖の優先的に対合する能力を、以下のように評価した：ある完全長Ｄ３Ｈ４４の重鎖構築物が、２つの固有のＤ３Ｈ４４の軽鎖構築物と同時発現されて、３つの可能な抗体種：Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ１、Ｈ１－Ｌ２：Ｈ１－Ｌ２、およびＨ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２を得た（図１０を参照）。好ましいＨ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ１種対そ

の他について、量の観点での相対的な軽鎖の対合特異性を、プロテインＡ（ｐＡ）での精製後にＬＣ－ＭＳを用いて決定した。可能であれば鎖はタグ付けされないままであり、３つの可能なＭａｂ種が、互いに少なくとも５０Ｄａ異なる３つの鎖の同時発現から生じるものとした。質量差がこの可能性を妨げる場合には、種間の十分な質量の差別化を提供するために、軽鎖のうちの少なくとも１つは、Ｎ末端ＨＡまたはＦＬＡＧタグ融合で構成された。実施例２に記載されたように、重鎖は、定量限界（すなわち、ＨＣ＜Ｌ１＋Ｌ２）を維持した。

【０２８０】

Ｍａｂアッセイ形式におけるトランスフェクション方法

実施例１２に記載されたように調製された、１つの重鎖および２つの軽鎖構築物を含む同時発現セットを、以下のようにＣＨＯ－３Ｅ７細胞にトランスフェクトした。ＣＨＯ－３Ｅ７細胞は、１．７～２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で、４ｍＭのグルタミンおよび０．１％　Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号２４０４０－０３２）を補充したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）Ｆ１７培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号Ａ－１３８３５０１）中で、３７℃で培養した。５０ｍｌの全体積に対し、１：２．５のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｐｒｏ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓカタログ番号１１５－０１０）を用いて合計５０ｕｇのＤＮＡをトランスフェクトした。ＤＮＡ－ＰＥＩ混合物を添加してから２４時間後に、細胞を３２℃に移した。上清を、７日目に、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により発現について試験し、続いて、クマシーブルー染色により、バンドを可視化した。使用されたＨＣ：Ｌ１：Ｌ２の比は、１：１：１であった。

【０２８１】

Ｍａｂアッセイ形式における質量分析

同時発現セットにおけるＤ３Ｈ４４の重鎖への優先的なＤ３Ｈ４４の軽鎖の対合の程度を、プロテインＡでの精製および脱グリコシル化後、質量分析を用いて評価した。精製した試料を以下のようにＰＮＧａｓｅＦで脱グリコシル化した：５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０中、０．２Ｕ　ＰＮＧａｓｅＦ／μｇの抗体を、３７℃で一晩インキュベートし、最終タンパク質濃度は、０．４５ｍｇ／ｍＬであった。タンパク質試料は、高流量エレクトロスプレーインターフェイスを介してＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ＸＬハイブリッド質量分析計（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に連結したＡｇｉｌｅｎｔ　１１００　ＨＰＬＣ系を用いるＬＣ－ＭＳにより分析した。試料（２．５μｇ）を、２．１×１０ｍｍのＰｏｒｏｓ　Ｒ２カラム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上に注入し、勾配条件：０～３分：２０％　溶媒Ｂ、３～６分：２０～９０％　溶媒Ｂを用いて溶出した。溶媒Ａは、０．１％　ギ酸水溶液であり、溶媒Ｂは、６５％　ＡＣＮ、２５％　ＴＨＦ、９．９％　ｄｄＨ$_{2}$Ｏ、０．１％　ギ酸であった。流量は、１ｍＬ／分であった。エレクトロスプレーインターフェイスに１００μＬ／分で誘導するために、この流れはカラム後に分離された。カラムおよび溶媒を、８０℃まで加熱して、タンパク質のピーク形状を改善した。ＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ＸＬを、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＬＴＱ　Ｐｏｓｉｔｉｖｅ　Ｉｏｎ　ＥＳＩキャリブレーション溶液（カフェイン、ＭＲＦＡ　ａｎｄ　Ｕｌｔｒａｍａｒｋ　１６２１）を用いて較正し、１０ｍｇ／ｍＬのＣｓＩ溶液を用いて最適化した。コーン電圧（源のフラグメンテーション設定）は４０Ｖであり、ＦＴ解像度は７，５００であり、走査範囲は、ｍ／ｚ　４００～４，０００であった。

【０２８２】

タンパク質スペクトルは、ＭａｓｓＬｙｎｘ装置の制御およびデータ分析アルゴリズムであるＭａｘＥｎｔモジュール（Ｗａｔｅｒｓ）を用いてデコンボリューションした。簡潔に言えば、タンパク質ＬＣ－ＭＳの生データを、第１に、Ｘｃａｌｉｂｕｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）のスペクトル表示モジュールであるＱｕａｌＢｒｏｗｅｒにおいて開き、Ｗａｔｅｒｓにより提供されたファイル変換プログラムであるＤａｔａｂｒｉｄｇｅを用いてＭａｓｓＬｙｎｘと互換性があるように変換した。変換されたタンパク質スペクトルをＭａｓｓＬｙｎｘのスペクトルモジュールにおいて表示し、ＭａｘＥｎ

ｔを用いてデコンボリューションした。それぞれの試料における異なる抗体種の存在度は、結果として得られた分子量プロファイルから直接判定した。

【０２８３】

結果を表２１に示す。表２１に示されるアミノ酸修飾は、Ｄ３Ｈ４４の重鎖およびＤ３Ｈ４４の軽鎖のアミノ酸配列に関して特定される。表Ａ、Ａ１、およびＡ２を参照。

【０２８４】

多様な設計セットの代表でもあるＤ３Ｈ４４系において成功した優先的対合を示した設計のサブセットは、形式の移動可能性、すなわち、Ｆａｂ構造を有するＬＣＣＡからの移動可能性について、Ｍａｂ構造に基づくＭａｂ競合アッセイ（ＭＣＡ）の評価のために選択された。

【０２８５】

表２１に示されるように、Ｍａｂ競合アッセイに用いられるＤ３Ｈ４４　ＷＴは、５０％のＨ１－Ｌ１＿Ｈ１－Ｌ２およびそれぞれ２５％のＨ１－Ｌ１＿Ｈ１－Ｌ１およびＨ１－Ｌ２＿Ｈ１－Ｌ２である予測された理論的な種の分布からの逸脱を示し、ここで軽鎖は、タグ（ＨＡまたはＦＬＡＧ）の存在または非存在により区別される。この逸脱は、タグに依存した対合というよりむしろタグに依存した発現レベルの結果である可能性が高い（例えば、異なるＷＴ　Ｈ１：Ｌ１：Ｌ２比で実施された実験、ならびに設計挙動に基づいた間接的観察に基づいた）。実験の繰り返しおよび／またはタグ識別により異なる変異体にわたる、すべての測定された種についての中央値も含まれた。

【０２８６】

所与の設計を含む２つの成功したＭａｂアッセイ変異体（図１１）のＬＣ／ＭＳスペクトルの一例は、図１２に見出される。これらの変異体の場合、測定された種の大部分は、望ましいＨ１－Ｌ１＿Ｈ１－Ｌ１種に相当した。発現プロファイル、ＵＰＬＣ－ＳＥＣ（Ｈ２－Ｌ２＿Ｈ２－Ｌ２種（Ｈ２－Ｌ２として示される図において）に対してのみ示される）、および図１３に報告されるＤＳＣサーモグラムは、ある特定のヒットにおいて実行される変異体の特徴付けの典型である。この特定の場合において、これらは、Ｆａｂの安定性に比較的わずかな影響を有する十分に発現された均質な種を示した。

【０２８７】

表２１中の結果は、ＬＣＣＡ設計の中から、Ｍａｂ形式への移動可能性が、顕著な成功を伴って達成されたことを示す。試験された１２個のＬＣＣＡ設計のうちの１１個は、正しく対合した種の理論値２５％と等しいかまたはそれ以上を示した。このデータは、設計ライブラリーの初期スクリーニングとして使用されるＬＣＣＡ形式が、Ｍａｂ形式における設計の成功の評価および／または予測に適していることを示す。

【０２８８】

実施例１３：二重特異性抗体形式において定常ドメインおよび／または可変ドメインの修飾を含む同時発現セットにおけるヘテロ二量体の優先的対合の評価

ヘテロ二量体の同時発現セット設計は、二重特異性Ｍａｂ抗体形式においても優先的対合を可能にさせるかどうかを判定するために評価された。この実施例において、それぞれのヘテロ二量体の完全長重鎖のＦｃ領域を、非対称に修飾して、ホモ二量体化と比較して固有の重鎖のヘテロ二量体化を促進した。

【０２８９】

構築物の調製：

ヘテロ二量体の同時発現セット設計は、以下の二重特異性抗体の状況：ａ）Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブ、ｂ）Ｄ３Ｈ４４／トラスツズマブ、ｃ）Ｄ３Ｈ４４／ラムシルマブ、およびｄ）トラスツズマブ／ラムシルマブで試験した。相補的なＦｃヘテロ二量体化突然変異が同時発現設計セットのそれぞれ２つの重鎖に導入されたことを除き、定常および／または可変ドメインにおいてアミノ酸修飾を含むＤ３Ｈ４４、ペルツズマブ、およびトラスツズマブの重鎖および軽鎖は、実施例１２に記載されたように調製された。ラムシルマブの重鎖および軽鎖は、ラムシルマブの重鎖および軽鎖の塩基ＤＮＡ配列に基づいて調製された。表Ａを参照のこと。重鎖のＣＨ３配列には、アミノ酸修飾：

ａ）Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブ：鎖Ａ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｔ３８９Ｌ＿Ｋ４２０Ｌ＿Ｔ４２２Ｗ、鎖Ｂ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｌ３７２Ｙ＿Ｆ４３６Ａ＿Ｙ４３８Ｖ
ｂ）Ｄ３Ｈ４４／トラスツズマブ：鎖Ａ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｔ３８９Ｌ＿Ｋ４２０Ｌ＿Ｔ４２２Ｗ、鎖Ｂ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｌ３７２Ｙ＿Ｆ４３６Ａ＿Ｙ４３８Ｖ
ｃ）Ｄ３Ｈ４４／ラムシルマブ：鎖Ａ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｔ３８９Ｌ＿Ｋ４２０Ｌ＿Ｔ４２２Ｗ、鎖Ｂ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｌ３７２Ｙ＿Ｆ４３６Ａ＿Ｙ４３８Ｖ
ｄ）トラスツズマブ／ラムシルマブ：鎖Ａ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｔ３８９Ｌ＿Ｋ４２０Ｌ＿Ｔ４２２Ｗ、鎖Ｂ：Ｔ３７１Ｖ＿Ｌ３７２Ｙ＿Ｆ４３６Ａ＿Ｙ４３８Ｖ
が含まれた。

【０２９０】

アッセイ形式（ＳＭＣＡ）

優先的に対合するためのヘテロ二量体の同時発現セット設計の二重特異性抗体を形成する能力は、下述のように評価された。このアッセイは、４つの鎖（Ａｂ１から２つおよびＡｂ２から２つ）を同時発現させることと、正しく形成された二重特異性抗体の存在を、質量分析（ＬＣ－ＭＳ）を用いて検出することに基づいている。本アッセイは、次のように実行した。図１４は、４つの出発ポリペプチド鎖と、ヘテロ二量体対の重鎖と軽鎖との間の優先的対合の不在下で、これらの出発ポリペプチド鎖の同時発現から得られる潜在的な産物とを示す概略図を提供する。２つの完全長重鎖構築物は、２つの固有の軽鎖構築物と同時発現され、１０の可能な抗体種：Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ１、Ｈ１－Ｌ２：Ｈ１－Ｌ２、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２、Ｈ２－Ｌ１：Ｈ２－Ｌ１、Ｈ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ２、Ｈ２－Ｌ１：Ｈ２－Ｌ２、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ２－Ｌ１、Ｈ１－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ２、Ｈ１－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１、およびＨ１－Ｌ１：Ｈ２－Ｌ２を得た。後者の種は、正しく対合されたヘテロ二量体である（以下の図を参照）。好ましい種Ｈ１－Ｌ１：Ｈ２－Ｌ２対その他について、量の観点での相対的な対合特異性を、ｐＡでの精製後、ＬＣ－ＭＳを用いて決定した。可能であれば、鎖はタグ付けされないままであり、すべてのＭａｂおよび半Ａｂ種が互いに少なくとも５０Ｄａ異なるものとする。質量差がこの可能性を妨げる場合には、種間の十分な質量の差別化を提供するために、軽鎖のうちの少なくとも１つは、Ｎ末端ＨＡタグ融合で構成された。ＳＭＣＡとして二重特異性抗体の発現およびスクリーニングステップを含むこのアッセイを参照する。

【０２９１】

トランスフェクション方法

実施例１に記載されたように調製された２つの重鎖および２つの軽鎖構築物を含む同時発現セットを、以下のようにＣＨＯ－３Ｅ７細胞にトランスフェクトした。ＣＨＯ－３Ｅ７細胞は、１．７～２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で、４ｍＭのグルタミンおよび０．１％Ｐｌｕｒｏｎｉｃ Ｆ－６８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号２４０４０－０３２）を補充したＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）Ｆ１７培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号Ａ－１３８３５０１）中で、３７℃で培養した。２０ｍｌの全体積に対し、１：２．５のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｐｒｏ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓカタログ番号１１５－０１０）を用いて合計２０ｕｇのＤＮＡをトランスフェクトした。ＤＮＡ－ＰＥＩ混合物を添加してから２４時間後に、細胞を３２℃に移した。上清を、７日目に、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により発現について試験し、続いて、クマシーブルー染色により、バンドを可視化した。使用されたＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２比は、最初に、中立性（１５：１５：３５：３５）を維持して、発現効率を評価した。次いで、一連のＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２のＤＮＡ比を、ＣＨＯ発現において試験して、すべての鎖が野生型であるとき、どの条件（複数を含む）が異なる種の理論的な分布を反映する混合物を生成するかを評価した。これらの比は、２つの異なる抗体の重鎖と軽鎖との間の、発現レベルおよび／または固有の対合の偏りについての自然におこる差を補正する。

【０２９２】

ＳＰＲバイオセンサーアッセイ

ＥＤＣ：１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩、ｓ

ＮＨＳ：Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド、ＳＰＲ：表面プラズモン共鳴、ＥＤＴＡ：エチレンジアミン四酢酸、ＨＥＰＥＳ：４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸、ＴＦ：組織因子。

【０２９３】

ＳＰＲ用供給物。ＧＬＣセンサーチップ、Ｂｉｏｒａｄ ＰｒｏｔｅＯｎアミンカップリングキット（ＥＤＣ、ｓＮＨＳ、およびエタノールアミン）、および１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃａｎａｄａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ）から購入した。組換えＨｅｒ－２タンパク質は、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から購入した。０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳ泳動緩衝液は、Ｔｅｋｎｏｃａ Ｉｎｃ．（Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）から購入した。ヤギポリクローナル抗ヒトＦｃ抗体は、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．（Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）から購入した。

【０２９４】

すべての表面プラズモン共鳴アッセイを、２５℃の温度で、ＰＢＳＴ泳動緩衝液を用いるＢｉｏＲａｄ ＰｒｏｔｅＯｎ ＸＰＲ３６装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｃａｎａｄａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ））を用いて実行した。抗ヒトＦｃ捕捉表面を、分析物（水平）方向に１００μＬ／分で１４０秒間注入された標準ＢｉｏＲａｄ ｓＮＨＳ／ＥＤＣ溶液の１：５希釈液により活性化されたＧＬＣセンサーチップを用いて生成した。活性化の直後、１０ｍＭ ＮａＯＡｃ ｐＨ４．５中の１０ｕｇ／ｍＬの溶液の抗ヒトＦｃ抗体を、およそ３０００共鳴単位（ＲＵ）が固定化されるまで、２５μＬ／分の流量で分析物（垂直）方向に注入した。分析物方向に１００μＬ／分での１Ｍのエタノールアミンの１４０秒間の注入により、残りの活性基を反応停止処理し、これはまた、モックで活性化されたインタースポットがブランク参照のために作製されることを確保するものである。Ｈｅｒ２またはＴＦ抗原標的と結合するための抗体変異体のスクリーニングは、リガンド方向に抗ヒトＦｃ抗体表面上に抗体の間接的捕捉、続いて、分析物方向に二重参照用の５つの濃度の精製された抗原および１つのブランク緩衝液の同時注入、という２つのステップにおいて行われた。まず、リガンド方向に１００ｕＬ／分で３０秒間の緩衝液の１回の注入を用いて、ベースラインを安定させた。それぞれの抗体変異体の捕捉のために、細胞培養培地中の未精製の変異体を、ＰＢＳＴ中で４％まで希釈した。１～５つの変異体または対照を、個々のリガンドチャネル中に２５μＬ／分の流量で２４０秒間同時に注入した。これにより、抗ヒトＦｃ表面上におよそ４００～６００ＲＵの捕捉を得た。第１のリガンドチャネルは、必要に応じて、ブランク対照として使用するために空のままにした。この捕捉ステップの直後に、緩衝液を２回、分析物方向に注入してベースラインを安定させ、ブランク緩衝液とともに、６０ｎＭ、２０ｎＭ、６．７ｎＭ、２．２ｎＭ、および０．７４ｎＭ 抗原（ＴＦまたはＨｅｒ２）を、３００秒の解離相をおいて、５０μＬ／分で１２０秒間同時に注入した。捕捉された抗体表面を、０．８５％リン酸の１８秒間隔のパルスで１００μＬ／分で１８秒間再生成し、次の注入サイクル用に調製した。緩衝液ブランクの注入およびインタースポットを用いて、センサーグラムをアラインし、二重参照して、結果として得られたセンサーグラムを、ＰｒｏｔｅＯｎ Ｍａｎａｇｅｒソフトウェアｖ３．１内で分析した。二重参照したセンサーグラムを、１：１の結合モデルにフィットさせた。それぞれの抗原のＲｍａｘ値を、それぞれの変異体に対する抗体捕捉レベルに正規化し、１００％対照と比較した。

【０２９５】

二重特異性抗体の安定性は、実施例５に記載されたように試験された。二重特異性抗体のＬＣＭＳ分析は、実施例１２に記載される手順を用いて実行された。

【０２９６】

多くの選択されたＤ３Ｈ４４ ＬＣＣＡ設計が、ＳＭＣＡ形式において試験された。さらに、いくつかの設計は、ＳＭＣＡ形式のみにおいて直接評価された。設計の大部分は、Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブ系において試験された。この系において選択された設計のサブ

セット（様々な設計を含む）は、３つのさらなる二重特異性Ｍａｂ系：Ｄ３Ｈ４４／トラスツズマブ、Ｄ３Ｈ４４／ラムシルマブ（ＲＡＭＵ）、およびトラスツズマブ／ラムシルマブ系においてさらに試験された。

【０２９７】

ＬＣＣＡ実験（実施例１１）における、Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブおよびＤ３Ｈ４４／トラスツズマブについて観察された特有の軽鎖／重鎖の交差系の優先性は、完全抗体形式においても再現可能であった。さらに、異なる交差系対合傾向を有していても、同様の挙動がその他の２つの系（表２２）についても観察された。

【０２９８】

所望の二重特異性種Ｈ１－Ｌ１＿Ｈ２－Ｌ２は、概して、誤対合したタイプ：Ｈ１－Ｌ２＿Ｈ２－Ｌ１とは、ＬＣ／ＭＳに基づいて実験的に区別することができない。したがって、二重特異性含量が表に報告されるときに、このタイプの誤対合した種を含まないことは完全には除外され得ない。しかしながら、Ｈ１－Ｌ２＿Ｈ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ１＿Ｈ２－Ｌ１等の種、ならびにＨ１－Ｌ２およびＨ２－Ｌ１の半抗体について観察された非常に低い含量は、二重特異性種の任意の混入物質が生じた場合でも、ごくわずかであったことを示す。ＬＣ／ＭＳにより測定された特定の試料に存在するすべての他の種を表内に含む。ほとんどの場合、ＭＳピークは、サイドピークと同時に起こったが、二重特異性種に対してのみ注釈を付けた。ＭＳピーク強度を正規化するときには、これらの付加物を考慮に入れた。表内のサイドピーク（複数を含む）について表された数は、主な二重特異性ピークについてのものとの強度の比較により得られた。いくつかの予備的な分析は、リーダーペプチドの切断における付加物の形成または不均質性を含む軽鎖タグの存在と相関する場合、サイドピークを示し、それは主なピーク種を代表する可能性が高いことを示した。

【０２９９】

最終的に、誤対合した種に加えて、すべての対合種を合計して、対合：誤対合の列に報告された比を得た。これをさらに使用して、ΔスカラーＶＡＲ－ＲＥＦ＿ＷＴ）を計算し、続いて、実施例１１に記載される数学的アプローチを行って、特定の設計の強度を示した。系内で、スカラー計量の値の高い順に設計を順位付けした。

【０３００】

実施例１２に記載される、軽鎖および重鎖の対合についての交差系の自然におこる優先傾向により、所望の二重特異性種（Ｈ１－Ｌ１＿Ｈ２－Ｌ２）の最高含量を得るには、Ｈ１：Ｌ１：Ｈ２：Ｌ２のＤＮＡ比を変化させること（例えば、Ｈ２（ＰＥＲＴ）を上回るＨ１（Ｄ３Ｈ４４）の過剰発現）を必要とした。最適比はまた、結果として特定の設計に応じてある程度変化し得る。ＤＮＡ比は、主に、二重特異性種：対合した半抗体種（通常、１つのタイプ：Ｈ１－Ｌ１またはＨ２－Ｌ２）の実際の比に影響を及ぼす。一例が表２３に含まれ、この比を伴うＤＮＡの量の設定は変化したが、対合種：誤対合種の全体的な比は、比較的一定であった。

【０３０１】

Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブ系の場合、制限されたＤＮＡセットの量の設定が、設計の大部分に対して行われた。対合：誤対合した種の最高の含量をもたらした比に関するデータを表２２および２４に示す。他の３つの系については、表内に報告されたように、１つの比でのみトランスフェクションを行った。報告された比で実験を繰り返した場合は、平均値を表内に含んだ。タグの影響がＷＴにおいて観察されなかったため、タグ識別に関する情報は含めなかった（表２６）。提供されたＷＴ参照は、報告された設計データの中で最も一般的なＤＮＡ比を代表するように選択された。

【０３０２】

ＬＣ／ＭＳ分析は、ｐＨ４およびｐＨ７で保存された試料において行われた。ｐＨ７で保存された試料での実験は、Ｄ３Ｈ４４／トラスツズマブ、Ｄ３Ｈ４４／ラムシルマブ（ＲＡＭＵ）、およびトラスツズマブ／ラムシルマブ系の場合に試験された。したがって、データは、２つの表に表される（表２２（ｐＨ４）および表２４（ｐＨ７））。十分な相

関が、２つの実験間での対合種：誤対合種の比に関して観察され、これは、ＬＣ／ＭＳ実験において、すなわち、存在する種のタイプの特徴付けにおいて、ｐＨが実質的な役割を果たす可能性が低いことを示した。

【０３０３】

図１５は、ＭＣＡ形式において図１１および図１２に示される設計に基づいてＴＦおよびＨｅｒ２を標的とした二重特異性構築物のＬＣ／ＭＳの分析結果を示す。ほぼ９２％の、絶対的な重鎖および軽鎖の正しい対合を有する好ましい二重特異性抗体が観察された。図１６は、ＳＤＳ　ＰＡＧＥにおける、上清およびプロテインＡでの精製後のタンパク質産物の発現プロファイル、ならびにプロテインＡで精製した化合物のＳＥＣプロファイルを示す。図１７は、初めに、２つの標的（独立して、ＴＦおよびＨｅｒ２）に対し、次いで、サンドイッチ（架橋）モードにおける、二重特異性分子の二重特異的に標的結合する特徴を示す。

【０３０４】

場合によっては、限定された変異体セットにおいて特徴付けられたＨ／Ｓ１１５およびＨ／Ｓ１５６での突然変異は、実際の設計の一部ではなかったが、ＬＣ／ＭＳ実験を目的として必要な質量差を得るための実用的な理由のためにむしろ加えられた。これらのアミノ酸は、実際の突然変異の設計セットから十分に離れて定常ドメインの表面上に位置し、抗体の挙動に影響を及ぼすものとは思われない。

【０３０５】

熱安定性および抗原親和性を、Ｄ３Ｈ４／ペルツズマブ系における多くの設計について評価し、表２５中に表す。Ｔｍ値（斜字体で示される）には、手動で注釈を付けた。ホモ二量体Ｍａｂ対照（ＷＴ）は、（ｐＨ７での）トランスフェクションの繰り返しで発現された産物に対して以下の熱融解（$Ｔ_{m}$）の安定範囲を示した：ＰＥＲＴ（７２．０３－７７．７２）およびＤ３Ｈ４４（７７．９７－７８．８８）。ペルツズマブに観察されたより広い範囲は、その固有の特性による可能性が高い。親和性測定は、ｐＡでの精製後にのみ行われた。ホモ二量体Ｍａｂについて観察されたＫＤ範囲は、ＴＦ：０．０４～０．０７６ｎＭ、ＨＥＲ２：１．８４～６．３ｎＭである。ほとんどの場合、２つのＦａｂについて上述の異なる範囲による２つの融解転移を予測し得る。Ｔｍについて１つの値のみが報告されるという場合には、２つの理由：ペルツズマブの安定性の変動、または／およびペルツズマブのＦａｂでのものと一致し得る、Ｄ３Ｈ４４　Ｆａｂでの設計の不安定さ、のうちの１つにより生じる可能性が高い。結果は、ＳＭＣＡ変異体の選択が、抗原結合だけでなく熱安定性にも最小限に影響を及ぼすものから、温度を変化させるために行うものまでの範囲に及ぶことを示す。

【０３０６】

いくつかの設計は、両方の可能なＦｃ突然変異の配置で試験された。これらは、同じ固有の識別名を有することにより識別可能であり、＊Ｄ３Ｈ４４（または表２５では、＃を前に記載した固有の識別名セット）で示される。表２２から明らかなように、わずかな例外もあるが、Ｆｃ突然変異の配置は、対合種：誤対合種の結果に影響を及ぼさないように思われる。

【０３０７】

ＳＭＣＡの結果は、多様なセットを表す相当数の設計が、Ｍａｂ形式において自然におこる交差対合の傾向を克服し得ることを示す。これらのうち、試験された設計のうちほぼ１／４が、高い対合：誤対合比（＞＝８０：２０）のカテゴリーに分類される（数字は、より徹底的に試験された系のＤ３Ｈ４４／ペルツズマブで提供される）。異なる系にわたる設計の有効性の比較は、移動可能性の程度を変化させることを示す。さらに、表２７に列挙された設計の約６０％は、４つの試験されたＳＭＣＡ系のうちの少なくとも１つにおいて、Ｄ３Ｈ４４　ＬＣＣＡからＳＭＣＡ形式へと移され、高度の優先的対合（＞７５％：２５％）をもたらした。

【０３０８】

Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブ以外の系において試験された設計については、設計の配置は

、結合ドメイン、例えば、Ｄ３Ｈ４４結合ドメインにおけるＨ１－Ｌ１設計、ＴＲＡＳにおけるＨ２－Ｌ２設計、ならびにＴＲＡＳにおけるＨ１－Ｌ１設計およびＤ３Ｈ４４におけるＨ２－Ｌ２設計についても調査された。結果は、事例の大部分において、設計の有効性がそのような反転配置により影響を及ぼされ得ることを示す。

【０３０９】

上で論じられた結果は、設計の移動可能性が、推進可能性のある設計構成要素で結合された抗原結合ドメインの組み合わせによって影響を及ぼされ得ることを示す（例えば、Ｈ１Ｌ１Ｌ２の推進はＨ２Ｌ２Ｌ１よりも良好であり得る）。結果は、多くのベースコア設計が様々な範囲のＭａｂ対にわたって機能し、７５％超の選択的対合を有する二重特異性Ａｂを形成することを示す。

【０３１０】

実施例１４：Ｆａｂ接続部分の分子モデリングおよびコンピュータで誘導された遺伝子操作

他の抗体またはその断片との関連においてスクリーニングし、対象となる抗体における所望の特異性を示す突然変異を特定し得る重鎖および軽鎖の突然変異の設計のライブラリーを生成するために、構造およびコンピュータによる分子モデリングにより誘導されたアプローチを採用した。優先的ＨＣ－ＬＣ対合を遺伝子操作するための設計戦略は、まず、作業に使用する代表的なＡｂ（すなわち、Ｄ３Ｈ４４）を特定することを含んだ。このＡｂの重要な基準を表２８に示す。

【０３１１】

（表２８）

基準	重要性
ヒトまたはヒト化IgG1/κ 一般に使用されるV_HおよびV_Lサブグループを有する 生殖細胞系列に近いフレームワーク Fabについて観察された平均値に近いV_H:V_Lドメイン間のパッキングの角度	類似性
分離および複合Fabに利用可能な構造 抗原を結合する際に観察された主な構造的な変化がない	設計
抗原結合が容易にアッセイされ得る	アッセイ

【０３１２】

表２８に示されるように、この抗体により示される重要な基準は、それがヒト／ヒト化Ａｂであり、一般に使用されるＶＨおよびＶＬのサブグループ、および最小限のフレームワーク領域の突然変異を有したことであった。加えて、構造的に考察されたことは、ＶＨ：ＶＬのドメイン間の角度がＡｂについて観察された平均値に近くなくてはならないことであった。Ｆａｂの選択後、重要な残基を特定し、理解する目的のために、Ｆａｂ接続部分のコンピュータ内での分析が行われた。２つからなるアプローチが行われた。まず、Ｆａｂの可変部および定常部の接続部分にわたる配列保存のグローバルな分析が、公的に入手可能なＡｂの配列および構造アラインメントにより行われた。様々な抗体サブグループからの定常および可変ドメイン配列のアラインメントを図６に示す。同時に、Ｄ３Ｈ４４の接続部分の結晶構造が、図１８に列挙される多くの分子モデリングツール（例えば、ＲｅｓｉｄｕｅＣｏｎｔａｃｔｓ（商標））を用いて分析された。これらの分析は、優先的ＨＣ－ＬＣ対合を遺伝子操作するためのホットスポット位置の一覧の特定をもたらした。

この分析から決定されたホットスポット位置を、表２９に示す。

【０３１３】

（表２９）ヒトＶＨおよびＶＬカッパ鎖由来の典型的なＦａｂにおける重（Ｈ）鎖および軽（Ｌ）鎖の接続部分でのホットスポットアミノ酸位置。これらの位置およびアミノ酸は、主にＶＬラムダ鎖においても保存される。これらは、ＣＤＲ３ループに位置するわずかなものを除いて、主にフレームワーク残基である。Ｋａｂａｔ番号付けを用いて親Ｄ３Ｈ４４配列におけるアミノ酸を、表Ａ１～Ａ２に提供する。

H (Kabat)	L (Kabat)
V37	Y36
Q39	Q38
L45	P44
W47	L89
F100	F98
W103	F116
L124	F118
A139	V133
F174	L135

【０３１４】

次に、ホットスポット位置ならびに３Ｄの結晶構造における対象となるホットスポットに隣接する位置での潜在的な突然変異および設計が、コンピュータ内での突然変異生成およびＺｙｍｅｐａｃｋ（商標）を用いたパッキング／モデリングによりシミュレートされ、特定され、立体的および静電気的相補性を含む多くの因子に基づいてスコア付けされた。図１１は、可変ドメインにおける重鎖および軽鎖接続部分での限定された数のホットスポット位置を示す。突然変異がいかにしてこれらの接続部分位置で導入され、不適切な鎖対の形成を嫌う一方で、絶対的鎖の選択的対合を促進し得るかを示す。立体的相補性は、モデル化され、ファンデルワールスのパッキング、キャビテーション効果、および疎水性基の密接な接触等のエネルギー因子に基づいて計算された。同様に、静電気的相互作用エネルギーは、モデル化され、電荷、水素結合、および脱溶媒和効果の間のクーロン相互作用に基づいて評価された。Ｈ１：Ｌ１（またはＨ２：Ｌ２）等の好ましい重鎖および軽鎖対モデルならびに対象となる突然変異を導入することにより得られたＨ１：Ｌ２（およびＨ２：Ｌ１）等の不適切な対の両方をシミュレートして、相対的な立体的および静電気的スコアを計算した。これは、特定の突然変異セットが好ましいエネルギー、すなわち、不適切な（絶対的ではない）対と比較して、好ましい（絶対的な）重鎖-軽鎖対に対してより大きな立体的または静電気的相補性をもたらすかどうかを決定することを可能にした。計算された立体的および静電気的エネルギーは、軽鎖および重鎖の対合と関連する自由エネルギーの構成要素である。それ故に、より大きな立体的および静電気的相補性は、絶対的ではない対の対合と比較して、絶対的対の対合と関連するより大きな自由エネルギーの変化を示す。より大きな立体的および静電気的相補性は、絶対的ではない対と比較して、絶対的な重鎖および軽鎖の優先的（選択的）対合をもたらし、同時発現の際に、２つの産物（絶対的ではない対合に対して絶対的に対合した重鎖および軽鎖）のパーセンテージに関して検出され得る。絶対的対におけるより大きな立体的または静電気的相補性はまた、典型的には、絶対的ではない対と比較してより良好な／大きな熱安定性の観点からも観察され得る。候補設計は、最終選考に残り、順位付けされた。設計は、初めに、ＬＣＣＡ系を用いてインビトロで試験された。不良なＨＣ－ＬＣの対合特異性、低い熱安定性、または抗原結合親和性の低下等の最適ではない生物物理学的特徴を示す控えめに行われた設計は、さらなる一連のコンピュータ内の設計およびインビトロのスクリーニングによりさらに改善された。次いで、最良の設計は、二重特異性Ｍａｂ形式において試験され、インビトロのスクリーニングは、主にＳＭＣＡ形式により試験された。

【０３１５】

実施例１５：二重特異性抗体の突然変異設計セットのライブラリーを用いた、Ｍａｂ１およびＭａｂ２が与える二重特異性抗体の生成

一実施形態において、それぞれ抗原結合断片Ｆａｂ１およびＦａｂ２を含む２つの標準的な抗体Ｍａｂ１およびＭａｂ２から与えられた二重特異性抗体を選択的に形成することを目的とする、二重特異性抗体の突然変異設計セットが本明細書に示される。設計セットは、それぞれ、Ｆａｂ１、Ｆａｂ２、およびＦｃに対応する同種の突然変異からなる。突然変異は、Ｆａｂ１の軽鎖および重鎖の接続部分で導入されて、Ｆａｂ２の競合する軽鎖および重鎖の存在下で２つの絶対的な対の間で選択的対合を達成する。選択的対合は、接続部分の特定のホットスポットフレームワーク残基間で、立体的、疎水性、または静電気的相補性に基づいて、２つの絶対的な軽鎖および重鎖において好ましい相補的突然変異を導入することにより達成され、一方、これらの突然変異残基は、絶対的ではない鎖対に関して好ましくない接続部分の相互作用を含む。それぞれの設計セットにおいて、選択的対合用の突然変異がまた、Ｆａｂ２の軽鎖および重鎖の接続部分で導入されて、Ｆａｂ１の競合する軽鎖および重鎖の存在下でこれらの２つの絶対的鎖間で選択的対合を達成することもできる。突然変異は、Ｆａｂ１からの軽鎖とＦａｂ２の重鎖との誤対合を軽減させることを目的とし、逆もまた同様である。突然変異は、重鎖の選択的対合を達成するために、Ｆｃ接続部分で導入されて、２つの異なる重鎖を含む非対称抗体分子を形成する。

【０３１６】

抗体の軽鎖および重鎖の接続部分のある特定の残基位置での遺伝子操作は、しばしば、その抗体の、抗原結合親和性、安定性、溶解性の低下、凝集傾向等の有害作用をもたらす場合がある。多くの関連した特性は、例えば、ｋｏｎおよびｋｏｆｆ速度に、融解温度（Ｔｍ）に、酸、塩基、酸化、凍結／解凍、振とう、圧力のようなストレス条件に対する安定性に、影響を及ぼし得る。これは、しばしば、関心対象である抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）によって影響を受ける。抗体のＣＤＲが概して同一でない場合、突然変異設計セットの影響は、すべての抗体にわたって同一ではない場合がある。別の実施形態において、二重特異性抗体の突然変異設計セットのライブラリーを構成する多くの異なる二重特異性の突然変異設計セットは、接続部分の異なるホットスポット位置で突然変異を含むものとして定義される。そのような二重特異性抗体の突然変異設計セットのライブラリーを表３０に示す。不適切に対合された抗体様構造を含む他の混入物質と比較して顕著な純度を有する二重特異性抗体を、任意の２つの利用可能な抗体Ｍａｂ１およびＭａｂ２から作製するための方法が、本明細書に示される。Ｍａｂ１およびＭａｂ２の軽鎖および重鎖は、突然変異設計セットのそれぞれの同種の突然変異を導入した後に同時発現され、タンパク質産物において、発現された抗体産物は分析的にスクリーニングされて、発現された他のＭａｂ様種と比較して、好ましい二重特異性抗体の純度が評価される。いくつかの実施形態において、分析的にスクリーニングする手順は、ＬＣ－ＭＳ技術に基づき得る。いくつかの実施形態において、分析的にスクリーニングする手順は、キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）技術等の電荷に基づいた分離に基づき得る。スクリーニング技術の一例は、ＳＭＣＡ手順に基づいて実施例１３に示される。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体の顕著な純度は、発現されたタンパク質産物における得られたすべてのＭａｂ様種の７０％超であると定義される。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体の顕著な純度は、発現されたタンパク質産物における得られたすべてのＭａｂ様種の９０％超であると定義される。Ｍａｂ１およびＭａｂ２が与えた二重特異性Ｍａｂ設定セットの調製および選択のための手順を、図１９において図式的に示す。

【０３１７】

本明細書に記述されるすべての出版物、特許、および特許出願は、それぞれ個別の出版物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３１８】

本発明は、特に、好ましい実施形態および様々な代替の実施形態に関して示し、説明したが、形態および詳細の様々な変更が、本発明の主旨および範囲から逸脱することなくな

され得ることが当業者に理解されるだろう。

【０３１９】

本出願の本文内に引用された全ての参考文献、出願特許および特許出願は、全ての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０３２０】

（表Ａ）配列

配列番号	説明	配列
	D3H44 軽鎖 (ドメイン境界: VL; D1 – K107, CL; R108 – C214)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYATSLAE GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	ペルツズマブ軽鎖 (ドメイン境界: VL; D1 – K107, CL; R108 – C214)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

	トラスツズマブ 軽鎖 (ドメイン境界: VL; D1 - K107, CL; R108 - C214)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	ラムシルマブ 軽鎖 (ドメイン境界: VL; D1 - K107, CL; G108 - C214)	DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLDT GVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGGTKVDIKGTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	D3H44 重鎖 (ドメイン境界: VH; E1 - S113, CH1; A114 - K223, ヒンジ ; E226 - P243, CH2; A244 - K360, CH3; G361 - G477)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYYMHWVRQAPGKGLEWVGLIDPEQG NTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTAAYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	ペルツズマブ 重鎖 (ドメイン境界: VH; E1 - S113, CH1; A114 - K223, ヒンジ ; E226 - P243, CH2; A244 - K360, CH3; G361 - G477)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSG GSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	トラスツズマブ 重鎖 (ドメイン境界: VH; E1 - S113, CH1; A114 - K223, ヒンジ ; E226 - P243, CH2; A244 - K360, CH3; G361 - G477)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
	ラムシルマブ 重鎖 (ドメイン境界: VH; E1 - S113, CH1; A114 - K223,	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTMV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

	ヒンジ；E226 - P243, CH2; A244 - K360, CH3; G361 - G477)	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	トラスツズマブ_HC	GCCACCATGGCCGTGATGGCTCCTAGAACCCTGGTGCTGCTGCTGTCTGGAGCTCT GGCTCTGACTCAGACCTGGGCTGGAGAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATC AAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTGGGT GGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGA GGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATT CTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTA CCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGG ACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAG TTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGT CAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGC ACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAA GAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGA GGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTA AGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAA TAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAA GGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTG GGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACA GCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAG CAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACAC TCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCTGA
	トラスツズマブ_LC	GCCACTATGGCTGTGATGGCCCCTAGGACCCTGGTGCTGCTGCTGTCCGGAGCTCT GGCTCTGACTCAGACCTGGGCTGGAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTT AACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACT TACTACTGTCAACAGCATTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGT GGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA AGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
	ラムシルマブ_HC	GCCACCATGGCCGTGATGGCTCCTAGAACACTGGTCCTGCTGCTGTCAGGGGCACT GGCACTGACTCAGACTTGGGCTGGGGAGGTCCAGCTGGTCCAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGAAGCCTGGAGGGAGTCTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGGTTCACCTTT AGCTCCTACAGCATGAACTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAAGGACTGGAATGGGT GTCTAGTATCTCAAGCTCCTCTAGTTACATCTACTATGCAGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCAGAGATAACGCCAAAAATTCCCTGTATCTGCAGATGAACAGC CTGCGAGCCGAGGACACCGCTGTCTACTATTGCGCACGGGTGACAGACGCCTTCGA TATTTGGGGACAGGGCACCATGGTCACAGTGTCAAGCGCCTCCACCAAGGGACCAA GCGTGTTCCCACTGGCTCCATCCTCTAAAAGCACTTCCGGAGGAACCGCAGCCCTG GGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCATGGAACAGCGG GGCTCTGACCTCTGGAGTCCACACATTTCCAGCAGTGCTGCAGAGTTCAGGACTGT ACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACAGTGCCCTCTAGTTCACTGGGCACTCAGACCTAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCAATACTAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACC CAAGTCCTGTGATAAAACACATACTTGCCCACCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGG GAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACTCTGATGATTTCT AGGACACCCGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGT CAAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACAAAACCTA

		GGGAGGAACAGTACAACAGTACATATAGAGTCGTGTCAGTCCTGACTGTGCTGCAT CAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAATATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCC CGCACCTATCGAGAAAACTATTTCCAAGGCTAAAGGCCAGCCTAGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACTAAGAACCAGGTCAGTCTGACC TGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGG GCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTT TCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGAAACGTG TTCAGCTGTAGTGTCATGCACGAAGCACTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCT GTCACTGTCACCCGGATGA
	ラムシルマブ_LC	GCCACCATGGCTGTGATGGCACCTAGAACACTGGTCCTGCTGCTGTCCGGGGCACT GGCACTGACTCAGACTTGGGCTGGCGATATTCAGATGACCCAGAGTCCAAGCTCCG TGTCCGCCTCTATCGGCGACCGAGTCACCATTACATGCAGAGCTAGCCAGGGCATC GATAACTGGCTGGGGTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGCTGCTGAT CTACGACGCTTCCAATCTGGATACAGGCGTGCCCTCTAGGTTCAGTGGCTCAGGGA GCGGAACTTACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGGCTGAGGACTTCGCAGTG TATTTTTGCCAGCAGGCAAAAGCCTTCCCCCCTACCTTTGGCGGGGGAACAAAAGT CGACATCAAGGGGACCGTGGCCGCTCCCTCAGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATG AGCAGCTGAAGTCTGGAACAGCCAGTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCT CGGGAAGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCA GGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCAAGCACAC TGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCATGTGAGGTCACC CATCAGGGGCTGTCAAGTCCAGTCACAAAAAGTTTCAACCGAGGAGAGTGCTGA
	D3H44_HC	GCCACAATGGCCGTGATGGCTCCTAGAACACTGGTCCTGCTGCTGTCCGGGGCTCT GGCTCTGACTCAGACTTGGGCTGGGGAGGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCAACATC AAGGAGTACTATATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGT GGGACTGATCGACCCAGAACAGGGGAACACCATCTACGACCCTAAGTTTCAGGATA GGGCAACCATTTCTGCCGACAACAGTAAAAATACAGCTTATCTGCAGATGAACAGC CTGAGGGCTGAAGATACTGCAGTGTACTATTGCGCACGCGACACCGCAGCCTACTT CGATTATTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCAACTAAGGGAC CCAGCGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACTTCTGGAGGCACCGCTGCA CTGGGCTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGAGCTGGAACTC CGGGGCCCTGACCAGCGGAGTCCATACATTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACTCAGACC TATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGA ACCAAAGAGCTGTGATAAAACACATACTTGCCCACCTTGTCCTGCACCAGAGCTGC TGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGACACCCTGATGATT TCCCGCACACCAGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGA AGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAC CCCGGGAGGAACAGTACAACTCCACATATAGAGTCGTGTCTGTCCTGACTGTGCTG CACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCCCT GCCCGCTCCTATCGAGAAAACAATTAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCTCGAGAACCAC AGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAGAACCAGGTCAGTCTG ACCTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAA TGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGCA GTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCGATAAATCACGATGGCAGCAGGGGAAC GTGTTCAGCTGTTCAGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGAG CCTGAGCCTGTCTCCCGGCTGA
	D3H44_LC	GCCACAATGGCTGTGATGGCACCCCGAACCCTGGTCCTGCTGCTGAGTGGAGCACT GGCACTGACCCAGACATGGGCAGGCGACATCCAGATGACACAGTCCCCTAGCTCCC TGAGTGCCTCAGTGGGGGACAGAGTCACTATCACCTGCCGGGCTTCCAGAGATATT AAGTCTTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGGTGCTGAT CTACTATGCCACCAGTCTGGCTGAAGGAGTGCCTTCACGGTTCAGCGGCTCCGGGT CTGGAACTGACTACACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACC TACTATTGCCTGCAGCACGGCGAATCCCCATGGACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGT GGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACG AACAGCTGAAATCAGGAACTGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCC CGCGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCACA GGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCC

		TGACACTGTCTAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTCACC CATCAGGGGCTGTCCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAATCGGGGAGAGTGTTGA
	ペルツズマブ_HC	GCCACAATGGCTGTGATGGCTCCAAGAACCCTGGTCCTGCTGCTGTCCGGGGCTCT GGCTCTGACTCAGACCTGGGCCGGGGAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTTTT ACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGT CGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCC GGTTCACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGC CTGCGAGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTT CTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTCTGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCA AGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACT GCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTG GAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGCAGTCAA GCGGGCTGTACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACA CAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAA AGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATACATGCCCCCCTTGTCCTGCACCAG AGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTG ATGATTAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGA CCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGA CTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACA GTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAA GGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAAGGACAGCCTAGAG AACCACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGTC AGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGA AAGTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCAG ATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAG GGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCACGAGGCACTGCACAACCATTACACCCA GAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGGTGA
	ペルツズマブ_LC	GCCACAATGGCTGTGATGGCACCTAGAACACTGGTCCTGCTGCTGAGCGGGGCACT GGCACTGACACAGACTTGGGCCGGGGATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCC TGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTG TCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGAT CTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGT CAGGAACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACC TACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGT GGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACG AACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCT CGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGCCA GGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACAC TGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACA CATCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGTTGA

注記:ヌクレオチド配列は、シグナルペプチド配列から開始し、終止コドンTGAで終了する。これらは、必要に応じて、取り除くことができる。

【０３２１】

（表Ａ１－Ａ２）Ｄ３Ｈ４４、トラスツズマブ、ペルツズマブ、およびラムシルマブの重鎖および軽鎖アミノ酸配列

表A1

	重鎖起源			
KABAT番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
1	E	E	E	E
2	V	V	V	V
3	Q	Q	Q	Q
4	L	L	L	L
5	V	V	V	V
6	E	E	E	Q
7	S	S	S	S
8	G	G	G	G
9	G	G	G	G
10	G	G	G	G
11	L	L	L	L
12	V	V	V	V
13	Q	Q	Q	K
14	P	P	P	P
15	G	G	G	G
16	G	G	G	G
17	S	S	S	S
18	L	L	L	L
19	R	R	R	R
20	L	L	L	L
21	S	S	S	S
22	C	C	C	C
23	A	A	A	A
24	A	A	A	A

表A1

	重鎖起源			
KABAT番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
25	S	S	S	S
26	G	G	G	G
27	F	F	F	F
28	N	T	N	T
29	I	F	I	F
32	K	T	K	S
33	E	D	D	S
34	Y	Y	T	Y
35	Y	T	Y	S
35A	M	M	I	M
35B	H	D	H	N
36	W	W	W	W
37	V	V	V	V
38	R	R	R	R
39	Q	Q	Q	Q
40	A	A	A	A
41	P	P	P	P
42	G	G	G	G
43	K	K	K	K
44	G	G	G	G
45	L	L	L	L
46	E	E	E	E
47	W	W	W	W
48	V	V	V	V

表 A1

	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
49	G	A	A	S
50	L	D	R	S
51	I	V	I	I
52	D	N	Y	S
52A	P	P	P	S
52B	E	N	T	S
54	Q	S	N	S
55	G	G	G	S
56	N	G	Y	Y
57	T	S	T	I
58	I	I	R	Y
59	Y	Y	Y	Y
60	D	N	A	A
61	P	Q	D	D
62	K	R	S	S
63	F	F	V	V
64	Q	K	K	K
65	D	G	G	G
66	R	R	R	R
67	A	F	F	F
68	T	T	T	T
69	I	L	I	I
70	S	S	S	S
71	A	V	A	R
72	D	D	D	D
73	N	R	T	N

表 A1

	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
74	S	S	S	A
75	K	K	K	K
76	N	N	N	N
77	T	T	T	S
78	A	L	A	L
79	Y	Y	Y	Y
80	L	L	L	L
81	Q	Q	Q	Q
82	M	M	M	M
82A	N	N	N	N
82B	S	S	S	S
82C	L	L	L	L
83	R	R	R	R
84	A	A	A	A
85	E	E	E	E
86	D	D	D	D
87	T	T	T	T
88	A	A	A	A
89	V	V	V	V
90	Y	Y	Y	Y
91	Y	Y	Y	Y
92	C	C	C	C
93	A	A	S	A
94	R	R	R	R
95	D	N	W	V
96	T	L	G	T

	表 A1			
	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
120	S	S	S	S
121	V	V	V	V
122	F	F	F	F
123	P	P	P	P
124	L	L	L	L
125	A	A	A	A
126	P	P	P	P
127	S	S	S	S
128	S	S	S	S
129	K	K	K	K
130	S	S	S	S
133	T	T	T	T
134	S	S	S	S
135	G	G	G	G
136	G	G	G	G
137	T	T	T	T
138	A	A	A	A
139	A	A	A	A
140	L	L	L	L
141	G	G	G	G
142	C	C	C	C
143	L	L	L	L
144	V	V	V	V
145	K	K	K	K
146	D	D	D	D
147	Y	Y	Y	Y

	表 A1			
	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
97	A	G	G	D
98		P	D	
			G	
		S	F	
98	A	F	Y	
99	Y	Y	A	A
100	F	F	M	F
101	D	D	D	D
102	Y	Y	Y	I
103	W	W	W	W
104	G	G	G	G
105	Q	Q	Q	Q
106	G	G	G	G
107	T	T	T	T
108	L	L	L	M
109	V	V	V	V
110	T	T	T	T
111	V	V	V	V
112	S	S	S	S
113	S	S	S	S
114	A	A	A	A
115	S	S	S	S
116	T	T	T	T
117	K	K	K	K
118	G	G	G	G
119	P	P	P	P

表 A1

	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
148	F	F	F	F
149	P	P	P	P
150	E	E	E	E
151	P	P	P	P
152	V	V	V	V
153	T	T	T	T
154	V	V	V	V
156	S	S	S	S
157	W	W	W	W
162	N	N	N	N
163	S	S	S	S
164	G	G	G	G
165	A	A	A	A
166	L	L	L	L
167	T	T	T	T
168	S	S	S	S
169	G	G	G	G
171	V	V	V	V
172	H	H	H	H
173	T	T	T	T
174	F	F	F	F
175	P	P	P	P
176	A	A	A	A
177	V	V	V	V
178	L	L	L	L
179	Q	Q	Q	Q

表 A1

	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
180	S	S	S	S
182	S	S	S	S
183	G	G	G	G
184	L	L	L	L
185	Y	Y	Y	Y
186	S	S	S	S
187	L	L	L	L
188	S	S	S	S
189	S	S	S	S
190	V	V	V	V
191	V	V	V	V
192	T	T	T	T
193	V	V	V	V
194	P	P	P	P
195	S	S	S	S
196	S	S	S	S
197	S	S	S	S
198	L	L	L	L
199	G	G	G	G
200	T	T	T	T
203	Q	Q	Q	Q
205	T	T	T	T
206	Y	Y	Y	Y
207	I	I	I	I
208	C	C	C	C
209	N	N	N	N

表 A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
210	V	V	V	V
211	N	N	N	N
212	H	H	H	H
213	K	K	K	K
214	P	P	P	P
215	S	S	S	S
216	N	N	N	N
217	T	T	T	T
218	K	K	K	K
219	V	V	V	V
220	D	D	D	D
221	K	K	K	K
222	K	K	K	K
223	V	V	V	V
226	E	E	E	E
227	P	P	P	P
228	K	K	K	K
232	S	S	S	S
233	C	C	C	C
234	D	D	D	D
235	K	K	K	K
236	T	T	T	T
237	H	H	H	H
238	T	T	T	T
239	C	C	C	C
240	P	P	P	P

表 A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
241	P	P	P	P
242	C	C	C	C
243	P	P	P	P
244	A	A	A	A
245	P	P	P	P
246	E	E	E	E
247	L	L	L	L
248	L	L	L	L
249	G	G	G	G
250	G	G	G	G
251	P	P	P	P
252	S	S	S	S
253	V	V	V	V
254	F	F	F	F
255	L	L	L	L
256	F	F	F	F
257	P	P	P	P
258	P	P	P	P
259	K	K	K	K
260	P	P	P	P
261	K	K	K	K
262	D	D	D	D
263	T	T	T	T
264	L	L	L	L
265	M	M	M	M
266	I	I	I	I

	表 A1			
	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
295	D	D	D	D
296	G	G	G	G
299	V	V	V	V
300	E	E	E	E
301	V	V	V	V
302	H	H	H	H
303	N	N	N	N
304	A	A	A	A
305	K	K	K	K
306	T	T	T	T
307	K	K	K	K
308	P	P	P	P
309	R	R	R	R
310	E	E	E	E
311	E	E	E	E
312	Q	Q	Q	Q
313	Y	Y	Y	Y
314	N	N	N	N
317	S	S	S	S
318	T	T	T	T
319	Y	Y	Y	Y
320	R	R	R	R
321	V	V	V	V
322	V	V	V	V
323	S	S	S	S
324	V	V	V	V

	表 A1			
	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
267	S	S	S	S
268	R	R	R	R
269	T	T	T	T
270	P	P	P	P
271	E	E	E	E
272	V	V	V	V
273	T	T	T	T
274	C	C	C	C
275	V	V	V	V
276	V	V	V	V
277	V	V	V	V
278	D	D	D	D
279	V	V	V	V
280	S	S	S	S
281	H	H	H	H
282	E	E	E	E
283	D	D	D	D
284	P	P	P	P
285	E	E	E	E
286	V	V	V	V
287	K	K	K	K
288	F	F	F	F
289	N	N	N	N
290	W	W	W	W
291	Y	Y	Y	Y
292	V	V	V	V

表A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
325	L	L	L	L
326	T	T	T	T
327	V	V	V	V
328	L	L	L	L
329	H	H	H	H
330	Q	Q	Q	Q
331	D	D	D	D
332	W	W	W	W
333	L	L	L	L
334	N	N	N	N
335	G	G	G	G
336	K	K	K	K
337	E	E	E	E
338	Y	Y	Y	Y
339	K	K	K	K
340	C	C	C	C
341	K	K	K	K
342	V	V	V	V
343	S	S	S	S
344	N	N	N	N
345	K	K	K	K
346	A	A	A	A
347	L	L	L	L
348	P	P	P	P
349	A	A	A	A
350	P	P	P	P

表A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
351	I	I	I	I
352	E	E	E	E
353	K	K	K	K
354	T	T	T	T
355	I	I	I	I
357	S	S	S	S
358	K	K	K	K
359	A	A	A	A
360	K	K	K	K
361	G	G	G	G
363	Q	Q	Q	Q
364	P	P	P	P
365	R	R	R	R
366	E	E	E	E
367	P	P	P	P
368	Q	Q	Q	Q
369	V	V	V	V
370	Y	Y	Y	Y
371	T	T	T	T
372	L	L	L	L
373	P	P	P	P
374	P	P	P	P
375	S	S	S	S
376	R	R	R	R
377	D	D	D	D
378	E	E	E	E

表 A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
381	L	L	L	L
382	T	T	T	T
383	K	K	K	K
384	N	N	N	N
385	Q	Q	Q	Q
386	V	V	V	V
387	S	S	S	S
388	L	L	L	L
389	T	T	T	T
390	C	C	C	C
391	L	L	L	L
392	V	V	V	V
393	K	K	K	K
394	G	G	G	G
395	F	F	F	F
396	Y	Y	Y	Y
397	P	P	P	P
398	S	S	S	S
399	D	D	D	D
400	I	I	I	I
401	A	A	A	A
402	V	V	V	V
405	E	E	E	E
406	W	W	W	W
407	E	E	E	E
408	S	S	S	S

表 A1

KABAT番号	重鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
410	N	N	N	N
411	G	G	G	G
414	Q	Q	Q	Q
415	P	P	P	P
416	E	E	E	E
417	N	N	N	N
418	N	N	N	N
419	Y	Y	Y	Y
420	K	K	K	K
421	T	T	T	T
422	T	T	T	T
423	P	P	P	P
424	P	P	P	P
425	V	V	V	V
426	L	L	L	L
427	D	D	D	D
428	S	S	S	S
430	D	D	D	D
433	G	G	G	G
434	S	S	S	S
435	F	F	F	F
436	F	F	F	F
437	L	L	L	L
438	Y	Y	Y	Y
439	S	S	S	S
440	K	K	K	K

表 A1

	重鎖起源				
KABAT 番号	D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
467	Y	Y	Y	Y
468	T	T	T	T
469	Q	Q	Q	Q
470	K	K	K	K
471	S	S	S	S
472	L	L	L	L
473	S	S	S	S
474	L	L	L	L
475	S	S	S	S
476	P	P	P	P
477	G	G	G	G

表 A1

	重鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
441	L	L	L	L
442	T	T	T	T
443	V	V	V	V
444	D	D	D	D
445	K	K	K	K
446	S	S	S	S
447	R	R	R	R
448	W	W	W	W
449	Q	Q	Q	Q
450	Q	Q	Q	Q
451	G	G	G	G
452	N	N	N	N
453	V	V	V	V
454	F	F	F	F
455	S	S	S	S
456	C	C	C	C
457	S	S	S	S
458	V	V	V	V
459	M	M	M	M
460	H	H	H	H
461	E	E	E	E
462	A	A	A	A
463	L	L	L	L
464	H	H	H	H
465	N	N	N	N
466	H	H	H	H

可変領域: HFR1; 1 - 30, CDR-H1; 31 - 35, HFR2; 36 - 49, CDR-H2; 50 - 65, HFR3; 66 - 94, CDR-H3; 95 - 102, HFR4; 103 - 113 (参考文献:Molecular Immunology. Volume 45, Issue 14, August 2008, Pages 3832-3839)

表 A2

	軽鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
1	D	D	D	D
2	I	I	I	I
3	Q	Q	Q	Q
4	M	M	M	M
5	T	T	T	T
6	Q	Q	Q	Q
7	S	S	S	S
8	P	P	P	P
9	S	S	S	S
10	S	S	S	S
11	L	L	L	V
12	S	S	S	S
13	A	A	A	A
14	S	S	S	S
15	V	V	V	I
16	G	G	G	G
17	D	D	D	D
18	R	R	R	R
19	V	V	V	V
20	T	T	T	T
21	I	I	I	I
22	T	T	T	T
23	C	C	C	C
24	R	K	R	R
25	A	A	A	A

表 A2

	軽鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
26	S	S	S	S
27	R	Q	Q	Q
28	D	D	D	G
29	I	V	V	I
30	K	S	N	D
31	S	I	T	N
32	Y	G	A	W
33	L	V	V	L
34	N	A	A	G
35	W	W	W	W
36	Y	Y	Y	Y
37	Q	Q	Q	Q
38	Q	Q	Q	Q
39	K	K	K	K
40	P	P	P	P
41	G	G	G	G
42	K	K	K	K
43	A	A	A	A
44	P	P	P	P
45	K	K	K	K
46	V	L	L	L
47	L	L	L	L
48	I	I	I	I
49	Y	Y	Y	Y
50	Y	S	S	D
51	A	A	A	A

	表 A2			
	軽鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
78	L	L	L	L
79	Q	Q	Q	Q
80	P	P	P	A
81	E	E	E	E
82	D	D	D	D
83	F	F	F	F
84	A	A	A	A
85	T	T	T	V
86	Y	Y	Y	Y
87	Y	Y	Y	F
88	C	C	C	C
89	L	Q	Q	Q
90	Q	Q	Q	Q
91	H	Y	H	A
92	G	Y	Y	K
93	E	I	T	A
94	S	Y	T	F
95	P	P	P	P
96	W	Y	P	P
97	T	T	T	T
98	F	F	F	F
99	G	G	G	G
100	Q	Q	Q	G
101	G	G	G	G
102	T	T	T	T
103	K	K	K	K

	表 A2			
	軽鎖起源			
KABAT 番号	D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
52	T	S	S	S
53	S	Y	F	N
54	L	R	L	L
55	A	Y	Y	D
56	E	T	S	T
57	G	G	G	G
58	V	V	V	V
59	P	P	P	P
60	S	S	S	S
61	R	R	R	R
62	F	F	F	F
63	S	S	S	S
64	G	G	G	G
65	S	S	S	S
66	G	G	R	G
67	S	S	S	S
68	G	G	G	G
69	T	T	T	T
70	D	D	D	Y
71	Y	F	F	F
72	T	T	T	T
73	L	L	L	L
74	T	T	T	T
75	I	I	I	I
76	S	S	S	S
77	S	S	S	S

表 A2

KABAT番号	軽鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
104	V	V	V	V
105	E	E	E	D
106	I	I	I	I
107	K	K	K	K
108	R	R	R	G
109	T	T	T	T
110	V	V	V	V
111	A	A	A	A
112	A	A	A	A
113	P	P	P	P
114	S	S	S	S
115	V	V	V	V
116	F	F	F	F
117	I	I	I	I
118	F	F	F	F
119	P	P	P	P
120	P	P	P	P
121	S	S	S	S
122	D	D	D	D
123	E	E	E	E
124	Q	Q	Q	Q
125	L	L	L	L
126	K	K	K	K
127	S	S	S	S
128	G	G	G	G
129	T	T	T	T

表 A2

KABAT番号	軽鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
130	A	A	A	A
131	S	S	S	S
132	V	V	V	V
133	V	V	V	V
134	C	C	C	C
135	L	L	L	L
136	L	L	L	L
137	N	N	N	N
138	N	N	N	N
139	F	F	F	F
140	Y	Y	Y	Y
141	P	P	P	P
142	R	R	R	R
143	E	E	E	E
144	A	A	A	A
145	K	K	K	K
146	V	V	V	V
147	Q	Q	Q	Q
148	W	W	W	W
149	K	K	K	K
150	V	V	V	V
151	D	D	D	D
152	N	N	N	N
153	A	A	A	A
154	L	L	L	L
155	Q	Q	Q	Q

表 A2

KABAT番号	軽鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
156	S	S	S	S
157	G	G	G	G
158	N	N	N	N
159	S	S	S	S
160	Q	Q	Q	Q
161	E	E	E	E
162	S	S	S	S
163	V	V	V	V
164	T	T	T	T
165	E	E	E	E
166	Q	Q	Q	Q
167	D	D	D	D
168	S	S	S	S
169	K	K	K	K
170	D	D	D	D
171	S	S	S	S
172	T	T	T	T
173	Y	Y	Y	Y
174	S	S	S	S
175	L	L	L	L
176	S	S	S	S
177	S	S	S	S
178	T	T	T	T
179	L	L	L	L
180	T	T	T	T
181	L	L	L	L

表 A2

KABAT番号	軽鎖起源 D3H44	ベルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
182	S	S	S	S
183	K	K	K	K
184	A	A	A	A
185	D	D	D	D
186	Y	Y	Y	Y
187	E	E	E	E
188	K	K	K	K
189	H	H	H	H
190	K	K	K	K
191	V	V	V	V
192	Y	Y	Y	Y
193	A	A	A	A
194	C	C	C	C
195	E	E	E	E
196	V	V	V	V
197	T	T	T	T
198	H	H	H	H
199	Q	Q	Q	Q
200	G	G	G	G
201	L	L	L	L
202	S	S	S	S
203	S	S	S	S
204	P	P	P	P
205	V	V	V	V
206	T	T	T	T
207	K	K	K	K

表A2						
	軽鎖起源					
		D3H44	ペルツズマブ	トラスツズマブ	ラムシルマブ
KABAT番号					
208		S	S	S	S
209		F	F	F	F
210		N	N	N	N
211		R	R	R	R
212		G	G	G	G
213		E	E	E	E
214		C	C	C	C

可変領域: LFR1; 1 - 23, CDR-L1; 24 - 34, LFR2; 35 - 49, CDR-L2; 50 - 56, LFR3; 57 - 88, CDR-L3; 89 - 97, LFR4; 98 - 110 (参考文献:Molecular Immunology. Volume 45, Issue 14, August 2008, Pages 3832-3839)

【０３２２】

（表１４）

固有の識別名セット	バケット	Fab領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
	Tm1のみ, TF1のみ				
1--2		定常	静電気的	S186R	Q124E_Q160E_T178D
3--4		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
5--6		定常	静電気的	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E
7--6		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E
8--6		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E
7--9		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E
8--9		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E
10--11		定常	立体的	F174V_S188L	S176G
12--13		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
12--14		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
12--15		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
16-17		可変	静電気的	Q39D	Q38R
18--11		定常	立体的	F174W_S188L	S176G
19--3		定常	立体的	S188L_V190Y	V133S
20--11		定常	立体的	S188L	S176G
21-22		可変	静電気的	Q39D	Q38R
23-24		定常	静電気的	K145L_Q179E	S131K
9--5		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
	Tm1のみ, TF1/TF2				
25-26		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
27-28		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37W_Q39E	Q38R_F98A

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
29-30		可変	立体的	V37W_A93V	F98A
31-32		可変	立体的	WT	F98W
33-34	Tm1のみ，TFカテゴリーの組み合わせを残存する	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E
35-36		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R
37-36		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R
25-38		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
39-34		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E
39-40		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E
41-42		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
43-17		可変	静電気的	Q39E	Q38R
22-44		可変	静電気的組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38D
45-28		可変		V37W_Q39D	Q38R_F98A
46-30		可変	立体的	V37W	F98A
47-48		可変	静電気的	V37E_F100D	L89R_F98W
49-42		可変	組み合わせ	V37I_Q39E	Q38R_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
			(静電気的+立体的)		
50-42		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39D	Q38R_F98W
51-52		可変	静電気的	Q39R	Q38E
53-54		可変	静電気的	Q39R	Q38E
33-40		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E
55-56		可変	静電気的対疎水性	Q39M	Q38M
	Tm1/Tm2, TF1のみ				
57-58		定常	静電気的	L143K_D146G	Q124E_V133D
5-59		定常	静電気的	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E
7-59		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E
8-59		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E
60-61		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D
62-61		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D
63-64		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D
63-65		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D
66-67		定常	静電気的	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
66-68		定常	静電気的	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
63-69		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D
3-70		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
61-71		定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
72-64		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D
72-65		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
72-69		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D
			組み合わせ(静電気的+立体的)		
73-74		可変		V37I_Q39R	Q38E_F98W
75-76		可変	静電気的	Q39D	Q38R
75-77		可変	静電気的	Q39D	Q38R
64-78		定常	静電気的	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
65-78		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
67-79		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R
68-79		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	V133A_Q160K_T178R
80-81		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
80-82		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
80-83		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
16-84		可変	静電気的	Q39D	Q38R
85-81		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
85-82		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
69-78		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
85-83		定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
86-87		可変	静電気的	Q39K	Q38N_T85E
86-88		可変	静電気的	Q39K	Q38N_T85E
	Tm1/Tm2, TF1/TF2				
			組み合わせ(静電気的+立体的)		
89-90		可変		Q39R	Q38D_F98W
			組み合わせ(静電気的+立体的)		
73-91		可変		V37I_Q39R	Q38E_F98W
			組み合わせ(静電気的+立体的)		
92-90		可変		V37I_Q39R	Q38D_F98W

固有の識別名セット	パケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
93-26		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
94-95	Tm1/Tm2, TF カテゴリーの組み合わせを残存する	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
96-97		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
89-98		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38D_F98W
99-76		可変	静電気的	Q39E	Q38R
99-77		可変	静電気的	Q39E	Q38R
100-97		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R_F98W
101-102		可変	静電気的	V37E	L89R_F98T
103-104		定常	立体的	A139G_V190A	L135W_N137A
105-42		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R_F98W
106-97		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39D	Q38R_F98W
92-98		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
43-84		可変	静電気的	Q39E	Q38R
93-38		定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W

固有の識別名セット	パケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
107-108		定常	立体的	A139G_V190A	L135W
109-110		可変	静電気的	V37E	L89R_F98V
	Tm2のみ, TF1のみ				
111-112		定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D_A139G_V190A	Q38R_L135W
63-113		定常	静電気的	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D
79-114		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
66-114		定常	静電気的	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
72-113		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D
113-78		定常	静電気的	L143E_K145T	Q160K_T178R
115-116		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38D_F98W
117-116		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
118-74		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
	Tm2のみ, TF1/TF2				
119-120		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39K	Q38N_T85E_F98W
121-95		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
115-122		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38D_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
123-124		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38D_F98W
117-122		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
118-91		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
125-124		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
	Tm2のみ, TFカテゴリーの組み合わせを残存する				
126-97		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R_F98W
127-128		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38N_T85K
129-128		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38N_T85K
130-131		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W
	Tm1/Tm3, 任意の**TF**カテゴリーの組み合わせ				
96-132		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
3-133		定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L
134-36		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
135-136		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R
137-138		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
100-132		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R_F98W
139-140		定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	A139I_K145T_D146G_Q179E_S188G_V190S	F116A_V133G_S176F_T178A
141-142		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R
73-143		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
73-144		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
145-146		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
145-147		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R_F98W
106-132		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39D	Q38R_F98W
148-149		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W

固有の識別名セット	バケット	Fab領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
148-150		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W
22-151		可変	静電気的	Q39R	Q38D
152-153		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W
152-154		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W
155-36		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39D	Q38R
156-157		可変	立体的	V37T_A93Q_W103L	P44W_F98W
158-159		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W
160-146		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R_F98W
161-142		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R
160-147		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R_F98W
162-163		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D	Q38R
164-165		定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	A139G_K145L_Q179E_V190A	S131R_L135W
166-157		可変	立体的	V37I_W103H	P44W_F98W
167-157		可変	立体的	V37T_A93Q_W103V	P44W_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
168-163		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R
169-157		可変	立体的	V37T_A93Q_W103T	P44W_F98W
170-171		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39K	Q38N_T85E
170-172		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39K	Q38N_T85E
173-174		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W
94-175		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38E_F98W
157-176		可変	立体的	V37W	F98A
177-157		可変	立体的	V37A_W103H	P44W_F98W
157-178		可変	立体的	V37W	F98A
179-180		可変	立体的	V37W_F100W	F98A
181-138		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38R_F98W
182-183		可変	静電気的	V37E_F100D	L89R_F98W
86-184		可変	静電気的	Q39K	Q38N_T85E
185-138		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39D	Q38R_F98W
186-187		可変	立体的	WT	F98W
187-188		可変	立体的	V37W_W103H	F98L
189-157		可変	立体的	V37A_W103V	P44W_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
190-191	カテゴリーを残存する	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R
192-193		定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39D_A139W	Q38R_F116A_L135A
194-195		定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(立体的)	A139G_V190A	F98W_L135W
196-197		定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(立体的)	A139W	F98W_F116A_L135A
198-199		定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39E_W103H	Q38N_P44W_T85K
200-146		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R_F98W
81-201		定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
82-201		定常	静電気的	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
202-203		可変	立体的	F100M_W103V	P44W_L89W
204-179		可変	立体的	V37T_A93Q_W103V	P44W_L89W_F98A
202-205		可変	立体的	F100M_W103V	P44W_L89W
200-147		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R_F98W
206-136		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R
126-132		可変	組み合わせ(静電気的	Q39E	Q38R_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ +立体的)	H1_突然変異	L1_突然変異
207-203		可変	立体的	F100M_W103H	P44W_L89W
207-205		可変	立体的	F100M_W103H	P44W_L89W
208-209		定常	組み合わせ (立体的)	A139G_S188G_V190A	L135W_S176L_T178S
210-138		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	Q39E	Q38R_F98W
121-175		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	Q39R	Q38E_F98W
211-212		定常	組み合わせ (静電気的 +立体的)	A139S	L135R
213-214		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	V37A_Q39K_W103H	Q38N_P44W_T85E
215-216		定常	組み合わせ (立体的)	A139G_S188G_V190A	V133G_L135W_S176F_T178A
115-217		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	Q39R	Q38D_F98W
115-218		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	Q39R	Q38D_F98W
123-219		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	Q39R	Q38D_F98W
117-217		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
117-218		可変	組み合わせ (静電気的 +立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異
220-199		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37A_Q39E_W103V	Q38N_P44W_T85K
118-143		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
118-144		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39R	Q38E_F98W
221-222		可変	組み合わせ(立体的)	V37A_W103H_A139G_V190A	P44W_L135W
223-179		可変	立体的	V37T_A93Q_W103T	P44W_L89W_F98A
224-225		定常	立体的	A139V_V190S	WT
226-227		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39K	Q38N_T85E_F98W
226-228		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39K	Q38N_T85E_F98W
229-230		可変	静電気的	V37E	L89R_F98V
201-83		定常	静電気的	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R
231-232		定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	A139I_K145T_D146G_S188G_V190S	F116A_V133G_S176F_T178A
233-131		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38N_T85K_F98W
234-235		定常	静電気的	K145E_D146G_Q179D_S188L	T178R
236-237		定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	A139G_K145L_Q179E_V190A	S131R_L135W
234-238		定常	静電気的	K145E_D146G_Q179D_S188L	T178R
239-240		可変	組み合わせ	Q39E	Q38N_T85K_F98W

固有の識別名セット	バケット	Fab領域	設計タイプ(静電気的+立体的)	H1_突然変異	L1_突然変異
241-242		可変	立体的	V37W_W103H	F98L
239-243		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38N_T85K_F98W
242-244		可変	立体的	V37A_W103H	P44W
179-245		可変	立体的	V37W_F100W	F98A
246-225		定常	立体的	A139I_V190S	WT
247-248		可変	立体的	V37W_F100W	F98A
125-219		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39R	Q38D_F98W
249-250		可変	立体的	L45W	Y87G
251-240		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W
252-227		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W
251-243		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W
252-228		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W
253-120		可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W
254-255		定常	立体的	F174G_S188A	WT
250-256		可変	立体的	V37A_W103H	P44W

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
1--2	K145L_Q179E	S131K	無	v	99:01
3--4	S188L	V133S	無	s,v	101:1_102:2_103:1_67:3_81:1_83:1_90:1_93:1_99:1
5--6	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	116:1_96:1
7--6	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	100:2_116:1
8--6	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	104:1_99:1
7--9	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	100:2_116:1
8--9	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	104:1_99:1
10--11	F174V_P175S_S188G	S176L	無	s,v	91:10_92:10_84:15_107:19
12--13	F174V_S188L	WT	無	s,v	53:10_67:11
12--14	S188L	WT	無	s,v	53:10_67:11
12--15	F174W_S188L	WT	無	s,v	53:10_67:11
16-17	V37I_Q39R	Q38E_F98W	無	s,v	70:25_86:11
18--11	F174V_P175S_S188G	S176L	無	s,v	71:26_79:15_87:23_94:13 75:27_76:34_77:27_79:25_79:36_80:24_82:12_83:2 5_90:8
19--3	F174V_P175S_S188G	S176L	無	s,v	70:29_78:25_78:30
20--11	F174V_P175S_S188G	S176L	無	s,v	62:31_67:35
21-22	Q39R	Q38D	無	s,v	75:43
23-24	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	無	v	54:43_57:31
9--5	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	無	s,v	

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
25-26	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	85:6_99:2
27-28	Q39R	Q38D	無	s,v	71:18_87:9
29-30	WT	L89F_F98W	無	s, v	64:17_88:7_89:18
31-32	V37W_A93V	F98A	無	s, v	101:20_17:83_62:27_67:29_67:29_78:17_82:18_83:18_83:21_83:23_85:21_86:14_86:20
33-34	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	56:34_74:24
35-36	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s	102:01
37-36	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s,v	103:1_82:8
25-38	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	85:6_99:2
39-34	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	104:1_60:18
39-40	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	104:1_60:18
41-42	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s,v	103:1_84:5_99:8
43-17	V37I_Q39R	Q38E_F98W	無	s,v	88:16_96:9
22-44	Q39E	Q38R	無	s,v	72:17_73:11_85:11
45-28	Q39R	Q38D	無	s,v	101:16_80:15
46-30	WT	L89F_F98W	無	s, v	62:13_92:19_92:4
47-48	WT	WT	無	s, v	117:4_21:81_68:26_76:20_76:26_76:28_86:16_87:21_99:4
49-42	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s	81:24
50-42	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s,v	68:20_73:24
51-52	Q39E	Q38R	無	s,v	70:32_71:23_72:24_73:30_75:20_76:24_78:24_81:1

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
					5_85:8
53-54	WT	WT	無	s,v	65:38_66:19_69:22_73:38_74:29_74:31_77:27_77:36_78:30
33-40	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	56:34_74:24
55-56	Q39R	Q38E	無	s,v	59:41_60:31_70:33
57-58	L143E_K145T	Q124R	無	s,v	100:1_103:1_90:1_91:1_95:1_96:1_98:1_99:1
5-59	L143E_K145T	Q160K_T178R	無	s,v	116:1_96:1
7-59	L143E_K145T	Q160K_T178R	無	s,v	100:2_116:1
8-59	L143E_K145T	Q160K_T178R	無	s,v	104:1_99:1
60-61	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	無	s,v	102:1_105:1
62-61	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	無	s,v	104:1_92:1
63-64	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	112:1_116:1
63-65	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	112:1_116:1
66-67	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R	無	s,v	101:1_104:1_107:1_111:2_112:1_115:1_94:1_97:1_99:1
66-68	K145T_Q179D_S188L	V133A_Q160K_T178R	無	s,v	101:1_104:1_107:1_111:2_112:1_115:1_94:1_97:1_99:1
63-69	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R	無	s,v	112:1_116:1
3-70	F174V_S188L	V133S	無	s,v	101:1_102:2_103:1_67:3_81:1_83:1_90:1_93:1_99:1
61-71	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	77:1_88:3
72-64	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	102:6_110:1_110:3_112:2_87:1_88:5_94:4_95:3_99:1

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
72-65	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	無	s,v	102:6_110:1_110:3_112:2_87:1_88:5_94:4_95:3_991
72-69	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R	無	s,v	102:6_110:1_110:3_112:2_87:1_88:5_94:4_95:3_991
73-74	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	83:7_84:5
75-76	Q39R	Q38D_F98W	無	s,v	81:18_83:2
75-77	V37I_Q39R	Q38D_F98W	無	s,v	81:18_83:2
64-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	84:15_91:4
65-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	72:4_75:20_80:18_88:12_88:12_92:10_92:13_93:13_94:15
67-79	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	76:24_78:20_80:16_83:12_86:1_86:21_88:13_93:11_94:17
68-79	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	62:25_87:11
80-81	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	72:18_77:15
80-82	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	72:18_77:15
80-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	72:18_77:15
16-84	Q39R	Q38E_F98W	無	s,v	70:25_86:11
85-81	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	63:24_81:11
85-82	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	63:24_81:11
69-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	76:18_82:19
85-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	63:24_81:11
86-87	Q39E	Q38N_T85K	無	s,v	55:30_66:22
86-88	V37I_Q39E	Q38N_T85K	無	s,v	55:30_66:22

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
89-90	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	87:2_96:2
73-91	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	83:7_84:5
92-90	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	82:6_91:11
93-26	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	71:24_75:13_75:19_76:3_79:12_82:12_83:6_89:6_97:1
94-95	V37W_W103F	F98L	無	s,v	71:17_73:24
96-97	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L	無	s,v	100:1_92:1
89-98	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	87:2_96:2
99-76	Q39R	Q38D_F98W	無	s,v	108:1_80:8
99-77	V37I_Q39R	Q38D_F98W	無	s,v	108:1_80:8
100-97	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L	無	s,v	85:10_85:2
101-102	WT	WT	無	s,v	101:6_101:8_107:4_54:25_86:8_91:14_91:17_97:6_98:5
103-104	A139W	F116A_L135A	無	s	70:05
105-42	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s,v	74:15_90:3
106-97	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L	無	s,v	92:15_97:6
92-98	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	82:6_91:11
43-84	Q39R	Q38E_F98W	無	s,v	88:16_96:9
93-38	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	71:24_75:13_75:19_76:3_79:12_82:12_83:6_89:6_97:1

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
107-108	A139W	F116A_L135A	無	s,v	56:20_61:12_63:7_65:10_67:16_68:10_69:11_69:11_69:12_74:15
109-110	WT	WT	無	s,v	62:27_67:25_74:27
111-112	Q39R_A139W	Q38D_F116A_L135A	無	s,v	111:1_85:1
63-113	L143E_K145T	Q160K_T178R	無	s,v	112:1_116:1
79-114	K145E_D146G_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R	無	s,v	108:1_93:2
66-114	K145E_D146G_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R	無	s,v	101:1_104:1_107:1_111:2_112:1_115:1_94:1_97:1_99:1
72-113	L143E_K145T	Q160K_T178R	無	s,v	102:6_110:1_110:3_112:2_87:1_88:5_94:4_95:3_99:1
113-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	74:6_93:3_94:1
115-116	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	55:16_89:3
117-116	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	85:8_86:13
118-74	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	78:13_80:10_92:2
119-120	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A	無	s,v	56:9_69:1
121-95	V37W_W103F	F98L	無	s,v	71:15_93:3
115-122	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	55:16_89:3
123-124	V37W_W103F	F98L	無	s,v	70:17_80:3
117-122	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	85:8_86:13
118-91	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L	無	s,v	78:13_80:10_92:2

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
125-124	V37W_W103F	F98L	無	s,v	60:30_79:23
126-97	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L	無	s,v	101:1_82:16
127-128	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	101:2_86:13
129-128	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	73:13_74:25
130-131	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	57:30_62:23
96-132	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L	無	s,v	100:1_92:1
3-133	F174W_S188L	V133S	無	s,v	101:1_102:2_103:1_67:3_81:1_83:1_90:1_93:1_99:1
134-36	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s	103:02
135-136	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s	104:01
137-138	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s,v	100:1_93:7
100-132	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L	無	s,v	85:10_85:2
139-140	S186K_S188H_V190G	F118W_Q124E_V133S_S176A_T178S_T180E	無	s,v	101:7_69:4
141-142	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W	無	s,v	92:5_99:6
73-143	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	83:7_84:5
73-144	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	83:7_84:5
145-146	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L	無	s, v	36:73_86:3_87:8
145-147	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L	無	s, v	36:73_86:3_87:8
106-132	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L	無	s,v	92:15_97:6
148-149	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	68:6_69:9

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
148-150	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	68:6_69:9
22-151	V37I_Q39R	Q38R	無	s,v	72:17_73:11_85:11
152-153	V37W_Q39D	Q38R_F98A	無	s,v	61:19_63:5
152-154	V37W_Q39E	Q38R_F98A	無	s,v	61:19_63:5
155-36	V37W_Q39R	Q38E_F98A	無	s,v	58:32_94:6
156-157	V37W	F98A	無	s,v	50:17_76:8
158-159	V37W	F98A	無	s,v	66:13_77:15
160-146	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L	無	s	88:18
161-142	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W	無	s,v	102:8_56:29
160-147	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L	無	s	88:18
162-163	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	無	s,v	77:23_98:16
164-165	A139W	F116A_L135A	無	s,v	48:21_49:14_50:12_51:10_68:1
166-157	V37W	F98A	無	s,v	55:20_61:10
167-157	V37W	F98A	無	s,v	50:21_74:10
168-163	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	無	s,v	60:32_91:10
169-157	V37W	F98A	無	s,v	54:26_68:9
170-171	V37A_Q39E_W103H	Q38N_P44W_T85K	無	s,v	66:34_92:13
170-172	V37A_Q39E_W103V	Q38N_P44W_T85K	無	s,v	66:34_92:13
173-174	V37W	F98A	無	s,v	61:12_74:26
94-175	V37W_W103H	F98L	無	s,v	71:17_73:24
157-176	W103H	P44W_F98W	無	s,v	63:37_86:12

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
177-157	V37W	F98A	無	s	66:19
157-178	W103V	P44W_F98W	無	s,v	63:37_86:12
179-180	W103V	P44W_L89W_F98A	無	s,v	64:26_69:26_69:28_75:25_77:26_78:26_83:22_86:16_95:8
181-138	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s	84:29
182-183	V37S_A93K	F98Y	無	s,v	65:34_68:24_75:27_77:18_77:18_79:31_81:28_86:21_91:16
86-184	Q39D	Q38N_T85K	無	s,v	55:30_66:22
185-138	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s	67:31
186-187	V37W_W103H	F98L	無	s,v	50:36_51:24_74:28
187-188	V37I	F98W	無	s,v	57:30_62:31
189-157	V37W	F98A	無	s	69:39
190-191	V37W	F98A	無	s,v	48:30_57:32_75:7
192-193	Q39R_A139G_V190A	Q38D_L135W	無	s	103:01
194-195	V37W_W103H_A139W	F98L_F116A_L135A	無	s	81:01
196-197	V37W_W103H_A139G_V190A	F98L_L135W	無	s	71:01
198-199	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	67:1_76:1
200-146	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L	無	s,v	102:2_96:1
81-201	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R	無	s,v	102:1_113:3
82-201	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R	無	s,v	103:1_97:3
202-203	V37W_F100W	F98A	無	s,v	86:5_87:2_97:1

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-L ジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/ スクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ H1-L1:H1-L2
204-179	V37W_F100W	F98A	無	s,v	87:2_88:1
202-205	V37W_F100W_W103L	F98A	無	s,v	86:5_87:2_97:1
200-147	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L	無	s,v	102:2_96:1
206-136	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s,v	104:2_93:1
126-132	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L	無	s,v	101:1_82:16
207-203	V37W_F100W	F98A	無	s,v	92:5_93:6_98:1
207-205	V37W_F100W_W103L	F98A	無	s,v	92:5_93:6_98:1
208-209	A139W_S188H_V190S	F116S_L135A_S176A	無	s	85:06
210-138	V37W_Q39R	Q38D_F98A	無	s,v	100:4_74:8
121-175	V37W_W103H	F98L	無	s,v	71:15_93:3
211-212	A139I	F118W_V133S	無	s	60:05
213-214	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A	無	s,v	60:11_76:3
215-216	A139W_S188A	F116S_L135A_S176A	無	s	84:07
115-217	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	55:16_89:3
115-218	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	55:16_89:3
123-219	V37W_W103H	F98L	無	s,v	70:17_80:3
117-217	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	85:8_86:13
117-218	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	85:8_86:13
220-199	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	72:12_91:7
118-143	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	78:13_80:10_92:2
118-144	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L	無	s,v	78:13_80:10_92:2

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
221-222	V37W_A139W	F98A_F116A_L135A	有	s	68:10
223-179	V37W_F100W	F98A	無	s	85:12
224-225	A139I	F118W_V133S	無	s,v	52:9_57:9_59:35
226-227	V37W_Q39E_W103H	Q38N_T85K_F98L	無	s,v	37:27_67:12_80:9
226-228	V37W_Q39E_W103F	Q38N_T85K_F98L	無	s,v	37:27_67:12_80:9
229-230	V37S_A93K	F98Y	無	s,v	110:16_76:21
201-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	無	s,v	69:21_86:10
231-232	S186K_S188H_V190G	F118W_V133S_S176A_T178S_T180E	無	s	69:16
233-131	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A	無	s,v	49:28_88:10
234-235	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	67:25_78:15
236-237	A139W	F116S_L135A	無	s	54:14
234-238	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	無	s,v	67:25_78:15
239-240	V37W_Q39K_W103H	Q38N_T85E_F98L	無	s,v	72:29_86:15
241-242	V37A_W103H	P44W	無	s,v	48:29_54:22_56:21_75:10_81:14_88:9
239-243	V37W_Q39K_W103F	Q38N_T85E_F98L	無	s,v	72:29_86:15
242-244	V37T_A93Q_W103T	F98L	無	s,v	36:25_41:25_58:7_67:6 64:26_69:26_69:28_75:25_77:26_78:26_83:22_86:16_95:8
179-245	W103H	P44W_L89W_F98A	無	s,v	67:28_69:24_77:8
246-225	A139I	F118W_V133S	無	s,v	67:30_71:22
247-248	V37W_F100W_W103L	L89W_F98A	無	s,v	60:30_79:23
125-219	V37W_W103H	F98L	無	s,v	

固有の識別名セット	H2_突然変異	L2_突然変異	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ(s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2
249-250	V37A_W103H	P44W	無	s,v	55:24_58:31
251-240	V37W_Q39K_W103H	Q38N_T85E_F98L	無	s,v	62:38_64:27
252-227	V37W_Q39E_W103H	Q38N_T85K_F98L	無	s	68:35
251-243	V37W_Q39K_W103F	Q38N_T85E_F98L	無	s,v	62:38_64:27
252-228	V37W_Q39E_W103F	Q38N_T85K_F98L	無	s	68:35
253-120	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A	無	s	67:36 73:30_78:30_66:32_61:36_65:37_70:38_59:40_62:4
254-255	F174A_S188G	S176W	無	s,v	0_54:45
250-256	V37T_A93Q_W103T	Y87G	無	s,v	43:26_43:27_53:19

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
1--2	99:01	v	100:06	95:05	72.52	74.38	0.125	0.066
3--4	99:01	s,v	73:10_80:14	87:13	73.3	73.22	0.0399	0.0144
5--6	99:01	s,v	61:30_64:32	67:33	74.32	74.95	0.0245	0.0415
7--6	99:01	s,v	61:30_64:32	67:33	71.85	74.95	0.078	0.0415
8--6	99:01	s,v	61:30_64:32	67:33	72.57	74.95	0.0671	0.0415
7--9	99:01	s,v	54:43_57:31	60:40	71.85	76.31	0.078	0.0705
8--9	99:01	s,v	54:43_57:31	60:40	72.57	76.31	0.0671	0.0705
10--11	88:12	s	85:30	74:26	73.88	73.3	0.0949	0.0399
12--13	86:14	s,v	103:6_76:23_92:22_94:6	89:11	73.3	71.62	0.0399	0.0377 (0.0386)
12--14	86:14	s,v	60:37_83:10_92:9_97:33	83:17	73.3	76.91	0.0399	0.0342 (0.0372)
12--15	86:14	s,v	76:21_78:18	80:20	73.3	73.01	0.0399	0.0271
16-17	82:18	s,v	58:25_59:45	64:36	73.03	72.38	0.077	0.144
18--11	81:19	s	85:30	74:26	72.21	73.3	0.0155	0.0399
19--3	76:24	s,v	101:1_102:2_103:1_67:3_81:1_83:1_90:1_93:1_99:1	99:01	74.73	73.3	0.0428	0.0399
20--11	72:28	s	85:30	74:26	77.09	73.3	0.0866	0.0399
21-22	66:34	s,v	72:17_73:11_85:11	87:13	73.03	71.68	0.077	0.0229
23-24	64:36	v	126:01	99:01	74.38	74.32	0.066	0.0245
9--5	60:40	s,v	116:1_96:1	99:01	76.31	74.32	0.0705	0.0245

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
25-26	96:04	s,v	101:4_71:18_73:17_85:12_85:18_86:9_88:7_89:10_99:2	90:10	72.38	73.07	0.144	0.902
27-28	86:14	s	99:02	98:02	73.07	71.68	0.902	0.0229
29-30	83:17	s, v	31:60_56:31_82:25_97:17	71:29	76.47	74.7	0.697	0.239
31-32	80:20	s, v	37:57_56:19_72:39_83:18	70:30	74.74	76.47	0.0109	0.697
33-34	69:31	s,v	67:13_90:8	88:12	73.6	73.07	0.123	0.902
35-36	99:01	s,v	62:26_62:29	69:31	73.64	71.29	0.0524	3.18
37-36	97:03	s,v	62:26_62:29	69:31	73.02 (0.22)	71.29	ND	3.18
25-38	96:04	s,v	107:10_80:11	90:10	72.38	73.21	0.144	1.73
39-34	95:05	s,v	67:13_90:8	88:12	72.78 (0.006)	73.07	ND	0.902
39-40	95:05	s,v	86:15_91:27	82:18	72.78 (0.006)	73.21	ND	1.73
41-42	95:05	s,v	57:18_65:24	75:25	71.9	71.29	0.127	3.18
43-17	89:11	s,v	58:25_59:45	64:36	73.02 (0.22)	72.38	ND	0.144
22-44	87:13	s	60:18	77:23	71.68	73.02 (0.22)	0.0229	ND
45-28	85:15	s	99:02	98:02	73.21	71.68	1.73	0.0229
46-30	83:17	s, v	31:60_56:31_82:25_97:17	71:29	76.9	74.7	3.44	0.239
47-48	80:20	s, v	76:25_78:27_83:14_85:18_85:6_86:14_90:10_91:16	85:15	75.84 (0.7)	75.83 (2.1884)	NB	0.056(0.1017)
49-42	77:23	s,v	57:18_65:24	75:25	72.87	71.29	0.0729	3.18

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm（n>1である場合の範囲）(°C)	H2-L2のTm（n>1である場合の範囲）(°C)	H1-L1の抗原親和性(KD)（n>1である場合の範囲）(nM)	H2-L2の抗原親和性(KD)（n>1である場合の範囲）(nM)
50-42	76:24	s,v	57:18_65:24	75:25	73.78 72.78	71.29 73.02	0.177	3.18
51-52	76:24	s,v	63:30_65:30_71:31_76:35_77:31_81:35_91:26_91:27_97:15	70:30	(0.006) 72.78	(0.22) 75.83	ND	ND 0.056
53-54	72:28	s,v	58:37_59:33_60:45_74:34_77:32_79:30_81:34_82:34	70:30	(0.006)	(2.1884)	ND	(0.1017)
33-40	69:31	s,v	86:15_91:27	82:18	73.6	73.21 72.78	0.123	1.73
55-56	66:34	s,v	68:24_71:27_83:17	74:26	72.58	(0.06)	0.0273	ND
57-58	99:01	s,v	106:1_107:1_107:2_112:1_112:1_117:2_120:1_123:1_92:2	99:01	67.04	75.45	0.0243	0.0596
5-59	99:01	s,v	73:5_83:1_83:2	98:02	74.32	69.6	0.0245	0.0236
7-59	99:01	s,v	73:5_83:1_83:2	98:02	71.85	69.6	0.078	0.0236
8-59	99:01	s,v	73:5_83:1_83:2	98:02	72.57	69.6	0.0671	0.0236
60-61	99:01	s,v	77:1_88:3	98:02	70.11	72.7	0.0816	0.0769
62-61	99:01	s,v	77:1_88:3	98:02	66.67	72.7	0.0511	0.0769
63-64	99:01	s,v	84:15_91:4	92:08	66.67	74.95	0.0511	0.0415
63-65	99:01	s,v	72:4_75:20_80:18_88:12_88:12_92:10_92:13_93:13_94:15	88:12	66.67	76.31	0.0511	0.0705
66-67	99:01	s,v	76:24_78:20_80:16_83:12_86:1_86:21_88:13_93:11_94:17	85:15	67.53	71.45	0.0871	0.0856
66-68	99:01	s,v	62:25_87:11	82:18	67.53	73.14	0.0871	0.0423
63-69	99:01	s,v	76:18_82:19	81:19	66.67	74.3 66.245	0.0511	0.111
3-70	99:01	s,v	70:24_80:28	74:26	73.3	(0.99)	0.0399	0.0201
61-71	98:02	v	102:01	99:01	72.7	69.16	0.0769	0.0525

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
72-64	98:02	s,v	84:15_91:4	92:08	70.11	74.95	0.0816	0.0415
72-65	98:02	s,v	72:4_75:20_80:18_88:12_88:12_92:10_92:13_93:13_94:15	88:12	70.11	76.31	0.0816	0.0705
72-69	98:02	s,v	76:18_82:19	81:19	70.11	74.3	0.0816	0.111
73-74	93:07	s,v	79:10_86:8	90:10	72.38	66.23	0.144	0.172
75-76	93:07	s,v	72:13_83:11	87:13	73.03	67.79	0.077	0.127
75-77	93:07	s,v	59:41_67:32	63:37	73.03	69.62	0.077	0.101
64-78	92:08	v	81:03	97:03	74.95	69.16	0.0415	0.0525
65-78	88:12	v	81:03	97:03	76.31	69.16	0.0705	0.0525
67-79	85:15	s,v	108:1_93:2	99:01	71.45	67.01	0.0856	0.0631
68-79	82:18	s,v	108:1_93:2	99:01	73.14	67.01	0.0423	0.0631
80-81	82:18	s,v	102:1_113:3	98:02	74.3	67.01	0.111	0.0631
80-82	82:18	s,v	103:1_97:3	98:02	74.3	67.53	0.111	0.0871
80-83	82:18	v	84:03	96:04	74.3	68.37	0.111	0.0828
16-84	82:18	s,v	80:17_85:12	85:15	73.03	70.69	0.077	0.1785 (0.007)
85-81	81:19	s,v	102:1_113:3	98:02	76.31	67.01	0.0705	0.0631
85-82	81:19	s,v	103:1_97:3	98:02	76.31	67.53	0.0705	0.0871
69-78	81:19	v	81:03	97:03	74.3	69.16	0.111	0.0525
85-83	81:19	v	84:03	96:04	76.31	68.37	0.0705	0.0828
86-87	70:30	s,v	59:33_72:30	67:33	71.25	68.83	0.0213	0.0201
86-88	70:30	s	73:37	66:34	71.25	69.8	0.0213	0.0182

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
89-90	98:02	s,v	74:12_93:4	92:08	67.79	73.07	0.127	0.902
73-91	93:07	s,v	115:11_99:4	94:06	72.38	67.39	0.144	0.924
92-90	91:09	s,v	74:12_93:4	92:08	69.62	73.07	0.101	0.902
93-26	87:13	s,v	101:4_71:18_73:17_85:12_85:18_86:9_88:7_89:10_99:2	90:10	70.69	73.07	0.1785 (0.007)	0.902
94-95	78:22	s,v	61:12_83:13	85:15	72.38	69.42	0.144	0.955 (1.05)
96-97	99:01	s,v	72:10_99:2	95:05	71.9	67.14	0.127	1.11
89-98	98:02	s,v	90:8_93:7	92:08	67.79	73.21	0.127	1.73
99-76	97:03	s,v	72:13_83:11	87:13	73.02 (0.22)	67.79	ND	0.127
99-77	97:03	s,v	59:41_67:32	63:37	73.02 (0.22)	69.62	ND	0.101
100-97	95:05	s,v	72:10_99:2	95:05	72.87	67.14	0.0729	1.11
101-102	93:07	s,v	75:28_78:2_81:23_84:21_85:23_86:13_86:18_88:5_91:16	83:17	68	75.83 (2.1884)	2.41	0.056 (0.1017)
103-104	93:07	s	74:20	79:21	70.65	71.86	ND	ND
105-42	92:08	s,v	57:18_65:24	75:25	70.74	71.29	0.163	3.18
106-97	91:09	s,v	72:10_99:2	95:05	73.78	67.14	0.177	1.11
92-98	91:09	s,v	90:8_93:7	92:08	69.62	73.21	0.101	1.73
43-84	89:11	s,v	80:17_85:12	85:15	73.02 (0.22)	70.69	ND	0.1785 (0.007)

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
93-38	87:13	s,v	107:10_80:11	90:10	70.69	73.21	0.1785 (0.007)	1.73
107-108	86:14	s,v	100:11_77:17_79:10_90:17_93:11_96:10_96:15_96:6_99:12	89:11	70.88 (0.32)	71.86	0.0586	ND
109-110	73:27	s,v	70:3_74:29	88:12	69.875 (0.03)	75.83 (2.1884)	NB	0.056 (0.1017)
111-112	99:01	s,v	101:1_84:2	99:01	69.22	66.73	0.117	5.64E-09
63-113	99:01	s,v	74:6_93:3_94:1	97:03	66.67	69.6	0.0511	0.0236
79-114	99:01	s,v	66:24_93:11	83:17	67.01	68.64	0.0631	0.0219
66-114	99:01	s,v	66:24_93:11	83:17	67.53	68.64	0.0871	0.0219
72-113	98:02	s,v	74:6_93:3_94:1	97:03	70.11	69.6	0.0816	0.0236
113-78	97:03	v	81:03	97:03	69.6	69.16	0.0236	0.0525
115-116	91:09	s,v	75:8_89:8	91:09	67.79	66.23	0.127	0.172
117-116	90:10	s,v	75:8_89:8	91:09	69.62	66.23	0.101	0.172
118-74	89:11	s,v	79:10_86:8	90:10	70.69	66.23	0.1785 (0.007)	0.172
119-120	95:05	s,v	61:35_74:19	72:28	66.94	67.29	0.0134	0.861
121-95	93:07	s,v	61:12_83:13	85:15	70.69	69.42	0.1785 (0.007)	0.955 (1.05)
115-122	91:09	s,v	114:5_91:2	97:03	67.79	67.39	0.127	0.924
123-124	91:09	s,v	75:8_85:8	91:09	67.79	69.42	0.127	0.955 (1.05)

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
117-122	90:10	s,v	114:5_91:2	97:03	69.62	67.39	0.101	0.924
118-91	89:11	s,v	115:11_99:4	94:06	70.69	67.39	0.1785 (0.007)	0.924
125-124	72:28	s,v	75:8_85:8	91:09	69.62	69.42	0.101	0.955 (1.05)
126-97	96:04	s,v	72:10_99:2	95:05	70.74	67.14	0.163	1.11
127-128	95:05	s,v	64:29_70:21	73:27	68.83	68.63	0.0201	1.78
129-128	80:20	s,v	64:29_70:21	73:27	69.8	68.63	0.0182	1.78
130-131	69:31	s,v	81:16_88:10	87:13	68.1	68.63	0.1247 (0.0646)	1.78
96-132	99:01	s,v	76:6_95:3	95:05	71.9	58.03	0.127	2.99
3-133	99:01	s,v	68:21_72:24	76:24	73.3	65.53	0.0399	0.0172
134-36	99:01	s,v	62:26_62:29	69:31	ND	71.29	ND	3.18
135-136	99:01	s,v	47:31_53:39_93:38	60:40	73.64	ND	0.0524	ND
137-138	97:03	s,v	46:21_46:34_97:20	69:31	71.9	ND	0.127	ND
100-132	95:05	s,v	76:6_95:3	95:05	72.87	58.03	0.0729	2.99
139-140	94:06	s,v	90:1_98:5	98:02	65	72.57	0.0406	0.0615
141-142	94:06	s,v	61:18_69:16	79:21	73.02 (0.22)	ND	ND	ND
73-143	93:07	s,v	94:1_97:1	99:01	72.38	58.76	0.144	7.89
73-144	93:07	s,v	105:3_57:5_97:1	97:03	72.38	ND	0.144	ND

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
145-146	92:08	s, v	83:6_98:3	95:05	71.9	60.35	0.127	5.62
145-147	92:08	s, v	48:24_63:33	66:34	71.9	ND	0.127	ND
106-132	91:09	s,v	76:6_95:3	95:05	73.78	58.03	0.177	2.99
148-149	90:10	s,v	101:3_99:3	97:03	ND	73.21	ND	1.73
148-150	90:10	s,v	74:8_84:4	93:07	ND	73.07	ND	0.902
22-151	87:13	s	54:34	61:39	71.68	ND	0.0229	ND
152-153	86:14	s,v	101:5_116:4	96:04	60.29	73.21	0.977	1.73
152-154	86:14	s,v	86:12_91:3	93:07	60.29	73.07	0.977	0.902
155-36	85:15	s,v	62:26_62:29	69:31	ND	71.29	ND	3.18
156-157	84:16	s,v	63:37_86:12	77:23	53.23	76.9	NB	3.44
158-159	84:16	s,v	58:38_87:31	68:32	60.29	76.9	0.977	3.44
160-146	83:17	s,v	83:6_98:3	95:05	72.87	60.35	0.0729	5.62
161-142	83:17	s,v	61:18_69:16	79:21	73.03	ND	0.077	ND
160-147	83:17	s,v	48:24_63:33	66:34	72.87	ND	0.0729	ND
162-163	82:18	s,v	42:33_67:12_69:8	85:15	73.03	60.29	0.077	0.977
164-165	81:19	s,v	104:2_105:1_107:1_108:1_110:1_111:1_115:1_117:1_120:1	99:01	ND	71.86	ND	ND
166-157	81:19	s,v	63:37_86:12	77:23	59.34	76.9	0.24	3.44
167-157	81:19	s,v	63:37_86:12	77:23	54.89	76.9	0.192	3.44
168-163	80:20	s,v	42:33_67:12_69:8	85:15	73.02 (0.22)	60.29	ND	0.977
169-157	80:20	s,v	63:37_86:12	77:23	53.64	76.9	1.33	3.44

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm(n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm(n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD)(n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD)(n>1である場合の範囲) (nM)
170-171	79:21	s,v	63:3_75:7	94:06	71.25	55.37	0.0213	NB
170-172	79:21	s,v	60:17_70:17	79:21	71.25	59.74	0.0213	0.55
173-174	79:21	s,v	101:28_61:40	70:30	ND	76.9	ND	3.44
94-175	78:22	s,v	79:12_85:7	90:10	72.38	60.9	0.144	ND
157-176	77:23	s,v	65:6_66:12	88:12	76.9	58.86	3.44	0.212
177-157	77:23	s,v	63:37_86:12	77:23	ND	76.9	ND	3.44
157-178	77:23	s,v	52:18_64:21	75:25	76.9	63.59	3.44	0.174
179-180	75:25	s,v	102:4_104:3_105:2_81:3_92:3_96:1_96:3_99:2_99:3	97:03	27.52	74.17	NB	4.125 (0.35)
181-138	75:25	s,v	46:21_46:34_97:20	69:31	72.87 75.84 (0.7)	ND 75.745 (0.11)	0.0729	ND
182-183	74:26	s,v	66:12_69:15_69:7_72:1_72:11_75:12_76:9_80:8_82:7	89:11	61.7	NB	0.42	
86-184	70:30	s	72:27	72:28	71.25	ND	0.0213	ND
185-138	69:31	s,v	46:21_46:34_97:20	69:31	73.78	ND	0.177	ND
186-187	68:32	s,v	57:30_62:31	66:34	74.74	60.9	0.0109	ND
187-188	66:34	s	66:22	75:25	60.9	ND	ND	ND
189-157	64:36	s,v	63:37_86:12	77:23	ND	76.9	ND	3.44
190-191	64:36	s,v	48:27_49:27_53:33	64:36	ND	76.9	ND	3.44
192-193	99:01	s	88:01	99:01	ND	ND	ND	ND
194-195	99:01	s	69:01	99:01	ND	ND	ND	ND
196-197	99:01	s	66:03	96:04	ND	ND	ND	ND

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
198-199	99:01	s,v	68:15_74:21	80:20	55.37	68.63	NB	1.78
200-146	98:02	s,v	83:6_98:3	95:05	70.74	60.35	0.163	5.62
81-201	98:02	s,v	69:21_86:10	84:16	67.01	ND	0.0631	ND
82-201	98:02	s,v	69:21_86:10	84:16	67.53	ND	0.0871	ND
202-203	98:02	s,v	79:28_80:14	80:20	70.92	27.52	1.54	NB
204-179	98:02	s,v	64:26_69:26_69:28_75:25_77:26_78:26_83:22_86:16_95:8	75:25	64.69	27.52	NB	NB
202-205	98:02	s,v	60:33_77:17	74:26	70.92	64.56	1.54	1.22
200-147	98:02	s,v	48:24_63:33	66:34	70.74	ND	0.163	ND
206-136	98:02	s,v	47:31_53:39_93:38	60:40	ND	ND	ND	ND
126-132	96:04	s,v	76:6_95:3	95:05	70.74	58.03	0.163	2.99
207-203	95:05	s,v	79:28_80:14	80:20	ND	27.52	ND	NB
207-205	95:05	s,v	60:33_77:17	74:26	ND	64.56	ND	1.22
208-209	94:06	s	89:03	97:03	ND	ND	ND	ND
210-138	94:06	s,v	46:21_46:34_97:20	69:31	70.74	ND	0.163	ND
121-175	93:07	s,v	79:12_85:7	90:10	70.69	60.9	0.1785 (0.007)	ND
211-212	92:08	s	88:02_122:01	98:01	ND	68.62	ND	0.052
213-214	92:08	s,v	51:35_66:14_76:32	70:30	55.83	67.29	0.832	0.861
215-216	92:08	s	66:35	66:34	ND	ND	ND	ND
115-217	91:09	s,v	79:2_97:2	98:02	67.79	58.76	0.127	7.89
115-218	91:09	s,v	62:11_94:3	93:07	67.79	ND	0.127	ND

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H2-L2のTm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
123-219	91:09	s,v	80:13_91:7	90:10	67.79	60.9	0.127	ND
117-217	90:10	s,v	79:2_97:2	98:02	69.62	58.76	0.101	7.89
117-218	90:10	s,v	62:11_94:3	93:07	69.62	ND	0.101	ND
220-199	90:10	s,v	68:15_74:21	80:20	59.74	68.63	0.55	1.78
118-143	89:11	s,v	94:1_97:1	99:01	70.69	58.76	0.1785 (0.007)	7.89
118-144	89:11	s,v	105:3_57:5_97:1	97:03	70.69	ND	0.1785 (0.007)	ND
221-222	88:12	s	71:42	63:37	ND	ND	ND	ND
223-179	87:13	s,v	64:26_69:26_69:28_75:25_77:26_78:26_83:22_86:16_95:8	75:25	ND	27.52	ND	NB
224-225	86:14	s	52:29	64:36	ND	68.62	ND	0.052
226-227	85:15	s,v	73:19_91:7	87:13	66.94	ND	0.0134	ND
226-228	85:15	s,v	67:31_72:20	74:26	66.94	61.43	0.0134	2.51
229-230	84:16	s,v	76:2_79:1	98:02	69.875 (0.03)	61.7	NB	0.42
201-83	84:16	v	84:03	96:04	ND	68.37	ND	0.0828
231-232	82:18	s	92:07	93:07	ND	ND	ND	ND
233-131	80:20	s,v	81:16_88:10	87:13	65.72	68.63	0.0348	1.78
234-235	79:21	s,v	102:1_106:2	99:01	ND	66.67	ND	0.0511
236-237	79:21	s	108:02	98:02	ND	ND	ND	ND
234-238	79:21	s	98:04	97:03	ND	70.11	ND	0.0816
239-240	79:21	s	79:10	89:11	65.72	ND	0.0348	ND

【０３２３】

（表１５）

固有の識別名セット	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1のTmの場合の範囲) (°C)	H2-L2のTmの場合の範囲) (°C)	H1-L1の抗原親和性(KD)の場合の範囲) (nM)	H2-L2の抗原親和性(KD)の場合の範囲) (nM)
241-242	79:21	s,v	36:25_41:25_58:7_67:6	78:22	60.9	56.17	ND	ND
239-243	79:21	s,v	54:24_69:18	75:25	65.72	62.29	0.0348	0.984
242-244	78:22	s,v	53:17_59:27_67:19	75:25	56.17	ND	ND	ND
179-245	75:25	s,v	79:3_89:1	98:02	27.52	67.82	NB	3.4 (2.52)
246-225	74:26	s	52:29	64:36	ND	68.62	ND	0.052
247-248	73:27	s,v	50:32_56:22	67:33	27.52	ND	NB	ND
125-219	72:28	s,v	80:13_91:7	90:10	69.62	60.9	0.101	ND
249-250	67:33	s,v	43:26_43:27_53:19	62:38	66.54	ND	0.197 0.1247	ND
251-240	66:34	s	79:10	89:11	68.1	ND	(0.0646)	ND
252-227	66:34	s,v	73:19_91:7	87:13	ND	ND	ND 0.1247	ND
251-243	66:34	s,v	54:24_69:18	75:25	68.1	62.29	(0.0646)	0.984
252-228	66:34	s,v	67:31_72:20	74:26	ND	61.43	ND	2.51
253-120	65:35	s,v	61:35_74:19	72:28	ND	67.29	ND	0.861
254-255	64:36	s,v	73:2_41:33	88:12	63.91	ND	0.0792	ND
250-256	62:38	s,v	59:20_63:19_74:11	77:23	ND	ND	ND	ND

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
257-258	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
259-260	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124K_T178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
261-262	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172R	V133G_S176R	L124R_H172A	V133G_S174W_S176D
263-264	定常	静電気的	L124E	V133G_S176R	L124R	V133G_S176D
265-266	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124K_T178R	S186R	Q124E
267-268	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172R	V133G_S176R	L124R_H172A	V133A_S174W_S176D
269-270	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172W	V133G_S176R	L124R_H172T	V133G_S174R_S176D
271-272	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172R	V133A_S176K	L124R_H172A	V133A_S174W_S176D
273-274	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	Q39E	Q38R_F98W	Q39R_F100W_W103F	Q38E_F98M
275-276	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172W	V133A_S176K	L124R_H172T	V133G_S174R_S176D
277-278	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	L143R	Q124E
277-279	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	WT	Q124E

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
277-280	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	S186R	Q124E
277-281	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	L143K	Q124E
282-283	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	S186R	T178E
284-285	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
286-287	定常	組み合わせ(静電気的+立体的)	L124E_H172W	V133G_S176R	L124R_H172T	V133A_S174R_S176D
288-289	定常	静電気的および立体的	L124E	V133G_S176R	L124R	V133A_S176D
290-291	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124K	L143K	Q124E
290-292	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124K	S186R	Q124E
290-293	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124K	L143R	Q124E
294-295	定常	静電気的および立体的	L124E	V133A_S176K	L124R	V133G_S176D
296-297	可変	立体的	F100W	F98M	W103F	Y36W
298-297	可変	立体的	F100W_W103F	F98M	W103F	Y36W
299-300	可変	立体的	L45A	P44F	V37W	F98A
301-302	可変	静電気的	Q39E	Q38N_T85R	Q39R	Q38E_T85E
303-278	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143R	Q124E
303-279	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124R	WT	Q124E
303-280	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	Q124E
303-281	定常	静電気的	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	Q124E

固有の識別名セット	H-L ジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1 Tm (°C)	H2-L2 Tm (°C)
257-258	無	s	93:3	97:3	v	94:11	89:11	ND	ND
259-260	無	v	90:6	94:6	v	91:29	76:24	ND	ND
261-262	無	v_s	99:8_94:8	93:7	v_s	48:21_58:15	75:25	77.7	76
263-264	無	v_s	95:5_68:25	88:12	v_s	70:29_101:9	84:16	76.96	ND
265-266	無	v	90:13	87:13	v	96:6	94:6		ND
267-268	無	v_s_s	86:12_80:12_85:19	87:13	v_s	52:22_51:16	73:27	77.7	ND
269-270	無	v_s	82:15_76:13	85:15	v_s	89:13_84:11	88:12	76.43	77.04
271-272	無	v_s	90:19_74:16	82:18	v_s	49:35_46:19	65:35	76.49	ND
273-274	無	v_s	73:11_54:19	81:19	v_s	56:45_80:4	84:16	74.32	70.41
275-276	無	v_s	75:18_60:15	80:20	v_s	82:21_79:18	80:20	75.62	77.04
277-278	無	v	93:26	78:22	s	77:20	79:21	ND	76.56
277-279	無	v	93:26	78:22	v_v_s	81:24_76:22_77:8	78:22	ND	ND
277-280	無	v	93:26	78:22	v	86:30	74:26	ND	ND
277-281	無	v	93:26	78:22	v_s_s	70:29_97:10_31:35	71:29	ND	ND
282-283	無	v	92:28	77:23	v	68:30	70:30	ND	76.03
284-285	無	v	82:26	76:24	v	94:9	92:8	ND	ND
286-287	無	v_s	68:30_64:21	72:28	v_s	83:18_83:14	84:16	76.43	77.12
288-289	無	v_s	58:46_59:16	68:32	v_s	83:12_81:8	89:11	76.96	77.45
290-291	無	v_s	75:26_47:32	68:32	s	88:6	93:7	76.95	ND
290-292	無	v_s	75:26_47:32	68:32	v	87:7	92:8	76.95	ND
290-293	無	v_s	75:26_47:32	68:32	v_s	84:20_87:25	79:21	76.95	76.56
294-295	無	v_s	69:35_49:30	64:36	v_s	68:40_42:22	64:36	76.07	ND
296-297	無	v_s	70:38_65:38	64:36	v_s	53:41_77:43	61:39	72.27	73.15

【０３２４】
（表１６）

固有の識別名セット	H-L ジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)	スクリーニングのみ/検証のみ/H1-L1:H1-L2についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニングのみ/検証のみ/H2-L2:H2-L1についてのスクリーニングおよび検証データ (s/v/s_v)	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H1-L1 Tm (°C)	H2-L2 Tm (°C)
298-297	無	v_s	67:45_62:36	62:38	v_s	53:41_77:43	61:39	71.38	73.15
299-300	無	v_s	59:48_60:33	60:40	v_s	92:11_81:17	86:14	71.4	78.545
301-302	無	v_s_s	66:44_45:31_62:31	60:40	v_s	64:39_86:27	69:31	ND	71.37
303-278	無	v_s_s	70:52_59:41_76:27	59:41	s	77:20	79:21	ND	76.56
303-279	無	v_s_s	70:52_59:41_76:27	59:41	v_v_s	81:24_76:22_77:8	78:22	ND	ND
303-280	無	v_s_s	70:52_59:41_76:27	59:41	v	86:30	74:26	ND	ND
303-281	無	v_s_s	70:52_59:41_76:27	59:41	v_s_s	70:29_97:10_31:35	71:29	ND	ND

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
	A		TRAS		TRAS		FLAG	TRAS		HA
58		静電気的	TRAS	L143E_K145T	TRAS	Q124R	FLAG	TRAS	Q124E_V133D	HA
304*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139W_S186K	TRAS	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	TRAS	L135W	HA
305*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	V37W	TRAS	F98A	FLAG	TRAS	Q38E	HA
26		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	V37W_Q39E	TRAS	Q38R_F98A	FLAG	TRAS	Q38E_F98W	HA
57		静電気的	TRAS	L143K_D146G	TRAS	Q124E_V133D	HA	TRAS	Q124R	FLAG
306*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	TRAS	L135W	HA	TRAS	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG
307*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E	HA	TRAS	F98A	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
93		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E_F98W	HA	TRAS	Q38R_F98A	FLAG
72		静電気的	TRAS	D146G_Q179R	TRAS	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	TRAS	Q160K_T178R	HA
3		立体的	TRAS	F174V_P175S_S188G	TRAS	S176L	FLAG	TRAS	V133S	HA
108		立体的	TRAS	A139W	TRAS	F116A_L135A	FLAG	TRAS	L135W	HA
308*		立体的	TRAS	L124W	TRAS	F118A	FLAG	TRAS	WT	HA
52		静電気的	TRAS	Q39E	TRAS	Q38R	FLAG	TRAS	Q38E	HA
309*		静電気的	TRAS	V37E_M100D	TRAS	Q89R_F98W	FLAG	TRAS	WT	HA
54		静電気的	TRAS	WT	TRAS	WT	FLAG	TRAS	Q38E	HA
65		静電気的	TRAS	K145T_Q179D_S188L	TRAS	Q160K_T178R	HA	TRAS	Q124E_Q160E_T178D	FLAG
19		立体的	TRAS	S188L_V190Y	TRAS	V133S	HA	TRAS	S176L	FLAG
107		立体的	TRAS	A139G_V190A	TRAS	L135W	HA	TRAS	F116A_L135A	FLAG
51		静電気的	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E	HA	TRAS	Q38R	FLAG
310*		静電気的	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	TRAS	Q89R_F98W	FLAG
311*		静電気的	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	TRAS	Q89R_F98T	FLAG
53		静電気的	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E	HA	TRAS	WT	FLAG
312*		立体的	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	TRAS	F98A	FLAG
	B		TRAS		TRAS		FLAG	D3H44		HA
	C		TRAS		TRAS		HA	D3H44		FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
						V133A_Q160K_T17			Q124E_V133W_Q160E_T1	
67		静電気的	TRAS	K145T_Q179D_S188F	TRAS	8R	FLAG	D3H44	80E	HA
58		静電気的	TRAS	L143E_K145T	TRAS	Q124R Q124E_V133W_Q1	FLAG	D3H44	Q124E_V133D	HA
66		静電気的	TRAS	L143A_D146G_Q179R	TRAS	60E_T180E	FLAG	D3H44	V133A_Q160K_T178R	HA
304*		組み合わせ（立体的＋静電気的）	TRAS	A139W_S186K	TRAS	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	D3H44	L135W	HA
165		組み合わせ（立体的＋静電気的）	TRAS	A139W	TRAS	F116A_L135A	FLAG	D3H44	S131R_L135W	HA
307*		組み合わせ（立体的＋静電気的）	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E	FLAG	D3H44	F98A	HA
26		組み合わせ（立体的＋静電気的）	TRAS	V37W_Q39E	TRAS	Q38R_F98A	FLAG	D3H44	Q38E_F98W	HA
313*		立体的	TRAS	V37W	TRAS	F98A	FLAG	D3H44	P44W	HA
306*		組み合わせ（立体的＋静電気的）	TRAS	A139G_K145T_D146G_Q17 9E_V190A	TRAS	L135W	HA	D3H44	F116A_Q124E_L135A_T18 0E	FLAG
57		静電気的	TRAS	L143K_D146G	TRAS	Q124E_V133D	HA	D3H44	Q124R	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
93		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E_F98W	HA	D3H44	Q38R_F98A	FLAG
3		立体的	TRAS	F174V_P175S_S188G	TRAS	S176L	FLAG	D3H44	V133S	HA
108		立体的	TRAS	A139W	TRAS	F116A_L135A	FLAG	D3H44	L135W	HA
314*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139V_K145L_Q179E_S188G_V190S	TRAS	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	FLAG	D3H44	F118W_V133S_S176A_T180E	HA
164		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139G_K145L_Q179E_V190A	TRAS	S131R_L135W	FLAG	D3H44	F116A_L135A	HA
72		静電気的	TRAS	D146G_Q179R	TRAS	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	D3H44	Q160K_T178R	HA
315*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139W_S186K_S188A	TRAS	F118W_V133S_S176A_T180E	FLAG	D3H44	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	HA
51		静電気的	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E	FLAG	D3H44	Q38R	HA
309*		静電気的	TRAS	V37E_M100D	TRAS	Q89R_F98W	FLAG	D3H44	WT	HA
316*		静電気的	TRAS	V37E	TRAS	Q89R_F98T	FLAG	D3H44	WT	HA
317*		静電気的	TRAS	V37S_S93K	TRAS	F98Y	FLAG	D3H44	L89R_F98W	HA
318*		静電気的	TRAS	V37E_M100D	TRAS	Q89R_F98W	FLAG	D3H44	F98Y	HA

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
19		立体的	TRAS	S188L_V190Y	TRAS	V133S	HA	D3H44	S176L	FLAG
107		立体的	TRAS	A139G_V190A	TRAS	L135W	HA	D3H44	F116A_L135A	FLAG
102		静電気的	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	D3H44	L89R_F98T	FLAG
	D		PERT		PERT		FLAG	TRAS		HA
58		静電気的	PERT	L143E_K145T	PERT	Q124R	FLAG	TRAS	Q124E_V133D	HA
304*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139W_S186K	PERT	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	TRAS	L135W	HA
26		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	V37W_Q39E	PERT	Q38R_F98A	FLAG	TRAS	Q38E_F98W	HA
72		静電気的	PERT	D146G_Q179R	PERT	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	TRAS	Q160K_T178R	HA
3		立体的	PERT	F174V_P175S_S188G	PERT	S176L	FLAG	TRAS	V133S	HA
108		立体的	PERT	A139W	PERT	F116A_L135A	FLAG	TRAS	L135W	HA
308*		立体的	PERT	L124W	PERT	F118A	FLAG	TRAS	WT	HA
52		静電気的	PERT	Q39E	PERT	Q38R	FLAG	TRAS	Q38E	HA
319*		静電気的	PERT	V37E_F100D	PERT	Q89R_F98W	FLAG	TRAS	WT	HA
	E		PERT		PERT		FLAG	PERT		HA

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
72		静電気的	PERT	D146G_Q179R	PERT	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	PERT	Q160K_T178R	HA
58		静電気的	PERT	L143E_K145T	PERT	Q124R	FLAG	PERT	Q124E_V133D	HA
3		立体的	PERT	F174V_P175S_S188G	PERT	S176L	FLAG	PERT	V133S	HA
304*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139W_S186K	PERT	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	PERT	L135W	HA
308*		立体的	PERT	L124W	PERT	F118A	FLAG	PERT	WT	HA
52		静電気的	PERT	Q39E	PERT	Q38R	FLAG	PERT	Q38E	HA
319*		静電気的	PERT	V37E_F100D	PERT	Q89R_F98W	FLAG	PERT	WT	HA
305*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	V37W	PERT	F98A	FLAG	PERT	Q38E	HA
26		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	V37W_Q39E	PERT	Q38R_F98A	FLAG	PERT	Q38E_F98W	HA
65		静電気的	PERT	K145T_Q179D_S188L	PERT	Q160K_T178R	HA	PERT	Q124E_Q160E_T178D	FLAG
57		静電気的	PERT	L143K_D146G	PERT	Q124E_V133D	HA	PERT	Q124R	FLAG
107		立体的	PERT	A139G_V190A	PERT	L135W	HA	PERT	F116A_L135A	FLAG
306*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	PERT	L135W	HA	PERT	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
51		静電気的	PERT	Q39R	PERT	Q38E	HA	PERT	Q38R	FLAG
310*		静電気的	PERT	WT	PERT	WT	HA	PERT	Q89R_F98W	FLAG
311*		静電気的	PERT	WT	PERT	WT	HA	PERT	Q89R_F98T	FLAG
307*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT	Q38E	HA	PERT	F98A	FLAG
53		静電気的	PERT	Q39R	PERT	Q38E	HA	PERT	WT	FLAG
312*		立体的	PERT	WT	PERT	WT	HA	PERT	F98A	FLAG
93		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT	Q38E_F98W	HA	PERT	Q38R_F98A	FLAG
108		立体的	PERT	A139W	PERT	F116A_L135A	FLAG	PERT	L135W	HA
19		立体的	PERT	S188L_V190Y	PERT	V133S	HA	PERT	S176L	FLAG
320*		立体的	PERT	L124S	PERT	WT	HA	PERT	F118A	FLAG
	F		PERT		PERT		FLAG	D3H44		HA
	G		PERT		PERT		HA	D3H44		FLAG
58		静電気的	PERT	L143E_K145T	PERT	Q124R	FLAG	D3H44	Q124E_V133D	HA
3		立体的	PERT	F174V_P175S_S188G	PERT	S176L	FLAG	D3H44	V133S	HA

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
108		立体的	PERT	A139W	PERT	F116A_L135A	FLAG	D3H44	L135W	HA
66		静電気的	PERT	L143A_D146G_Q179R	PERT	Q124E_V133W_Q160E_T180E	FLAG	D3H44	V133A_Q160K_T178R	HA
304*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139W_S186K	PERT	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	D3H44	L135W	HA
315*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139W_S186K_S188A	PERT	F118W_V133S_S176A_T180E	FLAG	D3H44	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	HA
165		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139W	PERT	F116A_L135A	FLAG	D3H44	S131R_L135W	HA
51		静電気的	PERT	Q39R	PERT	Q38E	FLAG	D3H44	Q38R	HA
307*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT	Q38E	FLAG	D3H44	F98A	HA
26		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	V37W_Q39E	PERT	Q38R_F98A	FLAG	D3H44	Q38E_F98W	HA
65		静電気的	PERT	K145T_Q179D_S188L	PERT	Q160K_T178R	HA	D3H44	Q124E_Q160E_T178D	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
306*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	PERT	L135W	HA	D3H44	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG
57		静電気的	PERT	L143K_D146G	PERT	Q124E_V133D	HA	D3H44	Q124R	FLAG
93		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT	Q38E_F98W	HA	D3H44	Q38R_F98A	FLAG
314*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139V_K145L_Q179E_S188G_V190S	PERT	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	FLAG	D3H44	F118W_V133S_S176A_T180E	HA
72		静電気的	PERT	D146G_Q179R	PERT	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	D3H44	Q160K_T178R	HA
53		静電気的	PERT	Q39R	PERT	Q38E	FLAG	D3H44	WT	HA
321*		立体的	PERT	V37W_L45W	PERT	Y87A_F98A	FLAG	D3H44	Y87W_G101I	HA
52		静電気的	PERT	Q39E	PERT	Q38R	FLAG	D3H44	Q38E	HA
48		静電気的	PERT	WT	PERT	WT	FLAG	D3H44	L89R_F98W	HA
322*		立体的	PERT	L45A	PERT	Y87W_G101I	FLAG	D3H44	Y87A_F98A	HA
323*		立体的	PERT	W103V	PERT	P44W_Q89W_F98A	FLAG	D3H44	F98A	HA
19		立体的	PERT	S188L_V190Y	PERT	V133S	HA	D3H44	S176L	FLAG
107		立体的	PERT	A139G_V190A	PERT	L135W	HA	D3H44	F116A_L135A	FLAG
320*		立体的	PERT	L124S	PERT	WT	HA	D3H44	F118A	FLAG
102		静電気的	PERT	WT	PERT	WT	HA	D3H44	L89R_F98T	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
	H		D3H44		D3H44		FLAG	TRAS		HA
	I		D3H44		D3H44		HA	TRAS		FLAG
57		静電気的	D3H44	L143K_D146G	D3H44	Q124E_V133D	HA	TRAS	Q124R	FLAG
72		静電気的	D3H44	D146G_Q179R	D3H44	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	TRAS	Q160K_T178R	HA
66		静電気的	D3H44	L143A_D146G_Q179R	D3H44	Q124E_V133W_Q160E_T180E	HA	TRAS	V133A_Q160K_T178R	FLAG
182		静電気的	D3H44	V37E_F100D	D3H44	L89R_F98W	HA	TRAS	F98Y	FLAG
47		静電気的	D3H44	V37E_F100D	D3H44	L89R_F98W	HA	TRAS	WT	FLAG
324*		立体的	D3H44	V37W_F100W	D3H44	F98A	HA	TRAS	P44W_Q89W_F98A	FLAG
	J		D3H44		D3H44		FLAG	PERT		HA
	K		D3H44		D3H44		HA	PERT		FLAG
26		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	V37W_Q39E	D3H44	Q38R_F98A	FLAG	PERT	Q38E_F98W	HA
66		静電気的	D3H44	L143A_D146G_Q179R	D3H44	Q124E_V133W_Q160E_T180E	HA	PERT	V133A_Q160K_T178R	FLAG
57		静電気的	D3H44	L143K_D146G	D3H44	Q124E_V133D	HA	PERT	Q124R	FLAG
165		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	A139W	D3H44	F116A_L135A	HA	PERT	S131R_L135W	FLAG

固有の識別名	REF_WT または VAR	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ
313*		立体的	D3H44	V37W	D3H44	F98A	HA	PERT	P44W	FLAG
305*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	V37W	D3H44	F98A	HA	PERT	Q38E	FLAG
93		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	Q39R	D3H44	Q38E_F98W	HA	PERT	Q38R_F98A	FLAG
307*		組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	Q39R	D3H44	Q38E	HA	PERT	F98A	FLAG
310*		静電気的	D3H44	WT	D3H44	WT	HA	PERT	Q89R_F98W	FLAG
311*		静電気的	D3H44	WT	D3H44	WT	HA	PERT	Q89R_F98T	FLAG
182		静電気的	D3H44	V37E_F100D	D3H44	L89R_F98W	HA	PERT	F98Y	FLAG
325*		立体的	D3H44	V37W	D3H44	F98A	HA	PERT	F98W	FLAG
47		静電気的	D3H44	V37E_F100D	D3H44	L89R_F98W	HA	PERT	WT	FLAG
324*		立体的	D3H44	V37W_F100W	D3H44	F98A	HA	PERT	P44W_Q89W_F98A	FLAG

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
	無	明らかなタグ依存性。PERT系と同様に、HA-タグを有する場合と同様の問題がある可能性が高いが程度は低い	6	66:34_57:36_66:43_54:36_58:43_58:43	61:39	0.4295	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
58	無		2	104:1_77:2	99:01	4.288	A	61:39	0.4295	3.86
304*	無		2	103:1_92:1	99:01	4.548	A	61:39	0.4295	4.12
305*	無		2	73:17_73:20	80:20	1.402	A	61:39	0.4295	0.97
26	無		2	87:1_79:1	99:01	4.423	A	61:39	0.4295	3.99
57	無		2	89:1_89:1	99:01	4.488	A	39:61	-0.4295	4.92
306*	無		2	76:1_69:2	98:02	3.797	A	39:61	-0.4295	4.23
307*	無		2	92:1_74:2	98:02	4.1395	A	39:61	-0.4295	4.57
93	無		2	103:1_73:1	99:01	4.4615	A	39:61	-0.4295	4.89
72	無		1	66:13	84:16	1.644	A	61:39	0.4295	1.21
3	無		1	92:02	98:02	4.016	A	61:39	0.4295	3.59
108	無		1	70:14	83:17	1.584	A	61:39	0.4295	1.15
308*	無		1	66:28	70:30	0.864	A	61:39	0.4295	0.43
52	無		1	73:18	80:20	1.413	A	61:39	0.4295	0.98
309*	無		1	78:17	82:18	1.499	A	61:39	0.4295	1.07
54	無		1	63:15	81:19	1.459	A	61:39	0.4295	1.03
65	無		1	56:33	63:37	0.529	A	39:61	-0.4295	0.96
19	無		1	59:35	63:37	0.527	A	39:61	-0.4295	0.96
107	無		1	58:19	75:25	1.122	A	39:61	-0.4295	1.55
51	無		1	55:35	61:39	0.451	A	39:61	-0.4295	0.88

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
310*	無		1	87:06	94:06	2.7	A	39:61	-0.4295	3.13
311*	無		1	92:01	99:01	4.52	A	39:61	-0.4295	4.95
53	無		1	59:32	65:35	0.613	A	39:61	-0.4295	1.04
312*	無		1	84:05	94:06	2.814	A	39:61	-0.4295	3.24
	無	L_D3H44を上回るL_TRASに対するH_TRASの優先性	5	70:16_84:21_84:21_72:44_66:50	80:20	1.369	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
	無		5	107:15_107:18_86:17_89:18_61:19	84:16	1.622	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
67	無		2	115:1_104:1	99:01	4.6925	B	80:20	1.369	3.32
58	無		2	105:1_94:1	99:01	4.5975	B	80:20	1.369	3.23
66	無		2	102:1_83:2	99:01	4.246	B	80:20	1.369	2.88
304*	無		2	98:1_68:1	99:01	4.3965	B	80:20	1.369	3.03
165	無		2	103:1_83:1	99:01	4.5225	B	80:20	1.369	3.15
307*	無		2	102:2_73:9	96:04	3.0565	B	80:20	1.369	1.69
26	無		2	91:2_87:11	95:05	2.9825	B	80:20	1.369	1.61
313*	無		2	92:3_91:11	94:06	2.801	B	80:20	1.369	1.43
306*	無		2	108:1_90:1	99:01	4.59	C	84:16	1.622	2.97
57	無		2	104:1_88:1	99:01	4.56	C	84:16	1.622	2.94
93	無		2	96:1_87:1	99:01	4.5175	C	84:16	1.622	2.9
3	無		1	77:02	97:03	3.499	B	80:20	1.369	2.13
108	無		1	80:01	99:01	4.377	B	80:20	1.369	3.01
314*	無		1	88:01	99:01	4.477	B	80:20	1.369	3.11
164	無		1	84:01	99:01	4.426	B	80:20	1.369	3.06
72	無		1	72:01	99:01	4.275	B	80:20	1.369	2.91
315*	無		1	107:03	97:03	3.426	B	80:20	1.369	2.06

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
51	無		1	73:12	86:14	1.825	B	80:20	1.369	0.46
309*	無		1	110:05	95:05	3.009	B	80:20	1.369	1.64
316*	無		1	97:10	91:09	2.278	B	80:20	1.369	0.91
317*	無		1	72:12	86:14	1.791	B	80:20	1.369	0.42
318*	無		1	99:07	94:06	2.689	B	80:20	1.369	1.32
19	無		1	92:13	87:13	1.943	C	84:16	1.622	0.32
107	無		1	86:02	98:02	4.053	C	84:16	1.622	2.43
102	無		1	111:01	99:01	4.708	C	84:16	1.622	3.09
	無	L_TRASを上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性がある可能性がない	5	68:43_66:42_55:56_56:58_48:60	49:51	-0.026	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
58	無		2	84:5_70:23	88:12	1.981	D	49:51	-0.026	2.01
304*	無		2	77:22_75:23	77:23	1.221	D	49:51	-0.026	1.25
26	無		2	82:10_79:12	88:12	1.9955	D	49:51	-0.026	2.02
72	無		1	83:13	87:13	1.891	D	49:51	-0.026	1.92
3	無		1	72:12	86:14	1.794	D	49:51	-0.026	1.82
108	無		1	78:32	71:29	0.897	D	49:51	-0.026	0.92
308*	無		1	62:36	64:36	0.557	D	49:51	-0.026	0.58
52	無		1	62:35	64:36	0.573	D	49:51	-0.026	0.6
319*	無		1	92:01	99:01	4.524	D	49:51	-0.026	4.55
	無	明らかなタグ依存性が観察された。観察された比は、対合を有するタグ界面というよりはむしろ、HAタグの切断による可能性が高い	10	81:20_79:20_70:29_78:34_78:47_57:35_56:36_65:53_65:53_53:50	62:38	0.4975	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず

固有の識別名	H-L ジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1: H1-L2 スカラー (中央値)	VARについての REF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2 スカラー (中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
72	無		2	101:1_79:8	97:03	3.477	E	62:38	0.4975	2.98
58	無		2	99:1_97:1	99:01	4.4065	E	62:38	0.4975	3.91
3	無		2	102:1_94:1	99:01	4.585	E	62:38	0.4975	4.09
304*	無		2	97:1_101:3	98:02	3.981	E	62:38	0.4975	3.48
308*	無		2	72:21_69:23	76:24	1.17	E	62:38	0.4975	0.67
52	無		2	82:8_96:10	91:09	2.323	E	62:38	0.4975	1.83
319*	無		2	76:1_94:2	98:02	4.0915	E	62:38	0.4975	3.59
305*	無		2	90:9_79:17	87:13	1.9365	E	62:38	0.4975	1.44
26	無		2	101:1_98:1	99:01	4.6015	E	62:38	0.4975	4.1
65	無		2	97:8_73:13	89:11	2.106	E	38:62	-0.4975	2.6
57	無		2	110:1_94:1	99:01	4.6195	E	38:62	-0.4975	5.12
107	無		2	92:3_78:2	97:03	3.546	E	38:62	-0.4975	4.04
306*	無		2	102:1_96:1	99:01	4.5905	E	38:62	-0.4975	5.09
51	無		2	125:6_75:15	91:09	2.312	E	38:62	-0.4975	2.81
310*	無		2	110:9_75:13	89:11	2.1055	E	38:62	-0.4975	2.6
311*	無		2	126:2_88:3	98:02	3.7895	E	38:62	-0.4975	4.29
307*	無		2	124:1_95:1	99:01	4.688	E	38:62	-0.4975	5.19
53	無		2	112:8_70:33	85:15	1.7115	E	38:62	-0.4975	2.21
312*	無		2	105:20_66:35	76:24	1.146	E	38:62	-0.4975	1.64
93	無		2	103:1_82:1	99:01	4.522	E	38:62	-0.4975	5.02
108	無		1	63:27	70:30	0.857	E	62:38	0.4975	0.36
19	無		2	81:45_60:41	62:38	0.472	E	38:62	-0.4975	0.97
320*	無		2	53:34_63:44	60:40	0.405	E	38:62	-0.4975	0.9

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
	無	L_D3H44を上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性	7	106:1_104:1_123:2_105:6_126:9_102:7_113:15	94:06	2.804	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
	無		5	98:26_68:23_68:25_65:44_67:46	73:27	0.998	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
58	無		2	112:1_99:10	97:03	3.515	F	94:06	2.804	0.71
3	無		6	111:1_105:1_104:1_97:1_94:1_90:1	99:01	4.6135	F	94:06	2.804	1.81
108	無		6	96:1_92:1_103:1_109:2_113:3_102:3	99:01	4.2365	F	94:06	2.804	1.43
66	無		2	117:1_110:1	99:01	4.731	F	94:06	2.804	1.93
304*	無		2	106:1_84:1	99:01	4.55	F	94:06	2.804	1.75
315*	無		2	111:1_115:25	96:04	3.12	F	94:06	2.804	0.32
165	無		2	109:1_109:12	97:03	3.46	F	94:06	2.804	0.66
51	無		6	106:1_106:2_98:2_97:2_110:3_97:3	98:02	3.7925	F	94:06	2.804	0.99
307*	無		6	113:1_97:1_83:1_108:2_100:2_115:2	99:01	4.2825	F	94:06	2.804	1.48
26	無		2	101:1_84:1	99:01	4.4435	F	94:06	2.804	1.64
65	無		2	98:1_63:1	99:01	4.3665	G	73:27	0.998	3.37
306*	無		2	119:1_112:1	99:01	4.7495	G	73:27	0.998	3.75
57	無		2	125:1_107:1	99:01	4.7505	G	73:27	0.998	3.75
93	無		2	89:1_88:6	97:03	3.5745	G	73:27	0.998	2.58
314*	無		1	108:01	99:01	4.684	F	94:06	2.804	1.88
72	無		1	95:01	99:01	4.328	F	94:06	2.804	1.52
53	無		1	116:02	98:02	3.927	F	94:06	2.804	1.12

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
321*	無		1	90:03	97:03	3.496	F	94:06	2.804	0.69
52	無		1	105:01	99:01	4.654	F	94:06	2.804	1.85
48	無		1	112:01	99:01	4.336	F	94:06	2.804	1.53
322*	無		1	97:01	99:01	4.575	F	94:06	2.804	1.77
323*	無		1	71:01	99:01	4.267	F	94:06	2.804	1.46
19	無		1	101:15	87:13	1.927	G	73:27	0.998	0.93
107	無		1	102:01	99:01	4.623	G	73:27	0.998	3.63
320*	無		1	79:06	93:07	2.573	G	73:27	0.998	1.58
102	無		1	113:03	97:03	3.52	G	73:27	0.998	2.52
	無	L_D3H44を上回るL_TRASに対するH_D3H44の優先性	5	36:59_36:59_35:86_31:87_20:67	29:71	-0.894	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
	無		5	50:58_49:61_34:68_21:71_21:76	33:67	-0.701	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
57	無		2	100:1_85:4	98:02	3.832	I	33:67	-0.701	4.53
72	無		1	67:36	65:35	0.633	H	29:71	-0.894	1.53
66	無		1	92:20	82:18	1.549	I	33:67	-0.701	2.25
182	無		1	83:03	97:03	3.41	I	33:67	-0.701	4.11
47	無		1	84:02	97:03	3.55	I	33:67	-0.701	4.25
324*	無		1	77:25	75:25	1.116	I	33:67	-0.701	1.82
	無	HA_L_D3H44を上回るFLAG_L_PERTに対するH_D3H44の優先性が一致する場合に、HAタグの問題による可能性が高いH_D3H44のFLAG_L_D3H44またはHA_L_PERTに対する観察された比の不一致	5	92:4_88:8_58:52_43:60_47:70	53:47	0.119	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
	無		7	34:65_29:70_27:67_29:73_27:73_2:101_1:98	29:71	-0.909	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず

【０３２５】
（表１７）

固有の識別名	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	REF_WTについて観察された動向	スクリーニング実験の数	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	VARについてのREF_WT	正規化中央値 REF_WT H1-L1:H1-L2	REF_WT H1-L1:H1-L2スカラー(中央値)	Δ(VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2スカラー
26	無		2	96:1_69:32	94:06	2.673	J	53:47	0.119	2.55
66	無		2	82:4_92:24	90:10	2.164	K	29:71	-0.909	3.07
57	無		2	90:3_85:4	96:04	3.1675	K	29:71	-0.909	4.08
165	無		2	97:4_58:30	87:13	1.8885	K	29:71	-0.909	2.8
313*	無		2	108:1_82:27	94:06	2.7655	K	29:71	-0.909	3.67
305*	無		6	102:3_99:3_101:4_121:5_1 10:10_85:24	96:04	3.2045	K	29:71	-0.909	4.11
93	無		2	76:24_70:31	73:27	0.9895	K	29:71	-0.909	1.9
307*	無		2	80:34_70:33	69:31	0.799	K	29:71	-0.909	1.71
310*	無		1	74:39	65:35	0.638	K	29:71	-0.909	1.55
311*	無		1	75:25	75:25	1.109	K	29:71	-0.909	2.02
182	無		1	74:03	96:04	3.093	K	29:71	-0.909	4
325*	無		6	74:24_84:29_74:26_78:32_ 78:36_66:51	73:27	0.979	K	29:71	-0.909	1.89
47	無		1	82:02	97:03	3.519	K	29:71	-0.909	4.43
324*	無		1	92:17	84:16	1.675	K	29:71	-0.909	2.58

固有の識別名セット	REF_WT またはVAR1	REF_WT またはVAR2	設計タイプ	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab
58-57			静電気的	PERT	L143E_K145T	PERT
3-19			立体的	PERT	F174V_P175S_S188G	PERT
108-107			立体的	PERT	A139W	PERT
308*-320*			立体的	PERT	L124W	PERT
319*-310*			静電気的	PERT	V37E_F100D	PERT
26-93			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	V37W_Q39E	PERT
65-72			静電気的	PERT	K145T_Q179D_S188L	PERT
306*-304*			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	PERT
51-52			静電気的	PERT	Q39R	PERT
307*-305*			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT
58-57			静電気的	TRAS	L143E_K145T	TRAS
3-19			立体的	TRAS	F174V_P175S_S188G	TRAS
108-107			立体的	TRAS	A139W	TRAS
309*-310*			静電気的	TRAS	V37E_M100D	TRAS
26-93			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	V37W_Q39E	TRAS
65-72			静電気的	TRAS	K145T_Q179D_S188L	TRAS
306*-304*			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	TRAS
51-52			静電気的	TRAS	Q39R	TRAS
307*-305*			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	TRAS	Q39R	TRAS
53-54			静電気的	TRAS	Q39R	TRAS
	I	B	該当せず	D3H44		D3H44
66-67			静電気的	D3H44	L143A_D146G_Q179R	D3H44
57-58			静電気的	D3H44	L143K_D146G	D3H44
182-317*			静電気的	D3H44	V37E_F100D	D3H44

固有の識別名セット	L1_突然変異	L1_タグ	H2_Ab	H2_突然変異	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ	H-Lジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)
58-57	Q124R	FLAG	PERT	L143K_D146G	PERT	Q124E_V133D	HA	無
3-19	S176L	FLAG	PERT	S188L_V190Y	PERT	V133S	HA	無
108-107	F116A_L135A	FLAG	PERT	A139G_V190A	PERT	L135W	HA	無
308*-320*	F118A	FLAG	PERT	L124S	PERT	WT	HA	無
319*-310*	Q89R_F98W	FLAG	PERT	WT	PERT	WT	HA	無
26-93	Q38R_F98A	FLAG	PERT	Q39R	PERT	Q38E_F98W	HA	無
65-72	Q160K_T178R	HA	PERT	D146G_Q179R	PERT	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	無
306*-304*	L135W	HA	PERT	A139W_S186K	PERT	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	無
51-52	Q38E	HA	PERT	Q39E	PERT	Q38R	FLAG	無
307*-305*	Q38E	HA	PERT	V37W	PERT	F98A	FLAG	無
58-57	Q124R	FLAG	TRAS	L143K_D146G	TRAS	Q124E_V133D	HA	無
3-19	S176L	FLAG	TRAS	S188L_V190Y	TRAS	V133S	HA	無
108-107	F116A_L135A	FLAG	TRAS	A139G_V190A	TRAS	L135W	HA	無
309*-310*	Q89R_F98W	FLAG	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	無
26-93	Q38R_F98A	FLAG	TRAS	Q39R	TRAS	Q38E_F98W	HA	無
65-72	Q160K_T178R	HA	TRAS	D146G_Q179R	TRAS	Q124E_Q160E_T178D	FLAG	無
306*-304*	L135W	HA	TRAS	A139W_S186K	TRAS	F116A_Q124E_L135A_T180E	FLAG	無
51-52	Q38E	HA	TRAS	Q39E	TRAS	Q38R	FLAG	無
307*-305*	Q38E	HA	TRAS	V37W	TRAS	F98A	FLAG	無
53-54	Q38E	HA	TRAS	WT	TRAS	WT	FLAG	無
66-67	Q124E_V133W_Q160E_T180E	HA	TRAS	K145T_Q179D_S188F	TRAS	V133A_Q160K_T178R	FLAG	無
57-58	Q124E_V133D	HA	TRAS	L143E_K145T	TRAS	Q124R	FLAG	無
182-317*	L89R_F98W	HA	TRAS	V37S_S93K	TRAS	F98Y	FLAG	無

固有の識別名セット	REF_WTについて観察された動向	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	H1-L1:H1-L2 スカラー（中央値）	VAR1 についての REF_WT	正規化中央値 VAR1 H1-L1:H1-L2 についての REF_WT	VAR1 H1-L1:H1-L2 スカラーについての REF_WT（中央値）	Δ (VAR1-REF_WT) H1-L1:H1-L2 スカラー
58-57		99:1_97:1	99:01	4.4065	E	62:38	0.4975	3.91
3-19		102:1_94:1	99:01	4.585	E	62:38	0.4975	4.09
108-107		63:27	70:30	0.857	E	62:38	0.4975	0.36
308*-320*		72:21_69:23	76:24	1.17	E	62:38	0.4975	0.67
319*-310*		76:1_94:2	98:02	4.0915	E	62:38	0.4975	3.59
26-93		101:1_98:1	99:01	4.6015	E	62:38	0.4975	4.1
65-72		97:8_73:13	89:11	2.106	E	38:62	-0.4975	2.6
306*-304*		102:1_96:1	99:01	4.5905	E	38:62	-0.4975	5.09
51-52		125:6_75:15	91:09	2.312	E	38:62	-0.4975	2.81
307*-305*		124:1_95:1	99:01	4.688	E	38:62	-0.4975	5.19
58-57		104:1_77:2	99:01	4.288	A	61:39	0.4295	3.86
3-19		92:02	98:02	4.016	A	61:39	0.4295	3.59
108-107		70:14	83:17	1.584	A	61:39	0.4295	1.15
309*-310*		78:17	82:18	1.499	A	61:39	0.4295	1.07
26-93		87:1_79:1	99:01	4.423	A	61:39	0.4295	3.99
65-72		56:33	63:37	0.529	A	39:61	-0.4295	0.96
306*-304*		76:1_69:2	98:02	3.797	A	39:61	-0.4295	4.23
51-52		55:35	61:39	0.451	A	39:61	-0.4295	0.88
307*-305*		92:1_74:2	98:02	4.1395	A	39:61	-0.4295	4.57
53-54		59:32	65:35	0.613	A	39:61	-0.4295	1.04
	L_D3H44を上回るL_TRASに対するH_D3H44およびL_D3H44を上回るL_TRASに対するH_TRASの優先性	50:58_49:61_34:68_21:71_21:76	33:67	-0.701	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
66-67		92:20	82:18	1.549	I	33:67	-0.701	2.25
57-58		100:1_85:4	98:02	3.832	I	33:67	-0.701	4.53
182-317*		83:03	97:03	3.41	I	33:67	-0.701	4.11

固有の識別名セット	**H2-L2:H2-L1**	正規化中央値 **H2-L2:H2-L1**	**H2-L2:H2-L1** スカラー（中央値）	VAR2 についての REF_WT	正規化中央値VAR2 H2-L2:H2-L1についてのREF_WT	VAR2 H2-L2:H2-L1 スカラーについての REF_WT（中央値）	**Δ (VAR2-REF_WT) H2-L2:H2-L1** スカラー
58-57	110:1_94:1	99:01	4.6195	E	38:62	-0.4975	5.12
3-19	81:45_60:41	62:38	0.472	E	38:62	-0.4975	0.97
108-107	92:3_78:2	97:03	3.546	E	38:62	-0.4975	4.04
308*-320*	53:34_63:44	60:40	0.405	E	38:62	-0.4975	0.9
319*-310*	110:9_75:13	89:11	2.1055	E	38:62	-0.4975	2.6
26-93	103:1_82:1	99:01	4.522	E	38:62	-0.4975	5.02
65-72	101:1_79:8	97:03	3.477	E	62:38	0.4975	2.98
306*-304*	97:1_101:3	98:02	3.981	E	62:38	0.4975	3.48
51-52	82:8_96:10	91:09	2.323	E	62:38	0.4975	1.83
307*-305*	90:9_79:17	87:13	1.9365	E	62:38	0.4975	1.44
58-57	89:1_89:1	99:01	4.488	A	39:61	-0.4295	4.92
3-19	59:35	63:37	0.527	A	39:61	-0.4295	0.96
108-107	58:19	75:25	1.122	A	39:61	-0.4295	1.55
309*-310*	87:06	94:06	2.7	A	39:61	-0.4295	3.13
26-93	103:1_73:1	99:01	4.4615	A	39:61	-0.4295	4.89
65-72	66:13	84:16	1.644	A	61:39	0.4295	1.21
306*-304*	103:1_92:1	99:01	4.548	A	61:39	0.4295	4.12
51-52	73:18	80:20	1.413	A	61:39	0.4295	0.98
307*-305*	73:17_73:20	80:20	1.402	A	61:39	0.4295	0.97
53-54	63:15	81:19	1.459	A	61:39	0.4295	1.03
	70:16_84:21_84:21_72:44_66:50	80:20	1.369	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
66-67	115:1_104:1	99:01	4.6925	B	80:20	1.369	3.32
57-58	105:1_94:1	99:01	4.5975	B	80:20	1.369	3.23
182-317*	72:12	86:14	1.791	B	80:20	1.369	0.42

固有の識別名セット	**REF_WT** または**VAR1**	**REF_WT** または**VAR2**	設計タイプ	**H1_Ab**	**H1_突然変異**	**L1_Ab**
	K	F	該当せず	D3H44		D3H44
57-58			静電気的	D3H44	L143K_D146G	D3H44
305*-307*			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	V37W	D3H44
93-26			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	D3H44	Q39R	D3H44
48-47			静電気的	PERT	WT	PERT
323*-324*			立体的	PERT	W103V	PERT
	J	G	該当せず	D3H44		D3H44
93-26			組み合わせ（立体的 + 静電気的）	PERT	Q39R	PERT

固有の識別名セット	L1_突然変異	L1_タグ	H2_Ab	H2_突然変異	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ	H-Lジスルフィド結合の存在 (C233-C214) (有/無)
		HA	PERT		PERT		FLAG	無
57-58	Q124E_V133D	HA	PERT	L143E_K145T	PERT	Q124R	FLAG	無
305*-307*	F98A	HA	PERT	Q39R	PERT	Q38E	FLAG	無
93-26	Q38E_F98W	HA	PERT	V37W_Q39E	PERT	Q38R_F98A	FLAG	無
48-47	WT	FLAG	D3H44	V37E_F100D	D3H44	L89R_F98W	HA	無
323*-324*	P44W_Q89W_F98A	FLAG	D3H44	V37W_F100W	D3H44	F98A	HA	無
		FLAG	PERT		PERT		HA	無
93-26	Q38E_F98W	HA	D3H44	V37W_Q39E	D3H44	Q38R_F98A	FLAG	無

固有の識別名セット	REF_WTについて観察された動向	**H1-L1:H1-L2**	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	**H1-L1:H1-L2** スカラー (中央値)	VAR1についてのREF_WT	正規化中央値 VAR1 H1-L1:H1-L2についてのREF_WT	VAR1 H1-L1:H1-L2 スカラーについてのREF_WT (中央値)	**Δ (VAR1-REF_WT) H1-L1:H1-L2** スカラー
	HA_L_D3H44を上回るFLAG_L_PERTに対するH_D3H44の優先性が一致する(HAタグ問題による可能性が高いH_D3H44のFLAG_L_D3H44またはHA_L_PERTに対する観察された比の不一致)。L_D3H44を上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性。	34:65_29:70_27:67_29:73_27:73_2:101_1:98	29:71	-0.909	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
57-58		90:3_85:4	96:04	3.1675	K	29:71	-0.909	4.08
305*-307*		102:3_99:3_101:4_121:5_110:10_85:24	96:04	3.2045	K	29:71	-0.909	4.11
93-26		76:24_70:31	73:27	0.9895	K	29:71	-0.909	1.9
48-47		112:01	99:01	4.336	F	94:06	2.804	1.53
323*-324*		71:01	99:01	4.267	F	94:06	2.804	1.46
	HA_L_D3H44を上回るFLAG_L_PERTに対するH_D3H44の優先性が一致する場合に、HAタグの問題による可能性が高いH_D3H44のFLAG_L_D3H44またはHA_L_PERTに対する観察された比の不一致。L_D3H44を上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性。	92:4_88:8_58:52_43:60_47:70	53:47	0.119	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
93-26		89:1_88:6	97:03	3.5745	G	73:27	0.998	2.58

【０３２６】
（表１８）

固有の識別名セット	H2-L2:H2-L1	正規化中央値 H2-L2:H2-L1	H2-L2:H2-L1 スカラー（中央値）	VAR2について REF_WT	正規化中央値 VAR2 H2-L2:H2-L1についてのREF_WT	VAR2 H2-L2:H2-L1 スカラーについてのREF_WT（中央値）	Δ (VAR2-REF_WT) H2-L2:H2-L1 スカラー
	106:1_104:1_123:2_105:6_126:9_102:7_113:15	94:06	2.804	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
57-58	112:1_99:10	97:03	3.515	F	94:06	2.804	0.71
305*-307*	113:1_97:1_83:1_108:2_100:2_115:2	99:01	4.2825	F	94:06	2.804	1.48
93-26	101:1_84:1	99:01	4.4435	F	94:06	2.804	1.64
48-47	82:02	97:03	3.519	K	29:71	-0.909	4.43
323*-324*	92:17	84:16	1.675	K	29:71	-0.909	2.58
	98:26_68:23_68:25_65:44_67:46	73:27	0.998	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
93-26	96:1_69:32	94:06	2.673	J	53:47	0.119	2.55

REF_WT	H1_Ab	H1_突然変異	L1_Ab	L1_突然変異	L1_タグ	L2_Ab	L2_突然変異	L2_タグ	H-Lジスルフィド結合の存在(C233-C214)(有/無)	観察された動向
E	PERT	WT	PERT	WT	FLAG	PERT	WT	HA	無	明らかなタグ依存性が観察された。観察された比は、タグが対合の障害になっているというよりむしろ、 HAタグの切断による可能性が高い。
A	TRAS	WT	TRAS	WT	FLAG	TRAS	WT	HA	無	明らかなタグ依存性。上述のように HAタグによる同様の問題がある可能性が高いが、より少ない程度である。
O	D3H44	WT	D3H44	WT	HA	D3H44	WT	FLAG	無	これらの比に対して観察された明らかなタグ依存性はない。
H	D3H44	WT	D3H44	WT	FLAG	TRAS	WT	HA	無	L_D3H44を上回るL_TRASに対するH_D3H44の優先性。
I	D3H44	WT	D3H44	WT	HA	TRAS	WT	FLAG	無	
J	D3H44	WT	D3H44	WT	FLAG	PERT	WT	HA	無	HA_L_D3H44を上回るFLAG_L_PERTに対するH_D3H44の優先性が一致する場合に、HAタグの問題による可能性が高いH_D3H44のFLAG_L_D3H44またはHA_L_PERTに対する観察された比の不一致。
K	D3H44	WT	D3H44	WT	HA	PERT	WT	FLAG	無	
B	TRAS	WT	TRAS	WT	FLAG	D3H44	WT	HA	無	L_D3H44を上回るL_TRASに対するH_TRASの優先性。
C	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	D3H44	WT	FLAG	無	
M	TRAS	WT	TRAS	WT	FLAG	PERT	WT	HA	無	L_PERTを上回るL_TRASに対するH_TRASの優先性の可能性が低い。
N	TRAS	WT	TRAS	WT	HA	PERT	WT	FLAG	無	
F	PERT	WT	PERT	WT	FLAG	D3H44	WT	HA	無	L_D3H44を上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性。
G	PERT	WT	PERT	WT	HA	D3H44	WT	FLAG	無	
D	PERT	WT	PERT	WT	FLAG	TRAS	WT	HA	無	L_TRASを上回るL_PERTに対するH_PERTの優先性の可能性がない。
L	PERT	WT	PERT	WT	HA	TRAS	WT	FLAG	無	

【０３２７】

（表１９）

REF_WT	H1-L1:H1-L2	正規化中央値 H1-L1:H1-L2	スクリーニング実験の数	H1-L1 Tm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L2 Tm (n>1である場合の範囲) (°C)	H1-L1 抗原親和性-TF(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)	H1-L1 抗原親和性-HER2(KD) (n>1である場合の範囲) (nM)
E	81:20_79:20_70:29_78:34_78:47_57:35_56:36_65:53_65:53_53:50	62:38	10	73.25	73.26	該当せず	ND
A	66:34_57:36_66:43_54:36_58:43_58:43	61:39	6	76.93 75.88	76.86	該当せず	0.696
O	50:55_48:70	44:56	2	(3.57) 75.77	75.77	0.0522 (0.08822)	該当せず
H	36:59_36:59_35:86_31:87_20:67	29:71	5	(0.73) 75.88	ND	0.0622 (0.12039)	該当せず
I	50:58_49:61_34:68_21:71_21:76	33:67	5	(3.57) 75.77	ND	0.0522 (0.08822)	該当せず
J	92:4_88:8_58:52_43:60_47:70	53:47	5	(0.73) 75.88	79.47	0.0622(0.12039)	該当せず
K	34:65_29:70_27:67_29:73_27:73_2:101_1:98	29:71	7	(3.57)	79.76	0.0522 (0.08822)	該当せず
B	70:16_84:21_84:21_72:44_66:50	80:20	5	76.93	ND	該当せず	0.696
C	107:15_107:18_86:17_89:18_61:19	84:16	5	76.86	ND	該当せず	0.413
M	45:43	51:49	1	76.93	ND	該当せず	0.696
N	38:51	42:58	1	76.86	ND	該当せず	0.413
F	106:1_104:1_123:2_105:6_126:9_102:7_113:15	94:06	7	73.25	66.43	該当せず	ND
G	98:26_68:23_68:25_65:44_67:46	73:27	5	73.26	66.79	該当せず	ND
D	68:43_66:42_55:56_56:58_48:60	49:51	5	73.25	ND	該当せず	ND
L	42:58	42:58	1	73.26	ND	該当せず	ND

固有の識別名	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	L2_突然変異
57	定常	静電気的	L143K_D146G	Q124E_V133D	Q124R
182	可変	静電気的	V37E_F100D	L89R_F98W	F98Y
306*	定常	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	L135W	F116A_Q124E_L135A_T180E
58	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	Q124E_V133D
107	定常	立体的	A139G_V190A	L135W	F116A_L135A
304*	定常	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	A139W_S186K	F116A_Q124E_L135A_T180E	L135W
93	可変	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	Q39R	Q38E_F98W	Q38R_F98A
165	定常	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	A139W	F116A_L135A	S131R_L135W
65	定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	Q124E_Q160E_T178D
66	定常	静電気的	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	V133A_Q160K_T178R
313*	可変	立体的	V37W	F98A	P44W
314*	定常	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	A139V_K145L_Q179E_S188G_V190S	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	F118W_V133S_S176A_T180E
26	可変	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	V37W_Q39E	Q38R_F98A	Q38E_F98W
324*	可変	立体的	V37W_F100W	F98A	P44W_Q89W_F98A
3	定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L	V133S
72	定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	Q160K_T178R

固有の識別名	Fab 領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	L2_mutation
307*	可変	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	Q39R	Q38E	F98A
305*	可変	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	V37W	F98A	Q38E
52	可変	静電気的	Q39E	Q38R	Q38E
315*	定常	組み合わせ（立体的 + 静電気的）	A139W_S186K_S188A	F118W_V133S_S176A_T180E	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A
108	定常	立体的	A139W	F116A_L135A	L135W
19	定常	立体的	S188L_V190Y	V133S	S176L
51	可変	静電気的	Q39R	Q38E	Q38R

固有の識別名	中央値 Δ (VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2 スカラー	**H1-L1/L2 系**	系の数
57	4.305	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/TRAS; D3H44-D3H44/PERT	6
182	4.055	D3H44-D3H44/TRAS; D3H44-D3H44/PERT	2
306*	3.99	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	4
58	3.23	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	5
107	3.03	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	4
304*	3.03	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	5
93	2.9	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/PERT	5
165	2.8	TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/PERT	3
65	2.6	TRAS-TRAS/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	3
66	2.565	TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/TRAS; D3H44-D3H44/PERT	4
313*	2.55	TRAS-TRAS/D3H44; D3H44-D3H44/PERT	2
314*	2.495	TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/D3H44	2
26	2.285	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/PERT	6
324*	2.2	D3H44-D3H44/TRAS; D3H44-D3H44/PERT	2
3	2.13	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	5
72	1.725	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/TRAS	6
307*	1.71	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44; D3H44-D3H44/PERT	5

【０３２８】
（表２０）

固有の識別名	中央値 Δ (VAR-REF_WT) H1-L1:H1-L2 スカラー	H1-L1/L2 系	系の数
305*	1.44	TRAS-TRAS/TRAS; PERT-PERT/PERT; D3H44-D3H44/PERT	3
52	1.405	TRAS-TRAS/TRAS; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	4
315*	1.19	TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/D3H44	2
108	1.15	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/TRAS; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	5
19	0.945	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	4
51	0.935	TRAS-TRAS/TRAS; TRAS-TRAS/D3H44; PERT-PERT/PERT; PERT-PERT/D3H44	4

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
306*-304*	定常	組み合わせ(立体的 + 静電気的)	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	L135W	A139W_S186K	F116A_Q124E_L135A_T180E
307*-305*	可変	組み合わせ(立体的 + 静電気的)	Q39R	Q38E	V37W	F98A
3-19	定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L_V190Y	V133S
93-26	可変	組み合わせ(立体的 + 静電気的)	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
58-57	定常	静電気的	L143E_K145T	Q124R	L143K_D146G	Q124E_V133D
107-108	定常	立体的	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135A
72-65	定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
52-51	可変	静電気的	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E
319*-310*	可変	静電気的	V37E_F100D	Q89R_F98W	WT	WT

【０３２９】
（表２１）

固有の識別名セット	中央値 Δ (VAR1-REF_WT) H1-L1:H1-L2 スカラー	H1-L1/H2-L2 系	系の数	中央値 Δ (VAR2-REF_WT) H2-L2:H2-L1 スカラー
306*-304*	4.66	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	3.8
307*-305*	4.57	PERT-PERT/D3H44-D3H44; PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	3	1.44
3-19	3.84	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	0.965
93-26	3.735	D3H44-D3H44/PERT-PERT; PERT-PERT/D3H44-D3H44; PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	4	3.27
58-57	3.545	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS; TRAS-TRAS/D3H44-D3H44; PERT-PERT/D3H44-D3H44	4	4.725
107-108	2.795	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	0.755
72-65	2.095	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	1.78
52-51	1.405	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	1.845
319*-310*	2.33	PERT-PERT/PERT-PERT; TRAS-TRAS/TRAS-TRAS	2	2.865

固有の識別名	Fab領域	設計タイプ	H1_突然変異	L1_突然変異	L2_突然変異	H1:L1:L2 DNA 比	H1-L1_H1-L2
			WT	WT	WT	1:01:01	32.5_45.0_38.9_41.5
325*	可変	立体的	V37W	F98A	F98W	1:01:01	11.5_11.9_15.2_8.4
31	可変	立体的	WT	F98W	F98A	1:01:01	29.7_38.9_40.9_44.4
52	可変	静電気的	Q39E	Q38R	Q38E	1:01:01	19.1_28.5
51	可変	静電気的	Q39R	Q38E	Q38R	1:01:01	25.4_23.7
108	定常	立体的	A139W	F116A_L135A	L135W	1:01:01	12.1_28.4
305*	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	V37W	F98A	Q38E	1:01:01	6.6_9.5_8.9
307*	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	Q39R	Q38E	F98A	1:01:01	10.1_9.6_9.9_8.6
19	定常	立体的	S188L_V190Y	V133S	S176L	1:01:01	43.2_26.5
3	定常	立体的	F174V_P175S_S188G	S176L	V133S	1:01:01	42.8_43.5
72	定常	静電気的	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	Q160K_T178R	1:01:01	7.1_6.3
65	定常	静電気的	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	Q124E_Q160E_T178D	1:01:01	25.3_41.6

【０３３０】
（表２２）

固有の識別名	中央値 H1-L1_H1-L2	H1-L1_H1-L1	中央値 H1-L1_H1-L1	H1-L2_H1-L2	中央値 H1-L2_H1-L2
	40.2	3.7_11.5_4.6_24.1	8.05	63.8_43.5_55.7_34.4	49.6
325*	11.7	84.1_84.9_82.1_90.3	84.5	4.4_2.9_2.6_1.2	2.75
31	39.9	66.7_52.9_51.5_42.4	52.2	3.6_8.1_7.6_13.0	7.85
52	23.8	80.9_52.5	66.7	0.0_18.8	9.4
51	24.55	71.1_71.3	71.2	3.6_4.9	4.25
108	20.25	87.9_71.4	79.65	0_0	0
	8.9	92.6_86.2_88.7	88.7	0_3.8_2.3	2.3
307*	9.75	89.9_90.3_89.8_91.0	90.1	0_0_0.3_0.3	0.15
19	34.85	36.7_72.4	54.55	20.1_0.7	10.4
3	43.15	47.1_47.2	47.15	10.1_8.9	9.5
72	6.7	92.9_93.7	93.3	0_0	0
65	33.45	71.8_29.0	50.4	3.0_29.3	16.15

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
305*-307*	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W	F98A	PERT	Q39R
154-152	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	PERT	V37A_Q39R_W103V
326*-23	定常	静電気的	D3H44	S186R	Q124E_Q160E_T180E	PERT	K145L_Q179E
327*-328*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（ 静電気的）	D3H44	Q39E_S186R	Q38R_Q124E_Q160E_T180E	PERT	Q39R_K145L_Q179E
329*-330*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	A139G_V190A	L135W	PERT	A139W_K145Y_Q179E
331*-257	定常	静電気的	*D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	PERT	L143E_K145T
329*-330*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	A139G_V190A	L135W	PERT	A139W_K145Y_Q179E
332*-284	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	PERT	L143E_K145T
333*-334*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的）	D3H44	Q39E_S186R	Q38R_Q160E_T180E	PERT	Q39R_K145T_Q179E
335*-336*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_L124E	F98A_V133A_S176K	PERT	L124R
331*-257	定常	静電気的	*D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	PERT	L143E_K145T

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
305*-307*	Q38E	24:6:56:14	有	1	100:0	100:0
154-152	Q38E_P44W	15:15:35:35	無	1	100:0	100:0
326*-23	S131K	22:8:53:17	無	1	100:0	100:0
327*-328*	Q38E_S131K	22:8:46:24	無	1	100:0	100:0
329*-330*	F116A_S131K_L135A	15:15:35:35	無	1	100:0	100:0
331*-257	Q124R_Q160K_T178R	22:8:35:35	無	1	100:0	100:0
329*-330*	F116A_S131K_L135A	15:15:35:35	無	1	100:0	100:0
332*-284	Q124R	22:8:53:17	無	1	98:2	98:2
333*-334*	Q38E_S131K	22:8:46:24	無	1	98:2	98:2
335*-336*	F98W_V133G_S176D	22:8:46:24	無	1	98:2	98:2
331*-257	Q124R_Q160K_T178R	22:8:46:24	無	1	97:3	97:3

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
305*-307*	5	8.72	95	10	0	0	0	0
154-152	5	8.72	94.4	6.8	0	0	0	0
326*-23	5	8.72	80.8	4.2	1.9	0	0	0
327*-328*	5	8.72	70.7	6.5	1.2	0	0	0
329*-330*	5	8.72	61.9	3.1	0	0	0	0
331*-257	5	8.72	56.4	3.4	6.1	0	0	0
329*-330*	5	8.72	42.2	3.2	0	0	0	0
332*-284	4.06	7.78	32.5	1.8	11.5	0	0	0
333*-334*	4	7.72	85.9	7.2	0	0	0	0
335*-336*	3.84	7.56	66.4	6.7	0	0	0	0
331*-257	3.51	7.23	50.5	3.4	2.8	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
305*-307*	0	2.8	0	0	2.2	0	0	0
154-152	0	0	0	0	3.1	0	0	2.5
326*-23	0	0	0	0	14	0	0	3.3
327*-328*	0	0	0	0	26.6	0	0	1.5
329*-330*	0	1.1	0	0	2.6	0	0	34.3
331*-257	0	0	0	0	33.9	0	0	3.6
329*-330*	0	2.4	0	0	0	0	0	55.4
332*-284	0	0	1.7	0	54.3	0	0	0
333*-334*	0	0	0	1.8	9.3	0	0	3
335*-336*	0	4.2	0	0	25.4	2.1	0	2
331*-257	2.9	0	0	0	42.6	0	0	1.3

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
90-92	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	PERT	V37I_Q39R
34-39	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	PERT	Q39R
313*-337*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	L45A
336*-335*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	L124R	F98W_V133G_S176D	PERT	V37W_L124E
338*-299	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	L45A
313*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	W103V
340*-337*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	L45A
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V
66-67	定常	静電気的	D3H44	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	PERT	K145T_Q179D_S188F
57-58	定常	静電気的	*D3H44	L143K_D146G	Q124E_V133D	PERT	L143E_K145T
341*-342*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_K145T_Q179E	F98A_S131K	PERT	S186R
92-90	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	PERT	V37W_Q39E
325*-31	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	WT
92-90	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	PERT	V37W_Q39E
300-343*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	W103V
342*-341*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	S186R	F98W_Q160E_T180E	PERT	V37W_K145T_Q179E
344*-121	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	F100W_W103F	F98L	PERT	Q39R

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップ?	実験の数	対合:誤対合の種(すべて)	対合:誤対合の種(平均)
90-92	Q38D_F98W	15:15:35:35	いいえ	1	96:4	96:4
34-39	Q38E	15:15:35:35	いいえ	1	96:4	96:4
313*-337*	P44W	15:15:35:35	いいえ	1	95:5	95:5
336*-335*	F98A_V133A_S176K	22:8:46:24	いいえ	1	94:6	94:6
338*-299	P44F	22:8:46:24	いいえ	1	94:6	94:6
313*-339*	P44W	22:8:46:24	いいえ	1	93:7	93:7
340*-337*	P44W	15:15:35:35	いいえ	1	92:8	92:8
340*-339*	P44W	26:4:56:14	いいえ	1	92:8	92:8
66-67	V133A_Q160K_T178R	22:8:53:17	いいえ	1	92:8	92:8
57-58	Q124R	22:8:53:17	いいえ	2	88:12_93:7	91:9
341*-342*	F98W_Q160E_T180E	22:8:46:24	いいえ	1	90:10	90:10
92-90	Q38R_F98A	20:10:40:30	いいえ	1	89:11	89:11
325*-31	F98W	8:22:53:17	はい	1	88:12	88:12
92-90	Q38R_F98A	22:8:35:35	いいえ	1	87:13	87:13
300-343*	P44F	22:8:46:24	いいえ	1	87:13	87:13
342*-341*	F98A_S131K	22:8:46:24	いいえ	1	87:13	87:13
344*-121	Q38E_F98W	22:8:46:24	いいえ	1	86:14	86:14

固有の識別名セット	対合_/_誤対合 のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合 のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
90-92	3.2	6.92	90.6	4.3	0	0	0	0
34-39	3.18	6.9	89.6	3.9	0	0	0	0
313*-337*	2.99	6.71	82.1	9.6	0	0	0	0
336*-335*	2.68	6.4	64.9	10.4	0	0	1.5	0
338*-299	2.67	6.39	85.5	4.7	0	0	0	0
313*-339*	2.6	6.32	82.1	7.9	0	0	0	0
340*-337*	2.48	6.2	77.5	7.8	0	0	0	0
340*-339*	2.47	6.19	12.2	1.6	3.2	0	0	0
66-67	2.42	6.14	26.6	2.2	3	0	0	0
57-58	2.31	6.03	56.4	3.05	1.8	0	0	0
341*-342*	2.21	5.93	29.8	2.7	8.5	1.6	0	0
92-90	2.13	5.85	84.4	6.5	0	0	0	0
325*-31	1.96	5.68	81.8	注釈なし	0	0	0	0
92-90	1.92	5.64	80	6	0	0	0	0
300-343*	1.87	5.59	71.4	4.5	0	0	0	0
342*-341*	1.87	5.59	52.1	3.8	2.4	0	0	0
344*-121	1.83	5.55	68.8	7.1	1.7	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
90-92	0	0	0	3.9	2.3	0	0	3.2
34-39	0	0	0	4	2.8	0	0	3.7
313*-337*	2.1	1.3	0	2.7	1.1	0	0	10.7
336*-335*	1.1	9	3.8	0	18.6	0	0	1.1
338*-299	0	0	0	6.5	3.6	0	0	4.5
313*-339*	0	1.5	5.1	1.8	5.1	0	0	4.4
340*-337*	0	0	0	7.7	1.4	0	0	13.4
340*-339*	0	1.9	2	0	74.9	5.8	0	0
66-67	0	0	2.2	0	62.2	6	0	0
57-58	3.15	1.15	0	5.15	27.35	1.1	0	3.9
341*-342*	0	0	0	2.2	51.8	6.1	0	0
92-90	0	0	8.8	1.8	2.3	0	0	2.7
325*-31	0	1.9	6.3	5	0	0	1.1	4
92-90	2.9	1.2	3.1	6.8	4.1	0	0	1.9
300-343*	0	0	1.8	9.2	9.2	2.4	0	6
342*-341*	0	0	13.3	0	32.2	0	0	0
344*-121	0	0	2.7	7.1	13.9	4	0	1.8

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
345*-346*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（立体的）	D3H44	V37W	F98A_L135W	PERT	A139W
347*-348*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_K145T_Q179E	F98A_S131K	PERT	WT
57-58	定常	静電気的	*D3H44	L143K_D146G	Q124E_V133D	PERT	L143E_K145T
338*-349*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103F
300-349*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	W103F
106-97	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37I_Q39D	Q38R_F98W	PERT	V37W_Q39R_W103F
111-112	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39D_A139G_V190A	Q38R_L135W	PERT	Q39R_A139W
350*-31	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	WT
338*-343*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V
73-74	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37I_Q39R	Q38E_F98W	PERT	V37W_Q39E_W103F
300-299	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	L45A
152-154	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	PERT	V37W_Q39E
306*-304*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	L135W	PERT	A139W_S186K
107-108	定常	立体的	D3H44	A139G_V190A	L135W	PERT	A139W
307*-305*	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R	Q38E	PERT	V37W

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは？	実験の数	対合種:誤対合種（すべて）	対合種:誤対合種（平均）
345*-346*	F98W_F116A	22:8:46:24	無	1	86:14	86:14
347*-348*	F98W	22:8:46:24	無	1	85:15	85:15
57-58	Q124R	22:8:53:17	無	1	84:16	84:16
338*-349*	P44F	22:8:46:24	無	1	83:17	83:17
300-349*	P44F	22:8:46:24	無	1	82:18	82:18
106-97	Q38E_F98L	22:8:40:30	無	1	81:19	81:19
111-112	Q38D_F116A_L135A	22:8:53:17	無	1	80:20	80:20
350*-31	F98W	22:8:46:24	無	1	80:20	80:20
338*-343*	P44F	22:8:46:24	無	1	80:20	80:20
73-74	Q38R_F98L	22:8:46:24	無	1	77:23	77:23
300-299	P44F	22:8:46:24	無	1	76:24	76:24
152-154	Q38R_F98A	22:8:53:17	無	1	72:28	72:28
306*-304*	F116A_Q124E_L135A_T180E	22:8:53:17	無	1	71:29	71:29
107-108	F116A_L135A	15:15:17:53	有	1	70:30	70:30
307*-305*	F98A	22:8:46:24	無	1	70:30	70:30

固有の識別名セット	対合_/_誤対合 のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合 のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
345*-346*	1.79	5.51	66.9	7.7	0	0	0	0
347*-348*	1.71	5.43	32.9	3.7	6.9	2.2	0	0
57-58	1.64	5.36	68.7	5	0	0	0	0
338*-349*	1.61	5.33	57.5	5.1	0	0	0	0
300-349*	1.53	5.25	75.4	6.6	0	0	0	0
106-97	1.45	5.17	44.2	12.8	2.1	0	0	0
111-112	1.37	5.09	73.6	1.6	0	0	0	0
350*-31	1.37	5.09	66.8	4.6	0	1.7	1	0
338*-343*	1.36	5.08	53.6	3	1.5	0	0	0
73-74	1.18	4.9	26.6	1.6	1.3	0	0	0
300-299	1.17	4.89	29.8	2.3	8.3	4.2	0	0
152-154	0.92	4.64	57.9	3.5	0	0	0	0
306*-304*	0.87	4.59	56.1	0.8	0	0	0	0
107-108	0.86	4.58	0	存在せず	0	0	0	0
307*-305*	0.85	4.57	56.7	8	0	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
345*-346*	0	0	1.6	7.7	15.4	5	0	3.5
347*-348*	0	2.5	0	3.6	38.4	9.5	0	4.1
57-58	0	0	0	14.1	12.1	2.1	0	3
338*-349*	0	1.3	4.2	7.6	0	0	4.8	24.6
300-349*	2.2	0	5	10.6	2.3	0	0	4.4
106-97	0	0	13	0	34.7	6	0	0
111-112	0	0	11.8	7.3	0	0	1.2	6.1
350*-31	0	0	11.2	4.4	12.9	1.9	0	0
338*-343*	1.4	0	1.3	8.8	22.2	9	0	2.2
73-74	0	0	3.3	2.7	48.6	17.6	0	0
300-299	1.4	0	0	5.7	38.2	12.4	0	0
152-154	0	0	5.9	18.9	10.2	3.7	0	3.4
306*-304*	0	1.1	7.8	19.1	13.3	2.5	0	0
107-108	0	3.9	0	29.8	0	0	0	66.3
307*-305*	0	0	6.5	19.1	8.8	4.4	0	4.5

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
351*-312*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	WT
186-352*	可変	立体的	D3H44	WT	F98W	PERT	V37F
353*-354*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	S186R	L135W_Q160E_T180E	PERT	A139W_K145T_Q179E
1-2	定常	静電気的	D3H44	S186R	Q124E_Q160E_T178D	PERT	K145L_Q179E
121-344*	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R	Q38E_F98W	PERT	F100W_W103F
72-65	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	PERT	K145T_Q179D_S188L
312*-351*	可変	立体的	D3H44	WT	WT	PERT	V37W
186-355*	可変	立体的	D3H44	WT	F98W	PERT	F100W_W103F
356*-357*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	W103F
346*-345*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（立体的）	D3H44	A139W	F98W_F116A	PERT	V37W
343*-338*	可変	立体的	D3H44	W103V	P44F	PERT	V37W_W103F
52-51	可変	静電気的	D3H44	Q39E	Q38R	PERT	Q39R
358*-359*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44F	PERT	V37F
348*-347*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	WT	F98W	PERT	V37W_K145T_Q179E
355*-186	可変	立体的	D3H44	F100W_W103F	F98L	PERT	WT
360*-359*	可変	立体的	D3H44	W103V	P44F	PERT	V37F
313*-361*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	W103F
340*-361*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103F
357*-356*	可変	立体的	D3H44	W103F	P44W	PERT	V37F
359*-362*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	W103F
186-363*	可変	立体的	D3H44	WT	F98W	PERT	V37F_W103F
363*-186	可変	立体的	D3H44	V37F_W103F	F98L	PERT	WT
299-300	可変	立体的	D3H44	L45A	P44F	PERT	V37W
359*-358*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	L45A
356*-364*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	L45A

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
351*-312*	WT	22:8:46:24	無	1	69:31	69:31
186-352*	F98L	22:8:46:24	無	1	66:34	66:34
353*-354*	F116A_S131K	22:8:46:24	無	2	73:27_60:40	66:34
1-2	S131K	22:8:53:17	有	1	65:35	65:35
121-344*	F98L	22:8:46:24	無	1	65:35	65:35
72-65	Q160K_T178R	15:15:53:17	有	1	63:37	63:37
312*-351*	F98A	22:8:46:24	無	1	62:38	62:38
186-355*	F98L	22:8:46:24	無	1	59:41	59:41
356*-357*	P44W	22:8:46:24	無	1	58:42	58:42
346*-345*	F98A_L135W	22:8:46:24	無	1	58:42	58:42
343*-338*	F98A	22:8:46:24	無	1	58:42	58:42
52-51	Q38E	8:22:53:17	有	1	58:42	58:42
358*-359*	F98L	22:8:46:24	無	1	58:42	58:42
348*-347*	F98A_S131K	22:8:46:24	無	1	56:44	56:44
355*-186	F98W	22:8:46:24	無	1	56:44	56:44
360*-359*	F98L	22:8:46:24	無	1	56:44	56:44
313*-361*	P44W	22:8:46:24	無	1	55:45	55:45
340*-361*	P44W	22:8:46:24	無	1	51:49	51:49
357*-356*	F98L	22:8:46:24	無	1	50:50	50:50
359*-362*	P44F	22:8:46:24	無	1	50:50	50:50
186-363*	F98L	22:8:46:24	無	1	49:51	49:51
363*-186	F98W	22:8:46:24	無	1	49:51	49:51
299-300	F98A	22:8:46:24	無	1	48:52	48:52
359*-358*	P44F	22:8:46:24	無	1	48:52	48:52
356*-364*	P44W	22:8:46:24	無	1	48:52	48:52

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
351*-312*	0.79	4.51	62	4.9	0	0	0	0
186-352*	0.68	4.4	63.3	5.4	0	0	0	0
353*-354*	0.675	4.39	44.15	4.3	0.75	0.8	0	0
1-2	0.64	4.36	55.5	注釈なし	1.2	0	1.3	0
121-344*	0.62	4.34	54.8	4.5	0	0	0	0
72-65	0.55	4.27	57.5	存在せず	0	0	0	0
312*-351*	0.51	4.23	48.8	4.4	0	0	0	0
186-355*	0.38	4.1	59.4	2	0	0	0	0
356*-357*	0.32	4.04	51.4	7.3	0	0	0	0
346*-345*	0.32	4.04	44.8	4.5	0	0	0	0
343*-338*	0.32	4.04	42.3	3.8	0	0	0	0
52-51	0.32	4.04	38.6	存在せず	0	0	0	0
358*-359*	0.3	4.02	46.4	3.5	0	0	0	0
348*-347*	0.26	3.98	45	4.4	0	1.3	0	0
355*-186	0.24	3.96	10.3	0.8	3.5	3.1	1.5	0
360*-359*	0.23	3.95	44.7	3.9	0	0	0	0
313*-361*	0.21	3.93	47.3	5.6	0	0	0	1.6
340*-361*	0.04	3.76	40.8	5.3	0	0	0	0
357*-356*	0.02	3.74	46.3	3.1	0	0	0	0
359*-362*	0.01	3.73	38.9	2.3	0	0	0	0
186-363*	-0.03	3.69	36.2	1.3	0	0	1	0
363*-186	-0.03	3.69	33.2	3	0	0	0	0
299-300	-0.07	3.65	39.2	4.5	0	0	0	0
359*-358*	-0.08	3.64	39.7	3.6	0	0	0	0
356*-364*	-0.1	3.62	42	5.5	0	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2		H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
351*-312*	0		1.1	2.1	27.3	2.3	1.8	0	3.4
186-352*	0		0	14.1	9.8	1.8	3.8	6	1.3
353*-354*	0		0.5	0	30.4	8.85	2.75	0	11.75
1-2		1.9	1.1	2.7	28.7	2	0	0	5.6
121-344*	0		0	15	14.6	7	3.5	1.8	3.4
72-65	0		0	5.4	30	2.1	0	1.1	3.8
312*-351*	0		1.3	10	20.2	4.6	3.5	3.8	7.7
186-355*	0		0	10.9	29.7	0	0	0	0
356*-357*	0		0	8.1	31.7	1.8	2.2	0	4.9
346*-345*	1		0	9.2	25.5	10	6.2	0	3.1
343*-338*	1.7		3.4	14	20.1	7.7	4.1	2.2	4.4
52-51		1.1	14	7.1	33.9	0	0	0	5.3
358*-359*	1.4		2.1	20.3	13.5	4.7	3.5	3.8	4.3
348*-347*	0		0	27.9	7.8	2.4	0	6.6	9
355*-186	0		0	1.3	7.4	42.2	30.7	0	0
360*-359*	0		0	29	7.9	9	4.2	3.1	2.1
313*-361*		2.1	0	36.3	1.8	5.2	0	3.1	2.7
340*-361*	0		0	43.1	1.7	7.2	1.3	2.9	3.1
357*-356*	0		0	1.7	37.6	1.3	7	3.2	2.9
359*-362*	0		0	1.3	37.2	11.4	11.2	0	0
186-363*	0		0	9.6	8.6	13	31.6	0	0
363*-186	0		0	2.1	32.5	16.1	16.1	0	0
299-300	0		0	14.9	29.8	3.2	3.6	3.3	5.9
359*-358*	0		0	0	48.3	3.2	3.7	0	5.1
356*-364*	0		0	0	49	2.3	3.5	0	3.2

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
337*-340*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44W	PERT	V37W_W103F
339*-340*	可変	立体的	D3H44	W103V	P44W	PERT	V37W_W103F
337*-313*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44W	PERT	V37W
364*-356*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44W	PERT	V37F
339*-313*	可変	立体的	D3H44	W103V	P44W	PERT	V37W
314*-315*	定常	組み合わせ(静電気的 + 立体的)	D3H44	A139V_K145L_Q179E_S188G_V190S	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	PERT	A139W_S186K_S188A
31-325*	可変	立体的	D3H44	WT	F98W	PERT	V37W
349*-300	可変	立体的	D3H44	W103F	P44F	PERT	V37W
356*-365*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	W103V
31-350*	可変	立体的	D3H44	WT	F98W	PERT	V37W_W103F
257-331*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	PERT	D146G_Q179K
19-3	定常	立体的	D3H44	S188L_V190Y	V133S	PERT	F174V_P175S_S188G
352*-186	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	WT
366*-367*	定常	静電気的	D3H44	S186R	Q124E_Q160E_T178D	PERT	L143E_K145T
343*-300	可変	立体的	D3H44	W103V	P44F	PERT	V37W

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
337*-340*	F98A	22:8:46:24	無	1	47:53	47:53
339*-340*	F98A	22:8:46:24	無	1	47:53	47:53
337*-313*	F98A	22:8:46:24	無	1	46:54	46:54
364*-356*	F98L	22:8:46:24	無	1	46:54	46:54
339*-313*	F98A	22:8:46:24	無	1	46:54	46:54
314*-315*	F118W_V133S_S176A_T180E	22:8:53:17	無	1	44:56	44:56
31-325*	F98A	22:8:46:24	無	1	42:58	42:58
349*-300	F98A	22:8:46:24	無	1	41:59	41:59
356*-365*	P44W	22:8:46:24	無	1	41:59	41:59
31-350*	F98A	22:8:46:24	無	1	40:60	40:60
257-331*	Q124E_Q160E_T180E	22:8:56:14	有	1	39:61	39:61
19-3	S176L	8:22:53:17	有	1	38:62	38:62
352*-186	F98W	22:8:46:24	無	1	37:63	37:63
366*-367*	Q124R	22:8:53:17	有	1	36:64	36:64
343*-300	F98A	22:8:46:24	無	1	35:65	35:65

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
337*-340*	-0.13	3.59	41.3	4.1	0	0	0	0
339*-340*	-0.13	3.59	40.3	2.8	0	0	0	0
337*-313*	-0.15	3.57	40.6	3.4	0	0	0	0
364*-356*	-0.15	3.57	37.1	3	0	0	0	0
339*-313*	-0.18	3.54	33.7	2.2	0	0	0	0
314*-315*	-0.23	3.49	9.5	0.2	1.7	0	0	0
31-325*	-0.34	3.38	33.6	2.6	0	0	0	0
349*-300	-0.35	3.37	37.3	2.2	0	0	0	0
356*-365*	-0.36	3.36	25.7	3.4	0	0	1	0
31-350*	-0.42	3.3	30.7	3.2	0	0	0	0
257-331*	-0.44	3.28	30.2	6.3	0	0	2.1	0
19-3	-0.48	3.24	16.8	存在せず	2.6	4.1	0	0
352*-186	-0.52	3.2	27.5	3.2	0	0	4.1	0
366*-367*	-0.57	3.15	26.9	注釈なし	1.8	0	0	0
343*-300	-0.61	3.11	20	1.4	0	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
337*-340*	0	0	11.7	36.3	5.4	5.3	0	0
339*-340*	0	0	14.5	31.1	4.8	5.7	1.9	1.7
337*-313*	0	0	11.5	36.4	1.5	3.1	2.8	4
364*-356*	0	0	21.9	23.5	4.4	4.3	4.1	4.7
339*-313*	0	1.4	5.8	35.7	8.2	11.6	1.4	2.2
314*-315*	0	0	6.2	13.2	32	36.3	0	1.2
31-325*	0	0	6.7	42.2	4.5	6.4	3.1	3.4
349*-300	0	0	2.6	45.5	3	10.5	0	1.1
356*-365*	1.1	1.7	1.2	29.7	12.1	26	0	1.6
31-350*	0	0	6.1	43.3	4.1	8.9	2.1	4.8
257-331*	1.1	1.6	0	54.7	1.9	3.1	0	5.4
19-3	0	6.1	2.5	55.1	0	0	0	12.8
352*-186	0	0	1.1	41	9.8	16.6	0	0
366*-367*	0	2	2.7	59	1.6	2.1	0	3.9
343*-300	0	0	1.1	35.1	15.3	28.5	0	0

固有の識別名セット	Fab 領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
328*-327*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的）	D3H44	Q39R_K145L_Q179E	Q38E_S131K	PERT	Q39E_S186R
361*-313*	可変	立体的	D3H44	W103F	P44W	PERT	V37W
361*-340*	可変	立体的	D3H44	W103F	P44W	PERT	V37W_W103F
299-338*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44F	PERT	V37W_W103F
368*-369*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143K
370*-371*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R_A139W	Q38E_F116A_L135V	PERT	Q39E_A139G_V190A
359*-360*	可変	立体的	D3H44	V37F	F98L	PERT	W103V
368*-372*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143R
373*-374*	可変	立体的	D3H44	L45F	WT	PERT	L45A
295-294	定常	静電気的	D3H44	L124R	V133G_S176D	PERT	L124E
375*-376*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143R
377*-378*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44F	PERT	L45F
74-73	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L	PERT	V37I_Q39R
379*-380*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	PERT	S186R
381*-382*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R_A139W	Q38E_F116A	PERT	Q39E
383*-384*	定常	静電気的	D3H44	H172R	WT	PERT	H172T
349*-338*	可変	立体的	D3H44	W103F	P44F	PERT	V37W_W103F
334*-333*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的）	D3H44	Q39R_K145T_Q179E	Q38E_S131K	PERT	Q39E_S186R
378*-377*	可変	立体的	D3H44	L45F	WT	PERT	L45A
375*-385*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143K

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
328*-327*	Q38R_Q124E_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	35:65	35:65
361*-313*	F98A	22:8:46:24	無	1	33:67	33:67
361*-340*	F98A	22:8:46:24	無	1	32:68	32:68
299-338*	F98A	22:8:46:24	無	1	32:68	32:68
368*-369*	V133E	22:8:46:24	無	1	31:69	31:69
370*-371*	Q38R_L135W	22:8:46:24	無	1	31:69	31:69
359*-360*	P44F	22:8:46:24	無	1	31:69	31:69
368*-372*	V133E	22:8:46:24	無	1	31:69	31:69
373*-374*	P44W	22:8:46:24	無	1	30:70	30:70
295-294	V133A_S176K	22:8:46:24	無	1	30:70	30:70
375*-376*	Q124E_V133E	22:8:46:24	無	1	29:71	29:71
377*-378*	WT	22:8:46:24	無	1	29:71	29:71
74-73	Q38E_F98W	22:8:46:24	無	1	28:72	28:72
379*-380*	Q124E_T178E_T180E	22:8:46:24	無	1	28:72	28:72
381*-382*	Q38R_L135W	22:8:46:24	無	1	26:74	26:74
383*-384*	N137K_S174R	22:8:46:24	無	1	25:75	25:75
349*-338*	F98A	22:8:46:24	無	1	24:76	24:76
334*-333*	Q38R_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	23:77	23:77
378*-377*	P44F	22:8:46:24	無	2	21:79_24:76	22:78
375*-385*	Q124E_V133E	22:8:46:24	無	1	21:79	21:79

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
328*-327*	-0.63	3.09	5.3	1.1	2	6.5	6.9	0
361*-313*	-0.72	3	30.5	2	0	0	0	0
361*-340*	-0.74	2.98	29.2	1.6	0	0	0	0
299-338*	-0.77	2.95	27	1.4	0	0	0	0
368*-369*	-0.8	2.92	18.4	2.9	0	0	1.3	0
370*-371*	-0.8	2.92	17.9	1.4	0	1.1	2.4	0
359*-360*	-0.81	2.91	17.7	2.1	1.1	0	1.5	0
368*-372*	-0.81	2.91	14.3	1.7	0	1.2	3.6	0
373*-374*	-0.83	2.89	20	2.6	0	1.1	1.3	0
295-294	-0.85	2.87	13.2	2.6	0	0	2.5	0
375*-376*	-0.89	2.83	15.7	2.9	0	0	1.9	0
377*-378*	-0.9	2.82	6.6	0.8	0	0	2.2	0
74-73	-0.92	2.8	5.1	4.6	7.7	0	4.9	0
379*-380*	-0.96	2.76	7.6	1.4	0	2.8	5.4	0
381*-382*	-1.06	2.66	18.5	1.3	0	0	0	0
383*-384*	-1.09	2.63	13.7	1.8	1.2	0	0	0
349*-338*	-1.14	2.58	20.7	0.9	0	0	0	0
334*-333*	-1.19	2.53	1	0.3	0	3	5.4	0
378*-377*	-1.245	2.48	12.05	1.55	0.55	0	1.4	0
375*-385*	-1.3	2.42	11.1	2.4	0	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
328*-327*	0	0	0	6.8	27.5	45.1	0	0
361*-313*	0	0	1	55.5	0	8.6	2	2.3
361*-340*	0	0	0	59.1	0	7.2	1.4	3
299-338*	0	0	2.6	54.6	4.6	11.2	0	0
368*-369*	0	0	0	43.6	11	24.1	0	1.5
370*-371*	0	0	0	31.2	13.2	34.2	0	0
359*-360*	0	1.7	0	54.8	6	12.8	0	4.3
368*-372*	0	0	0	27.9	16.4	36.6	0	0
373*-374*	0	0	0	55.9	7.1	11.3	0	3.3
295-294	0	2.6	1.5	56.6	6.9	9.5	0	7.2
375*-376*	0	1.6	0	36.5	11.9	32.4	0	0
377*-378*	0	1.2	0	28.9	13.3	39.9	0	7.9
74-73	0	1.4	0	58.4	0	7	1.2	14.2
379*-380*	0	0	0	19.1	20.1	45.1	0	0
381*-382*	0	1.3	0	74.2	0	0	0	6
383*-384*	0	0	0	60.7	4.2	14.1	0	6.1
349*-338*	0	0	0	49.2	3.5	26.6	0	0
334*-333*	0	0	0	3.6	22.4	64.6	0	0
378*-377*	0	0	0	70.2	2.05	6.1	0	7.75
375*-385*	0	0	0	56	8.2	22.6	0	2.1

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
304*-306*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	A139W_S186K	F116A_Q124E_L135A_T180E	PERT	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A
362*-359*	可変	立体的	D3H44	W103F	P44F	PERT	V37F
386*-387*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39E_L124W	Q38R_V133A	PERT	Q39R_L124A
388*-389*	定常	静電気的	D3H44	WT	WT	PERT	K145L_Q179E
390*-391*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	S186R
374*-392*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44W	PERT	WT
387*-386*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R_L124A	Q38E_V133F	PERT	Q39E_L124W
393*-394*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
395*-396*	定常	静電気的	D3H44	H172R	WT	PERT	H172T

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
304*-306*	L135W	22:8:53:17	無	1	20:80	20:80
362*-359*	F98L	22:8:46:24	無	1	20:80	20:80
386*-387*	Q38E_V133F	22:8:46:24	無	1	19:81	19:81
388*-389*	S131K	15:15:35:35	無	1	18:82	18:82
390*-391*	T178E_T180E	22:8:46:24	無	1	18:82	18:82
374*-392*	WT	22:8:46:24	無	1	18:82	18:82
387*-386*	Q38R_V133A	22:8:46:24	無	1	18:82	18:82
393*-394*	Q160E_T178E	22:8:46:24	無	1	18:82	18:82
395*-396*	S174R	22:8:46:24	無	1	17:83	17:83

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
304*-306*	-1.36	2.36	10.4	0.2	0	2.5	0	0
362*-359*	-1.37	2.35	9	0.4	0	0	3	0
386*-387*	-1.44	2.28	11.6	1.6	0	0	0	0
388*-389*	-1.52	2.2	11.6	1.9	0	0	0	0
390*-391*	-1.53	2.19	6.8	2.8	4.5	0	0	0
374*-392*	-1.54	2.18	11.2	1.5	0	0	0	0
387*-386*	-1.54	2.18	7.8	1.5	0	0	0	0
393*-394*	-1.54	2.18	7.1	1.1	5.3	0	1.2	0
395*-396*	-1.61	2.11	4.6	1	1.5	0	3	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
304*-306*	0	0	0	62.3	7.6	14.9	0	2.4
362*-359*	0	8.6	0	27	1.5	49.7	0	1.2
386*-387*	0	0	1.3	64.1	6.3	15.4	0	1.2
388*-389*	0	0	0	77.8	1.3	4.3	0	5
390*-391*	0	0	0	64.2	4	18	0	2.5
374*-392*	0	0	2.6	61.4	6.4	18.4	0	0
387*-386*	0	1.3	0	75.5	1.6	7	0	6.9
393*-394*	0	0	0	61.9	3.5	19.3	0	1.7
395*-396*	0	1.8	0	64.8	1.7	15.6	0	7

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
354*-353*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	A139W_K145T_Q179E	F116A_S131K	PERT	S186R
306*-304*	定常	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	*D3H44	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	L135W	PERT	A139W_S186K
397*-398*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
399*-400*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
401*-402*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
403*-404*	定常	立体的	D3H44	A139W	F116A	PERT	WT
382*-381*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39E	Q38R_L135W	PERT	Q39R_A139W
405*-391*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
406*-407*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
408*-377*	可変	立体的	D3H44	WT	WT	PERT	L45A
409*-410*	定常	立体的	D3H44	L124W	V133A	PERT	L124A
55-56	可変	静電気的対疎水性	D3H44	Q39M	Q38M	PERT	Q39R
371*-370*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39E_A139G_V190A	Q38R_L135W	PERT	Q39R_A139W
377*-408*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44F	PERT	WT
411*-384*	定常	静電気的	D3H44	H172R_T192K	WT	PERT	H172T
412*-413*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
53-54	可変	静電気的	D3H44	Q39R	Q38E	PERT	WT
414*-413*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	S186R
415*-416*	定常	静電気的	D3H44	K145T_Q179E	S131K	PERT	S186R
417*-418*	定常	立体的	D3H44	A139W_V190I	F116A_L135V	PERT	WT

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
354*-353*	L135W_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	16:84	16:84
306*-304*	F116A_Q124E_L135A_T180E	22:8:53:17	無	1	16:84	16:84
397*-398*	T178E	22:8:46:24	無	1	15:85	15:85
399*-400*	T178E_T180E	22:8:46:24	無	1	15:85	15:85
401*-402*	Q124E_T178E	22:8:46:24	無	1	14:86	14:86
403*-404*	L135W	22:8:46:24	無	1	13:87	13:87
382*-381*	Q38E_F116A	22:8:46:24	無	1	13:87	13:87
405*-391*	T178E_T180E	22:8:46:24	無	1	13:87	13:87
406*-407*	Q124E_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	13:87	13:87
408*-377*	P44F	22:8:46:24	無	1	12:88	12:88
409*-410*	V133F	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
55-56	Q38E	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
371*-370*	Q38E_F116A_L135V	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
377*-408*	WT	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
411*-384*	N137K_S174R	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
412*-413*	Q160E_T178E	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
53-54	WT	22:8:46:24	無	1	11:89	11:89
414*-413*	Q160E_T178E	22:8:46:24	無	1	10:90	10:90
415*-416*	Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	10:90	10:90
417*-418*	L135W	22:8:46:24	無	1	10:90	10:90

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
354*-353*	-1.66	2.06	7.8	1.3	0	1.8	6.9	0
306*-304*	-1.67	2.05	1.9	0.1	0	0	2.1	0
397*-398*	-1.72	2	7	1.3	4.8	0	1.3	0
399*-400*	-1.76	1.96	8.4	1.5	0	0	0	0
401*-402*	-1.84	1.88	5.5	1	4.8	0	0	0
403*-404*	-1.87	1.85	4.9	0.7	0	0	3.9	0
382*-381*	-1.88	1.84	8.3	1.3	0	0	0	0
405*-391*	-1.92	1.8	7.6	1.8	1.5	0	1.5	0
406*-407*	-1.93	1.79	4	0.6	5.6	0	0	0
408*-377*	-2.04	1.68	3.3	1.3	1	0	5.6	0
409*-410*	-2.06	1.66	3.5	0.6	0	0	0	0
55-56	-2.1	1.62	4.9	1.9	0	0	0	0
371*-370*	-2.11	1.61	6.7	0.7	0	0	0	0
377*-408*	-2.11	1.61	4.8	0.6	0	0	2.7	0
411*-384*	-2.12	1.6	5.4	0.7	0	6.5	0	0
412*-413*	-2.13	1.59	5.5	1.4	0	0	2.4	0
53-54	-2.14	1.58	4.8	0.7	0	0	0	0
414*-413*	-2.18	1.54	4.7	1.8	2.1	0	0	0
415*-416*	-2.18	1.54	4.4	1	1.6	0	4.5	0
417*-418*	-2.19	1.53	5.3	0.4	0	0	3.2	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
354*-353*	0	1	0	41.7	7.2	33.6	0	0
306*-304*	0	0	3.2	29.7	13.9	49.2	0	0
397*-398*	0	0	0	57.4	3.4	26.1	0	0
399*-400*	0	1.3	0	71.1	3.2	14	0	1.8
401*-402*	0	0	0	74.5	1.8	11.8	0	1.6
403*-404*	0	1.5	1.5	51.1	5.8	30.1	0	1.2
382*-381*	0	0	0	77.2	1.8	9.5	0	3.1
405*-391*	0	0	0	59.5	3.7	26.2	0	0
406*-407*	0	0	0	81.7	0	5.5	0	3.1
408*-377*	0	2.1	0	71.9	0	11	0	5.1
409*-410*	0	3.9	0	81.8	0	6.9	0	3.9
55-56	0	1.4	1.9	77.3	1.5	9.9	0	3.1
371*-370*	0	0	0	71.4	2.6	17.7	0	1.5
377*-408*	0	0	0	65.6	4.8	20.8	0	1.2
411*-384*	0	0	0	61.6	3.9	21.1	0	1.4
412*-413*	0	0	0	60.5	5.1	26.6	0	0
53-54	0	0	1.8	79.3	1.7	8.4	0	4
414*-413*	0	0	0	80.6	1.3	9.2	0	2.1
415*-416*	0	0	0	56.4	4.2	29	0	0
417*-418*	0	1.1	0	60.5	3.7	26.2	0	0

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
419*-420*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143K
421*-422*	定常	静電気的	D3H44	WT	WT	PERT	L143E_K145T
374*-373*	可変	立体的	D3H44	L45A	P44W	PERT	L45F
423*-418*	定常	立体的	D3H44	A139W	F116A_L135V	PERT	WT
424*-260	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	PERT	S186R
425*-404*	定常	立体的	D3H44	A139W_V190L	F116A	PERT	WT
419*-426*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	S186R
427*-418*	定常	立体的	D3H44	A139W_V190L	F116A_L135V	PERT	WT
428*-396*	定常	静電気的	D3H44	H172R_T192K	WT	PERT	H172T
392*-374*	可変	立体的	D3H44	WT	WT	PERT	L45A
429*-430*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	S131R	PERT	S186R
54-53	可変	静電気的	D3H44	WT	WT	PERT	Q39R
431*-418*	定常	立体的	D3H44	A139W_G141L_V190S	F116A_L135V	PERT	WT
432*-426*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
433*-434*	定常	立体的	D3H44	A139W_G141L_V190S	F116A_F118L_L135V	PERT	WT
435*-283	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	S186R
		静電気的					
56-55	可変	対称水性	D3H44	Q39R	Q38E	PERT	Q39M
435*-436*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T_S188L	Q124R	PERT	L143K
437*-326*	定常	静電気的	D3H44	K145T_Q179E	S131K	PERT	S186R
438*-285	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
439*-283	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
440*-441*	定常	静電気的	D3H44	K145T_S186E_S188L	Q124R	PERT	S186R
			D3H44	WT	WT	TRAS	WT
331*-257	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	L143E_K145T

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
419*-420*	Q124E_T178E	22:8:46:24	無	1	10:90	10:90
421*-422*	Q124R	15:15:35:35	無	1	10:90	10:90
374*-373*	WT	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
423*-418*	L135W	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
424*-260	Q124E_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
425*-404*	L135W	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
419*-426*	Q124E_T178E	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
427*-418*	L135W	22:8:46:24	無	1	9:91	9:91
428*-396*	S174R	22:8:46:24	無	1	8:92	8:92
392*-374*	P44W	22:8:46:24	無	1	8:92	8:92
429*-430*	Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	8:92	8:92
54-53	Q38E	22:8:46:24	無	1	7:93	7:93
431*-418*	L135W	22:8:46:24	無	1	7:93	6:94
432*-426*	Q124E_T178E	22:8:46:24	無	1	6:94	6:94
433*-434*	L135W	22:8:46:24	無	1	5:95	5:95
435*-283	T178E	22:8:46:24	無	1	5:95	5:95
56-55	Q38M	22:8:46:24	無	1	5:95	5:95
435*-436*	T178E	22:8:46:24	無	1	3:97	3:97
437*-326*	Q124E_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	3:97	3:97
438*-285	Q124E_Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	2:98	2:98
439*-283	T178E	22:8:46:24	無	1	2:98	2:98
440*-441*	Q160E_T180E	22:8:46:24	無	1	0:100	0:100
	WT	22:8:53:17	無	2	30:70_41:59	35:65
331*-257	Q124R_Q160K_T178R	20:10:53:17	無	1	97:3	97:3

固有の識別名セット	対合／＿誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合／＿誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
419*-420*	-2.2	1.52	6.3	1.6	0	0	0	0
421*-422*	-2.25	1.47	3.4	0.3	0	0	0	0
374*-373*	-2.29	1.43	6.2	1.3	0	0	0	0
423*-418*	-2.3	1.42	4	0.4	0	0	3.2	0
424*-260	-2.3	1.42	3.6	0.6	0	0	3.2	0
425*-404*	-2.31	1.41	3.8	0.6	0	0	2.4	0
419*-426*	-2.34	1.38	3.2	1	1.2	0	2.1	0
427*-418*	-2.35	1.37	3.6	0.4	0	0	4.6	0
428*-396*	-2.39	1.33	1.4	1.1	1.4	1.2	1.2	0
392*-374*	-2.44	1.28	3.3	1	0	0	0	0
429*-430*	-2.45	1.27	2.5	0.3	4.2	0	1.3	0
54-53	-2.54	1.18	3	1	0	0	0	0
431*-418*	-2.67	1.05	4.2	0.5	0	0	3.8	0
432*-426*	-2.77	0.95	3.6	0.9	0	0	0	0
433*-434*	-2.88	0.84	3.5	0.5	0	0	1.6	0
435*-283	-2.9	0.82	2.1	1	1.3	0	4.7	0
56-55	-3.03	0.69	1.6	0.6	0	0	1.2	0
435*-436*	-3.41	0.31	1.4	0.5	0	0	2.1	0
437*-326*	-3.58	0.14	0	0.4	1.5	0	3.1	0
438*-285	-3.75	-0.03	1.2	0.5	0	0	2.1	0
439*-283	-3.89	-0.17	0	0.6	0	0	0	0
440*-441*	-5	-1.28	0	0.4	0	0	1.1	0
	-0.61	0	21.5	4.7	0	0	0	0
331*-257	3.62	4.23	63.3	1.7	2.5	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
419*-420*	0	0	0	78.2	2.5	11.8	0	1.2
421*-422*	0	0	0	88.8	0	1.7	0	6.1
374*-373*	0	0	0	85.9	0	4.9	0	3
423*-418*	0	1.9	0	61.5	2.1	26.2	0	1.1
424*-260	0	0	0	44.4	5.5	43.3	0	0
425*-404*	0	2.6	0	75.9	1.6	12.6	0	1
419*-426*	0	0	0	58.6	3.3	30.5	0	1.1
427*-418*	0	1.1	1.4	51.3	2.9	34	0	1.1
428*-396*	0	0	0	74.7	0	14.5	0	5.6
392*-374*	0	0	0	86	0	6	0	4.7
429*-430*	0	0	0	65.1	1.2	25.6	0	0
54-53	0	0	0	72.6	4.3	20.1	0	0
431*-418*	0	0	0	66.7	2.3	23	0	0
432*-426*	0	0	0	75.2	2.3	18.9	0	0
433*-434*	0	0	1.2	80.6	1.8	11.3	0	0
435*-283	0	0	0	65.4	1.8	24.7	0	0
56-55	0	0	0	59.8	1.8	34.5	0	1.2
435*-436*	0	0	0	61.6	1.8	33.1	0	0
437*-326*	0	0	0	60	0	34.2	0	1.2
438*-285	0	0	0	58.9	1.1	36.8	0	0
439*-283	0	0	0	90.9	0	7.1	0	2
440*-441*	0	0	0	79.1	0	19.8	0	0
	0	1.3	8.55	39.65	4.1	12.25	4.15	8.55
331*-257	0	0	2.6	0	31.6	0	0	0

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
332*-284	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	L143E_K145T
90-92	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	TRAS	V37I_Q39R
34-39	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	TRAS	Q39R
39-34	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R	Q38E	TRAS	V37W_Q39E
442*-23	定常	静電気的	D3H44	S115K_S156K_S186R	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	K145L_Q179E
92-90	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	TRAS	V37W_Q39E
284-332*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R	TRAS	D146G_Q179K
257-331*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	TRAS	D146G_Q179K
443*-326*	定常	静電気的	D3H44	S115K_K145L_S156K_Q179E	S131K	TRAS	S186R
			D3H44	WT	WT	RAMU	WT
332*-284	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T
34-39	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	Q39R
284-332*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R	RAMU	D146G_Q179K
90-92	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	V37I_Q39R
442*-23	定常	静電気的	D3H44	S115K_S156K_S186R	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	K145L_Q179E
257-331*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	RAMU	D146G_Q179K
331*-257	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T
443*-326*	定常	静電気的	D3H44	S115K_K145L_S156K_Q179E	S131K	RAMU	S186R

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種（すべて）	対合種:誤対合種（平均）
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
332*-284	Q124R	20:10:53:17	無	1	88:12	88:12
90-92	Q38D_F98W	20:10:53:17	無	1	86:14	86:14
34-39	Q38E	20:10:53:17	無	1	81:19	81:19
39-34	Q38R_F98A	20:10:53:17	無	1	78:22	78:22
442*-23	S131K	20:10:53:17	無	1	72:28	72:28
92-90	Q38R_F98A	20:10:53:17	無	1	68:32	68:32
284-332*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	58:42	57:43
257-331*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	47:53	47:53
443*-326*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	42:58	42:58
	WT	22:8:53:17	無	2	25:75_42:58	33:67
332*-284	Q124R	20:10:53:17	無	1	82:18	82:18
34-39	Q38E	20:10:53:17	無	1	82:18	82:18
284-332*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	75:25	75:25
90-92	Q38D_F98W	20:10:53:17	無	1	74:26	74:26
442*-23	S131K	20:10:53:17	無	1	70:30	70:30
257-331*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	66:34	65:35
331*-257	Q124R_Q160K_T178R	20:10:53:17	無	1	58:42	58:42
443*-326*	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17	無	1	41:59	41:59

固有の識別名セット	対合／＿誤対合 のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合／＿誤対合 のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
332*-284	1.98	2.59	48.2	1.6	2.1	0	0	0
90-92	1.84	2.45	52.4	4.6	0	0	0	0
34-39	1.42	2.03	56.9	4.3	0	0	0	0
39-34	1.25	1.86	42	5.4	0	0	0	0
442*-23	0.92	1.53	37.7	4	0	0	0	0
92-90	0.75	1.36	56.4	9	0	0	0	0
284-332*	0.3	0.91	17.2	1.8	0	0	0	0
257-331*	-0.11	0.5	8.9	0.8	0	0	0	0
443*-326*	-0.34	0.27	33.8	2.5	0	0	0	0
	-0.695	-0.01	24.85	3.9	0	0.95	0.95	0
332*-284	1.54	2.24	55.3	8	1.9	3.7	0	0
34-39	1.49	2.19	61	8	0	0	0	0
284-332*	1.08	1.78	45.3	7.9	0	0	0	0
90-92	1.04	1.74	49	6.6	1.1	0	0	0
442*-23	0.87	1.57	41.2	9.2	0	0	0	0
257-331*	0.64	1.34	22.1	3.9	0	0	0	0
331*-257	0.32	1.01	26.1	3.7	3.3	2.3	0	0
443*-326*	-0.37	0.32	29.2	3.9	0	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
332*-284	0	0	1.9	4.6	37.6	5.6	0	0
90-92	3.7	2.1	3.9	0	4.8	2.7	3.4	26.9
34-39	1.3	0	3	10.5	3.5	3.3	1.3	20.2
39-34	0	2.6	5.3	10.5	4	1.7	4.7	29.1
442*-23	0	1.2	13.7	0	4.3	0	14.8	28.3
92-90	1	0	11.2	15.4	7.3	3.1	1.5	4.2
284-332*	1.1	8.3	0	34.1	2.4	5.8	1.4	29.6
257-331*	0	5	0	45.3	0	7.4	0	33.4
443*-326*	0	0	1.6	46.1	7.8	10.7	0	0
	0	0	0	27.25	1.6	30.5	6.55	7.35
332*-284	0	0	12.4	0	19.9	1.6	0	5.2
34-39	0	0	5	9.1	8	2.5	1.8	12.5
284-332*	0	0	4	14.7	3.8	1.7	5	25.5
90-92	0	0	17.6	1.2	9.4	0	7.4	14.3
442*-23	0	0	14.7	0	2	0	14.8	27.2
257-331*	0	0	1	30.4	2.2	1.7	1.4	41.2
331*-257	0	0	36.3	0	25	0	3.4	3.6
443*-326*	0	0	13.1	33.8	8.7	11	1.3	2.9

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異
			D3H44	WT	WT	PERT	WT
39-34	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	Q39R	Q38E	RAMU	V37W_Q39E
92-90	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	RAMU	V37W_Q39E
			TRAS	WT	WT	RAMU	WT
257-331*	定常	静電気的	TRAS	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	RAMU	D146G_Q179K
23-326*	定常	静電気的	TRAS	K145L_Q179E	S131K	RAMU	S186R
284-332*	定常	静電気的	TRAS	L143E_K145T	Q124R	RAMU	D146G_Q179K
34-39	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	Q39R
326*-23	定常	静電気的	TRAS	S186R	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	K145L_Q179E
92-90	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	TRAS	V37I_Q39R	Q38D_F98W	RAMU	V37W_Q39E
90-92	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	V37I_Q39R
332*-284	定常	静電気的	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T
39-34	可変	組み合わせ（静電気的 + 立体的）	TRAS	Q39R	Q38E	RAMU	V37W_Q39E
331*-257	定常	静電気的	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T

固有の識別名セット	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)
	WT	22:8:53:17	有	2	3:97_2:98	2:98
39-34	Q38R_F98A	20:10:53:17	無	1	38:62	38:62
92-90	Q38R_F98A	20:10:53:17	無	1	23:77	22:78
	WT	8:22:35:35	無	2	46:54_52:48	49:51
257-331*	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35	無	1	93:7	93:7
23-326*	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35	無	1	89:11	89:11
284-332*	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35	無	1	79:21	79:21
34-39	Q38E	8:22:35:35	無	1	42:58	42:58
326*-23	S131K	8:22:35:35	無	1	35:65	35:65
92-90	Q38R_F98A	8:22:35:35	無	1	31:69	31:69
90-92	Q38D_F98W	8:22:35:35	無	1	26:74	26:74
332*-284	Q124R	8:22:35:35	無	1	22:78	22:78
39-34	Q38R_F98A	8:22:35:35	無	1	13:87	13:87
331*-257	Q124R_Q160K_T178R	8:22:35:35	無	1	5:95	5:95

固有の識別名セット	対合_/_誤対合のスカラー	Δ (VAR-REF_WT) 対合_/_誤対合 のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1
	-3.72	0	1.55	存在せず	0	0	0	0
39-34	-0.48	0.21	19	3.8	5.1	3.9	0	0
92-90	-1.24	-0.55	8	1.6	4	1.7	0	0
	-0.05	0	40.8	6.3	0	0	0	0
257-331*	2.51	2.56	63.1	6.9	0	0	0	0
23-326*	2.09	2.14	58.4	2.1	0	0	0	0
284-332*	1.34	1.39	45.5	4.5	0	0	0	0
34-39	-0.33	-0.28	31.5	3.6	0	0	0	0
326*-23	-0.64	-0.59	23.3	1	0	0	0	0
92-90	-0.79	-0.74	20.3	1.5	0	0	0	0
90-92	-1.04	-0.99	14.4	1.4	0	0	0	0
332*-284	-1.29	-1.24	12.3	1.2	0	0	0	0
39-34	-1.94	-1.89	7.9	1.1	0	0	0	1.1
331*-257	-2.9	-2.85	2.7	0.4	0	0	0	1.1

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
39-34	0	0	35.5	0	5.5	1.6	20.7	8.7
92-90	0	0	58.2	0	7.2	0	17.6	3.3
	0	0	15.8	13.9	1.55	3.15	18.4	6.45
257-331*	0	0	4.2	1.2	2.1	0	2.1	27.4
23-326*	0	1.6	5.2	2.2	0	0	3.6	29
284-332*	0	0	11	0	1.3	0	9.8	32.3
34-39	0	0	46.2	0	2.1	0	12	8.3
326*-23	0	0	45.7	0	1.2	0	19.8	10.1
92-90	0	0	45.2	0	1.6	0	23.6	9.2
90-92	0	0	57.5	1.1	5.2	0	15.3	6.4
332*-284	0	0	53.1	0	2.2	0	25.3	7.1
39-34	0	0	62.1	0	1.5	0	24.1	3.2
331*-257	0	0	51.6	0	0	0	42.2	2.5

【０３３１】
（表２３）

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比	pA後に行われたSECステップは?
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	18:12:35:35	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	18:12:46:24	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	18:12:56:14	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	22:8:35:35	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	22:8:46:24	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	22:8:56:14	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	26:4:35:35	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	26:4:46:24	無
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	26:4:56:14	無

固有の識別名セット	実験の数	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)	対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)サイドピーク	H1-L1_H1-L1
340*-339*	1	84:16	84:16	1.66	77.2	5.7	0
340*-339*	1	87:13	87:13	1.87	80.5	6.4	0
340*-339*	1	86:14	86:14	1.84	36.8	3.4	2.1
340*-339*	1	78:22	78:22	1.25	33	2.8	2
340*-339*	2	80:20_81:19	81:19	1.425	31.35	3.7	0.9
340*-339*	1	89:11	89:11	2.07	34.5	3.2	0
340*-339*	1	75:25	75:25	1.1	4.7	0.8	7.5
340*-339*	1	81:19	81:19	1.47	7.9	1	6.9
340*-339*	1	92:8	92:8	2.47	12.2	1.6	3.2

【０３３２】

（表２４）

固有の識別名セット	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
340*-339*	0	0	0	1.7	2	2.6	11.7	1.1	0	0	3.6
340*-339*	0	0	0	1.9	3.4	7.1	4.4	0	0	0	2.8
340*-339*	0	0	0	1.4	1.8	6	1.1	45.5	5.2	0	0
340*-339*	0	0	0	0	1.3	1.1	6.6	41.5	14.6	0	0
340*-339*	0	0	0	1.9	2.95	5	2.9	44.65	8.8	0.75	0.8
340*-339*	0	0	0	1.5	2.8	4.7	0	51.3	5	0	0
340*-339*	2.9	0	0	0	0	0	1.1	62.7	21	0	0
340*-339*	1.8	0	0	0	0	0	1.3	66.5	15.6	0	0
340*-339*	0	0	0	0	1.9	2	0	74.9	5.8	0	0

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比
335*-336*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	V37W_L124E	F98A_V133A_S176K	PERT	L124R	F98W_V133G_S176D	22:8:35:35
333*-334*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的)	D3H44	Q39E_S186R	Q38R_Q160E_T180E	PERT	Q39R_K145T_Q179E	Q38E_S131K	22:8:46:24
326*-23	定常	静電気的	D3H44	S186R	Q124E_Q160E_T180E	PERT	K145L_Q179E	S131K	22:8:56:14
331*-257	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	PERT	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	22:8:46:24
154-152	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	PERT	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	15:15:35:35
313*-337*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	L45A	P44W	22:8:46:24
340*-337*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	L45A	P44W	15:15:35:35
336*-335*	定常と可変の組み合わせ	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	L124R	F98W_V133G_S176D	PERT	V37W_L124E	F98A_V133A_S176K	22:8:46:24
92-90	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	*D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	PERT	V37W_Q39E	Q38R_F98A	22:8:35:35

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比
				L143A_D146G_Q1	Q124E_V133W_Q160E_T180E		K145T_Q179D_S1	V133A_Q160K_T	
66-67	定常	静電気的	D3H44	79R		PERT	88F	178R	18:12:35:35
340*-339*	可変	立体的	D3H44	V37W_W103F	F98A	PERT	W103V	P44W	18:12:46:24
		組み合わせ(静電気的+立体的)					A139W_K145Y_Q	F116A_S131K_L1	
329*-330*	定常		*D3H44	A139G_V190A	L135W	PERT	179E	35A	20:10:46:24
		組み合わせ(静電気的+立体的)					A139W_K145Y_Q	F116A_S131K_L1	
329*-330*	定常		*D3H44	A139G_V190A	L135W	PERT	179E	35A	22:8:46:24
300-349*	可変	立体的	D3H44	V37W	F98A	PERT	W103F	P44F	22:8:46:24
		組み合わせ(静電気的+立体的)		V37A_Q39R_W103					
152-154	可変		D3H44	V	Q38E_P44W	PERT	V37W_Q39E	Q38R_F98A	26:4:56:14
		組み合わせ(静電気的+立体的)							
92-90	可変		*D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	PERT	V37W_Q39E	Q38R_F98A	20:10:40:30
		組み合わせ(静電気的+立体的)							
34-39	可変		D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	PERT	Q39R	Q38E	22:8:46:24

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比
332*-284	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	L143E_K145T	Q124R Q124R_Q160K_T	20:10:53:17
331*-257	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	L143E_K145T	178R	20:10:53:17
90-92	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	TRAS	V37I_Q39R	Q38D_F98W	20:10:53:17
92-90	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	20:10:53:17
34-39	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	TRAS	Q39R	Q38E	20:10:53:17
39-34	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	D3H44	Q39R S115K_S156K_S18	Q38E	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	20:10:53:17
442*-23	定常	静電気的	D3H44	6R	Q124E_Q160E_T180E	TRAS	K145L_Q179E	S131K	20:10:53:17
257-331*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T 180E	20:10:53:17
284-332*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T S115K_K145L_S15	Q124R	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T 180E	20:10:53:17
443*-326*	定常	静電気的	D3H44	6K_Q179E	S131K	TRAS	S186R	Q124E_Q160E_T 180E	20:10:53:17

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比
34-39	可変	組み合わせ（静電気的＋立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	Q39R	Q38E	20:10:53:17
332*-284	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T	Q124R	20:10:53:17
257-331*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	RAMU	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17
284-332*	定常	静電気的	D3H44	L143E_K145T	Q124R	RAMU	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17
90-92	可変	組み合わせ（静電気的＋立体的）	D3H44	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	V37I_Q39R	Q38D_F98W	20:10:53:17
442*-23	定常	静電気的	D3H44	S115K_S156K_S186R	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	K145L_Q179E	S131K	20:10:53:17
331*-257	定常	静電気的	D3H44	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	20:10:53:17
443*-326*	定常	静電気的	D3H44	S115K_K145L_S156K_Q179E	S131K	RAMU	S186R	Q124E_Q160E_T180E	20:10:53:17
92-90	可変	組み合わせ（静電気的＋立体的）	D3H44	V37I_Q39R	Q38D_F98W	RAMU	V37W_Q39E	Q38R_F98A	20:10:53:17
39-34	可変	組み合わせ（静電気的＋立体的）	D3H44	Q39R	Q38E	RAMU	V37W_Q39E	Q38R_F98A	20:10:53:17
257-331*	定常	静電気的	TRAS	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	RAMU	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35

固有の識別名セット	Fab領域	設計タイプ	H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	H1:H2:L1:L2 DNA比
23-326*	定常	静電気的	TRAS	K145L_Q179E	S131K	RAMU	S186R	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35
284-332*	定常	静電気的	TRAS	L143E_K145T	Q124R	RAMU	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	8:22:35:35
92-90	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	TRAS	V37I_Q39R	Q38D_F98W	RAMU	V37W_Q39E	Q38R_F98A	8:22:35:35
34-39	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	Q39R	Q38E	8:22:35:35
90-92	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	TRAS	V37W_Q39E	Q38R_F98A	RAMU	V37I_Q39R	Q38D_F98W	8:22:35:35
332*-284	定常	静電気的	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T	Q124R	8:22:35:35
326*-23	定常	静電気的	TRAS	S186R	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	K145L_Q179E	S131K	8:22:35:35
39-34	可変	組み合わせ(静電気的+立体的)	TRAS	Q39R	Q38E	RAMU	V37W_Q39E	Q38R_F98A	8:22:35:35
331*-257	定常	静電気的	TRAS	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	RAMU	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	8:22:35:35

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合_/_誤対合のスカラー	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)**	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)サイドピーク**	**H1-L1_H1-L1**	**H1-L1_H1-L2**	**H1-L2_H1-L2**
335*-336*	無	1	100:0	5	88.6	12	0	0	0
333*-334*	無	1	100:0	5	73.2	5	0	0	0
326*-23	無	1	99:1	4.41	12	0.6	5.9	0	0
331*-257	無	1	99:1	4.41	2.7	0.3	10.3	0	0
154-152	無	1	98:2	3.89	67.3	2.6	0	0	0
313*-337*	無	1	97:3	3.62	57.5	3.6	1	0	0
340*-337*	無	1	96:4	3.08	68.3	5.6	0	0	0
336*-335*	無	1	93:7	2.57	71.1	7.2	0	0	0
92-90	無	1	92:8	2.42	42.5	3	1.4	0	0
66-67	無	1	91:9	2.27	22.8	1	3.3	0	0
340*-339*	無	1	85:15	1.72	55.5	4.5	0	0	0
329*-330*	無	1	83:17	1.56	26.3	1.3	0	0	0
329*-330*	無	1	83:17	1.56	19.5	1.1	1.1	0	0
300-349*	無	1	77:23	1.2	34.8	1.9	0	0	0

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合_/_誤対合のスカラー	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)**	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)** サイドピーク	**H1-L1_H1-L1**	**H1-L1_H1-L2**	**H1-L2_H1-L2**
152-154	無	1	71:29	0.91	47.2	2.5	0	0	0
92-90	無	1	68:32	0.75	41.3	1	0	0	0
34-39	無	1	19:81	-1.46	2.2	0.9	0	0	0
332*-284	無	1	96:4	3.23	47.4	1.4	2	0	0
331*-257	無	1	88:12	1.96	61.7	2.2	0	0	0
90-92	無	1	87:13	1.87	66.8	4.7	0	0	0
92-90	無	1	81:19	1.45	32.1	4.7	0	0	0
34-39	無	1	79:21	1.31	59.7	5.5	0	0	0
39-34	無	1	74:26	1.06	56.6	8.1	0	0	0
442*-23	無	1	68:32	0.75	41.4	3.8	1.2	1.7	0
257-331*	無	1	64:36	0.58	31.4	2.8	0	0	0
284-332*	無	1	49:51	-0.04	28.4	3.5	0	0	0
443*-326*	無	1	44:56	-0.24	31.3	2.3	0	0	0

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2
34-39	無	1	81:19	1.42	61.2	7.6	0	0	0
332*-284	無	1	80:20	1.41	58.9	7.6	2.1	4.9	0
257-331*	無	1	80:20	1.39	12.7	2	0	0	0
284-332*	無	1	77:23	1.23	19.5	3.5	0	0	0
90-92	無	1	74:26	1.03	40.5	5.1	0	0	0
442*-23	無	1	69:31	0.78	28.2	6	0	0	0
331*-257	無	1	58:42	0.32	29.5	4	3.4	2.5	0
443*-326*	無	1	41:59	-0.37	22.3	3	0	0	0
92-90	無	1	39:61	-0.45	22.2	4.1	4.7	2.7	0
39-34	無	1	34:66	-0.68	10.2	1.7	2.7	1.7	0
257-331*	無	1	96:4	3.03	54.6	5.2	0	0	0
23-326*	無	1	91:9	2.29	28.4	1.3	0	0	0
284-332*	無	1	79:21	1.33	57.9	5.5	0	0	0
92-90	無	1	38:62	-0.51	14.6	1.3	0	0	0
34-39	無	1	37:63	-0.55	17.8	1.8	0	0	0

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合_/_誤対合のスカラー	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)**	**H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)** サイドピーク	**H1-L1_H1-L1**	**H1-L1_H1-L2**	**H1-L2_H1-L2**
90-92	無	1	20:80	-1.4	7.2	0.8	0	0	0
332*-284	無	1	13:87	-1.89	5.6	0.7	0	0	0
326*-23	無	1	11:89	-2.12	5.1	0.3	0	0	0
39-34	無	1	7:93	-2.6	2.7	0.6	0	0	0
331*-257	無	1	2:98	-3.75	1.1	0.2	0	0	0

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
335*-336*	0	0	1.1	0	0	7.1	0	0	3.3
333*-334*	0	0	0	0	0	24.3	0	0	2.4
326*-23	0	0	0	0	0	80.8	1.2	0	0
331*-257	0	0	0	0	0	85.9	1.2	0	0
154-152	0	0	0	0	0	25.9	2	0	4.8
313*-337*	0	0	0	0	0	37.7	2.6	0	1.1
340*-337*	0	0	0	0	4.4	1.2	0	0	26.1
336*-335*	0	0	4.4	1.8	4.2	4.1	0	1.1	13.2
92-90	0	1.5	0	1.2	1.9	46.2	3.6	0	1.9
66-67	0	0	0	1	0	64.5	8.4	0	0
340*-339*	0	0	1.2	7.3	2.3	1.9	0	5.6	26.2
329*-330*	0	0	1.6	1.5	11.9	1.9	0	3.9	52.8
329*-330*	0	0	0	0	6.2	60.3	11.2	0	1.8

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2
300-349*	0	0	1.2	0	23.1	0	0	0	40.9
152-154	0	0	0	12.3	10.2	24.1	6.1	0	0
92-90	0	0	0	0	20.2	23.3	12	0	3.3
34-39	0	0	0	77.2	0	16.6	0	4	0
332*-284	0	0	0	0	1.4	46.7	2.4	0	0
331*-257	0	0	0	12.4	0	25.9	0	0	0
90-92	0	4.8	0	3.3	1.2	7.4	2.5	1.5	12.5
92-90	0	0	4.5	2.6	12.4	0	0	4	44.3
34-39	0	2.7	0	1.7	13.1	4.3	3.7	0	14.7
39-34	0	0	0	9.9	11	4.5	1.8	3.1	13.1
442*-23	0	0	0	16	0	3.2	0	14.3	22.1
257-331*	0	2.8	4.5	0	26.8	1.8	6.4	0	26.3
284-332*	0	2.5	9.3	0	43.3	6	5.1	0	5.4
443*-326*	0	0	0	1.3	40.1	12.8	14.4	0	0
34-39	0	0	0	5	9.2	5.6	2.3	2.9	13.8
332*-284	0	0	0	13.1	0	13.9	1.6	0	5.5
257-331*	0	0	1.6	0	18.7	1.2	0	1.3	64.5
284-332*	0	0	2.8	1.9	8.8	0	0	11.9	55
90-92	0	0	0	10.4	1.7	2.5	0	14.2	30.8
442*-23	0	0	0	10.6	0	1.3	0	20.7	39.1
331*-257	0	0	0	35.3	0	20.7	0	4.3	4.2
443*-326*	0	0	0	6.9	23.8	18.7	28.4	0	0
92-90	0	0	0	42.9	0	5.7	1.9	13.6	6.4
39-34	1.1	0	0	21	0	3.3	1.8	40.8	17.5
257-331*	0	0	0	2.4	0	1.7	0	2.2	39.2
23-326*	0	0	3.3	2.1	0	0	0	7.1	59.1
284-332*	0	0	0	15.6	0	2.4	0	5.4	18.8
92-90	0	0	0	22.9	1.2	0	0	38.3	23

固有の識別名セット	pA後に行われたSECステップは?	実験の数	対合:誤対合された種	対合／誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (およびH1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2	H1-L2_H1-L2
34-39	0	0	0	31.8	0	1.2	0	31.7	17.5
90-92	0	0	0	45	0	1.8	0	35.2	10.8
332*-284	1.1	0	0	34.4	0	0	0	51.4	7.5
326*-23	1.6	0	0	37.1	0	0	0	50.5	5.6
39-34	0	0	0	81.4	0	2.9	0	11.7	1.3
331*-257	1.1	0	0	55.2	0	0	0	41.4	1.2

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
335*-336*	0	0	1.1	0	0	7.1	0	0	3.3
333*-334*	0	0	0	0	0	24.3	0	0	2.4
326*-23	0	0	0	0	0	80.8	1.2	0	0
331*-257	0	0	0	0	0	85.9	1.2	0	0
154-152	0	0	0	0	0	25.9	2	0	4.8
313*-337*	0	0	0	0	0	37.7	2.6	0	1.1
340*-337*	0	0	0	0	4.4	1.2	0	0	26.1
336*-335*	0	0	4.4	1.8	4.2	4.1	0	1.1	13.2
92-90	0	1.5	0	1.2	1.9	46.2	3.6	0	1.9
66-67	0	0	0	1	0	64.5	8.4	0	0
340*-339*	0	0	1.2	7.3	2.3	1.9	0	5.6	26.2
329*-330*	0	0	1.6	1.5	11.9	1.9	0	3.9	52.8
329*-330*	0	0	0	0	6.2	60.3	11.2	0	1.8
300-349*	0	0	1.2	0	23.1	0	0	0	40.9
152-154	0	0	0	12.3	10.2	24.1	6.1	0	0
92-90	0	0	0	0	20.2	23.3	12	0	3.3
34-39	0	0	0	77.2	0	16.6	0	4	0
332*-284	0	0	0	0	1.4	46.7	2.4	0	0
331*-257	0	0	0	12.4	0	25.9	0	0	0
90-92	0	4.8	0	3.3	1.2	7.4	2.5	1.5	12.5
92-90	0	0	4.5	2.6	12.4	0	0	4	44.3
34-39	0	2.7	0	1.7	13.1	4.3	3.7	0	14.7
39-34	0	0	0	9.9	11	4.5	1.8	3.1	13.1
442*-23	0	0	0	16	0	3.2	0	14.3	22.1
257-331*	0	2.8	4.5	0	26.8	1.8	6.4	0	26.3
284-332*	0	2.5	9.3	0	43.3	6	5.1	0	5.4
443*-326*	0	0	0	1.3	40.1	12.8	14.4	0	0
34-39	0	0	0	5	9.2	5.6	2.3	2.9	13.8
332*-284	0	0	0	13.1	0	13.9	1.6	0	5.5
257-331*	0	0	1.6	0	18.7	1.2	0	1.3	64.5
284-332*	0	0	2.8	1.9	8.8	0	0	11.9	55
90-92	0	0	0	10.4	1.7	2.5	0	14.2	30.8
442*-23	0	0	0	10.6	0	1.3	0	20.7	39.1
331*-257	0	0	0	35.3	0	20.7	0	4.3	4.2

固有の識別名セット	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
443*-326*	0	0	0	6.9	23.8	18.7	28.4	0	0
92-90	0	0	0	42.9	0	5.7	1.9	13.6	6.4
39-34	1.1	0	0	21	0	3.3	1.8	40.8	17.5
257-331*	0	0	0	2.4	0	1.7	0	2.2	39.2
23-326*	0	0	3.3	2.1	0	0	0	7.1	59.1
284-332*	0	0	0	15.6	0	2.4	0	5.4	18.8
92-90	0	0	0	22.9	1.2	0	0	38.3	23
34-39	0	0	0	31.8	0	1.2	0	31.7	17.5
90-92	0	0	0	45	0	1.8	0	35.2	10.8
332*-284	1.1	0	0	34.4	0	0	0	51.4	7.5
326*-23	1.6	0	0	37.1	0	0	0	50.5	5.6
39-34	0	0	0	81.4	0	2.9	0	11.7	1.3
331*-257	1.1	0	0	55.2	0	0	0	41.4	1.2

【０３３３】
（表２５）

固有の識別名セット	H1-L1_H2-L2 Tm (°C)	pH	pA後に行われたSEC精製は?	抗原親和性-TF KD (nM)	抗原親和性-HER2 KD(nM)
300-349*	69.66, 79.94	7	有	ND	ND
340*-337*	69, 75.54	7	有	1.31	2.8
340*-339*	*69*, 75.94	7	有	1.34	12.9
326*-23	77.16	7	有	0.03	4.14
92-90	70.42, *73*	7	有	0.01	7.09
313*-337*	70.65, 78.26	7	有	0.9	3.29
333*-334*	72.07	7	有	0.02	1.02
335*-336*	69.5, 76.5	7	有	1.04	4.71
336*-335*	65.2, 75.35	7	有	0.01	16.7
329*-330*	72.57	7	無	0.04	3.69
# 329*-330*	71.99	7	無	0.04	5.16
# 92-90	70.53	7	無	0.03	10.4
154-152	75.5	7	無	0.6	NB
300-349*	70.62, 80.1	7	無	0.4	6.49
333*-334*	72.89	4	無	ND	ND
327*-328*	74.69	4	無	ND	ND
313*-339*	77.53	4	無	ND	ND
338*-299	75.98	4	無	ND	ND
313*-337*	77.39	4	無	ND	ND
331*-257	77.83	4	無	ND	ND
332*-284	77.22	4	無	ND	ND
326*-23	78.53	4	無	ND	ND
92-90	69.6, *72*	4	無	ND	ND
34-39	73.35	4	無	ND	ND
325*-31	78.17	4	無	ND	ND

固有の識別名セット	H1-L1_H2-L2 Tm (°C)	pH	pA後に行われたSEC精製は?	抗原親和性-TF KD (nM)	抗原親和性-HER2 KD(nM)
305*-307*	78.35	4	無	ND	ND
90-92	70.43	4	無	ND	ND

【０３３４】
（表２６）

【０３３５】
（表２７）

H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	L1_タグ	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	L2_タグ	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数
D3H44	WT	WT	HA	PERT	WT	WT	FLAG	22:8:53:17	有	2
D3H44	WT	WT	なし	PERT	WT	WT	FLAG	22:8:53:17	有	1
D3H44	WT	WT	FLAG	PERT	WT	WT	HA	22:8:53:17	有	1

H1-L1_Ab	対合種:誤対合種（すべて）	対合種:誤対合種（平均）	対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2（および H1-L2_H2-L1）	H1-L1_H2-L2（および H1-L2_H2-L1）サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2
D3H44	3:97_2:98	2:98	-3.72	1.55	0	0	0
D3H44	18:82	18:82	-1.5	18.2	0	0	0
D3H44	1:99	1:99	-4.59	0	0	0	1.3

H1-L1_Ab	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
D3H44	0	0	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
D3H44	0	0	0	0	5.4	76.4	0	0	0	0
D3H44	0	0	10	1	85.6	2	0	0	0	0

【０３３６】
（表３０）

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
92-90	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
111-112	Q39D_A139G_V190A	Q38R_L135W	Q39R_A139W	Q38D_F116A_L135A
57-58	L143K_D146G	Q124E_V133D	L143E_K145T	Q124R
66-67	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R
106-97	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L
1--2	S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145L_Q179E	S131K
152-154	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
72-65	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
107-108	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135A

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
164-165	A139G_K145L_Q179E_V190A	S131R_L135W	A139W	F116A_L135A
236-237	A139G_K145L_Q179E_V190A	S131R_L135W	A139W	F116S_L135A
306*-304*, 304*-306*	A139G_K145T_D146G_Q179E_V190A	L135W	A139W_S186K	F116A_Q124E_L135A_T180E
208-209	A139G_S188G_V190A	L135W_S176L_T178S	A139W_S188H_V190S	F116S_L135A_S176A
215-216	A139G_S188G_V190A	V133G_L135W_S176F_T178A	A139W_S188A	F116S_L135A_S176A
194-195	A139G_V190A	F98W_L135W	V37W_W103H_A139W	F98L_F116A_L135A
107-108, 108-107	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135A
	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135V
329*-330*	A139G_V190A	L135W	A139W_K145Y_Q179E	F116A_S131K_L135A
103-104	A139G_V190A	L135W_N137A	A139W	F116A_L135A
211-212	A139I	F118W_V133S	A139S	L135R
224-225	A139I	F118W_V133S	A139V_V190S	WT
139-140	A139I_K145T_D146G_Q179E_S188G_V190S	F116A_V133G_S176F_T178A	S186K_S188H_V190G	F118W_Q124E_V133S_S176A_T178S_T180E
231-232	A139I_K145T_D146G_S188G_V190S	F116A_V133G_S176F_T178A	S186K_S188H_V190G	F118W_V133S_S176A_T178S_T180E
	A139I_V190S	F116A	A139V	F118W_V133S
246-225	A139I_V190S	WT	A139I	F118W_V133S
	A139V	F118W_V133S	A139W_V190S	F116A
	A139V	F118W_V133S	V190G	F116A
314*-315*	A139V_K145L_Q179E_S188G_V190S	F116A_S131K_V133G_S176F_T178A	A139W_S186K_S188A	F118W_V133S_S176A_T180E
	A139V_V190S	F116A	A139V	F118W_V133S
403*-404*	A139W	F116A	WT	L135W
423*-418*	A139W	F116A_L135V	WT	L135W
	A139W	F118W_V133S	V190G	F116S
346*-345*, 345*-345*	A139W	F98W_F116A	V37W	F98A_L135W

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
346*				
196-197	A139W	F98W_F116A_L135A	V37W_W103H_A139G_V190A	F98L_L135W
433*-434*	A139W_G141L_V190S	F116A_F118L_L135V	WT	L135W
431*-418*	A139W_G141L_V190S	F116A_L135V	WT	L135W
354*-353*, 353*-354*	A139W_K145T_Q179E	F116A_S131K	S186R	L135W_Q160E_T180E
	A139W_V190A	F116A	A139W	WT
	A139W_V190A	F116A	WT	WT
417*-418*	A139W_V190I	F116A_L135V	WT	L135W
425*-404*	A139W_V190L	F116A	WT	L135W
427*-418*	A139W_V190L	F116A_L135V	WT	L135W
	A139W_V190S	F116A	A139W	WT
	A139W_V190S	F116A	WT	WT
	A139W_V190S	F116S	A139W	F118W_V133S
64-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
69-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
65-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
61-71	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
113-78	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q160K_T178R
5--6	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
23-24	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	K145L_Q179E	S131K
9--5	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
332*-284, 284-332*	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	L143E_K145T	Q124R
331*-257, 257-331*	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
5-59	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	L143E_K145T	Q160K_T178R

30 20 10

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
201-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R
80-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
85-83	D146G_Q179K	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
72-64	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
234-238	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	T178R
72-69	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
72-65, 65-72	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
60-61	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
72-113	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q160K_T178R
7--6	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
7--9	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
7-59	D146G_Q179R	Q124E_Q160E_T180E	L143E_K145T	Q160K_T178R
81-201	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R
79-114	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R
80-81	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
67-79	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R
85-81	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
68-79	D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	V133A_Q160K_T178R
63-64	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
234-235	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145E_D146G_Q179D_S188L	T178R

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
63-69	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R
63-65	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
62-61	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
63-113	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T178D	L143E_K145T	Q160K_T178R
8--6	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E	K145E_D146G_Q179D_S188L	Q160K_T178R
8--9	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R
8-59	D146G_S186R	Q124E_Q160E_T180E	L143E_K145T	Q160K_T178R
207-203	F100M_W103H	P44W_L89W	V37W_F100W	F98A
207-205	F100M_W103H	P44W_L89W	V37W_F100W_W103L	F98A
202-203	F100M_W103V	P44W_L89W	V37W_F100W	F98A
202-205	F100M_W103V	P44W_L89W	V37W_F100W_W103L	F98A
	F100W	F98L	V37I	WT
	F100W	F98L	WT	WT
296-297	F100W	F98M	W103F	Y36W
344*-121, 121-344*	F100W_W103F	F98L	Q39R	Q38E_F98W
355*-186, 186-355*	F100W_W103F	F98L	WT	F98W
298-297	F100W_W103F	F98M	W103F	Y36W
254-255	F174A_S188G	S176W	F174G_S188A	WT
10--11	F174V_P175S_S188G	S176L	F174V_S188L	S176G
3-70	F174V_P175S_S188G	S176L	F174V_S188L	V133S
12--13	F174V_P175S_S188G	S176L	F174V_S188L	WT
18--11	F174V_P175S_S188G	S176L	F174W_S188L	S176G
3-133	F174V_P175S_S188G	S176L	F174W_S188L	V133S
12--15	F174V_P175S_S188G	S176L	F174W_S188L	WT
20--11	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L	S176G
3--4	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L	V133S

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
12--14	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L	WT
3-19, 19--3, 19-3	F174V_P175S_S188G	S176L	S188L_V190Y	V133S
383*-384*	H172R	WT	H172T	N137K_S174R
395*-396*	H172R	WT	H172T	S174R
411*-384*	H172R_T192K	WT	H172T	N137K_S174R
428*-396*	H172R_T192K	WT	H172T	S174R
82-201	K145E_D146G_Q179D_S188F	Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
66-114	K145E_D146G_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
1--2, 1-2	K145L_Q179E	S131K	S186R	Q124E_Q160E_T178D
23-326*, 326*-23, 442*-23, 443*-326*	K145L_Q179E	S131K	S186R	Q124E_Q160E_T180E
388*-389*	K145L_Q179E	S131K	WT	WT
80-82	K145T_Q179D_S188F	Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
66-67	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
85-82	K145T_Q179D_S188L	Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
66-68	K145T_Q179D_S188L	V133A_Q160K_T178R	L143A_D146G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T180E
437*-326*	K145T_Q179E	S131K	S186R	Q124E_Q160E_T180E
415*-416*	K145T_Q179E	S131K	S186R	Q160E_T180E
438*-285	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
432*-426*	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	Q124E_T178E
412*-413*	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	Q160E_T178E
440*-441*	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	Q160E_T180E
439*-283	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	T178E
405*-391*	K145T_S186E_S188L	Q124R	S186R	T178E_T180E
406*-407*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
401*-402*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	Q124E_T178E
393*-394*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	Q160E_T178E

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
429*-430*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	Q160E_T180E
397*-398*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	T178E
399*-400*	K145T_S186E_S188L	S131R	S186R	T178E_T180E
409*-410*	L124A	V133F	L124W	V133A
294-295, 295-294	L124E	V133A_S176K	L124R	V133G_S176D
288-289	L124E	V133G_S176R	L124R	V133A_S176D
263-264	L124E	V133G_S176R	L124R	V133G_S176D
271-272	L124E_H172R	V133A_S176K	L124R_H172A	V133A_S174W_S176D
267-268	L124E_H172R	V133G_S176R	L124R_H172A	V133A_S174W_S176D
261-262	L124E_H172R	V133G_S176R	L124R_H172A	V133G_S174W_S176D
275-276	L124E_H172W	V133A_S176K	L124R_H172T	V133G_S174R_S176D
286-287	L124E_H172W	V133G_S176R	L124R_H172T	V133A_S174R_S176D
269-270	L124E_H172W	V133G_S176R	L124R_H172T	V133G_S174R_S176D
336*-335*, 335*-336*	L124R	F98W_V133G_S176D	V37W_L124E	F98A_V133A_S176K
308*-320*	L124S	WT	L124W	F118A
265-266	L143E_K145T	Q124K_T178R	S186R	Q124E
259-260	L143E_K145T	Q124K_T178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
277-281	L143E_K145T	Q124R	L143K	Q124E
58-57, 57-58	L143E_K145T	Q124R	L143K_D146G	Q124E_V133D
277-278	L143E_K145T	Q124R	L143R	Q124E
277-280	L143E_K145T	Q124R	S186R	Q124E
366*-367*	L143E_K145T	Q124R	S186R	Q124E_Q160E_T178D
284-285	L143E_K145T	Q124R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
282-283	L143E_K145T	Q124R	S186R	T178E
277-279	L143E_K145T	Q124R	WT	Q124E
421*-422*	L143E_K145T	Q124R	WT	WT
257-258	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
424*-260	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
379*-380*	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	S186R	Q124E_T178E_T180E
290-291	L143E_K145T_S188L	Q124K	L143K	Q124E
290-293	L143E_K145T_S188L	Q124K	L143R	Q124E
290-292	L143E_K145T_S188L	Q124K	S186R	Q124E
303-281	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	Q124E
419*-420*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	Q124E_T178E
375*-385*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	Q124E_V133E
435*-436*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	T178E
368*-369*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143K	V133E
303-278	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143R	Q124E
375*-376*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143R	Q124E_V133E
368*-372*	L143E_K145T_S188L	Q124R	L143R	V133E
303-280	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	Q124E
419*-426*	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	Q124E_T178E
414*-413*	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	Q160E_T178E
435*-283	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	T178E
390*-391*	L143E_K145T_S188L	Q124R	S186R	T178E_T180E
303-279	L143E_K145T_S188L	Q124R	WT	Q124E
377*-378*, 378*-377*	L45A	P44F	L45F	WT
358*-359*, 359*-358*	L45A	P44F	V37F	F98L
299-300, 300-299	L45A	P44F	V37W	F98A
299-338*, 338*-299	L45A	P44F	V37W_W103F	F98A
377*-408*, 408*-377*	L45A	P44F	WT	WT
374*-373*, 373*-374*	L45A	P44W	L45F	WT

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
364*-356*, 356*-364*	L45A	P44W	V37F	F98L
337*-313*, 313*-337*	L45A	P44W	V37W	F98A
337*-340*, 340*-337*	L45A	P44W	V37W_W103F	F98A
374*-392*, 392*-374*	L45A	P44W	WT	WT
249-250	L45W	Y87G	V37A_W103H	P44W
86-184	Q39D	Q38N_T85K	Q39K	Q38N_T85E
21-22	Q39D	Q38R	Q39R	Q38D
75-76	Q39D	Q38R	Q39R	Q38D_F98W
16-84	Q39D	Q38R	Q39R	Q38E_F98W
161-142	Q39D	Q38R	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W
162-163	Q39D	Q38R	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W
75-77	Q39D	Q38R	V37I_Q39R	Q38D_F98W
16-17	Q39D	Q38R	V37I_Q39R	Q38E_F98W
135-136	Q39D	Q38R	V37W_Q39R	Q38D_F98A
35-36	Q39D	Q38R	V37W_Q39R	Q38E_F98A
137-138	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38D_F98A
41-42	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38E_F98A
145-147	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L
96-97	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L
145-146	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L
96-132	Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L
111-112	Q39D_A139G_V190A	Q38R_L135W	Q39R_A139W	Q38D_F116A_L135A
192-193	Q39D_A139W	Q38R_F116A_L135A	Q39R_A139G_V190A	Q38D_L135W
86-87	Q39E	Q38N_T85K	Q39K	Q38N_T85E
127-128	Q39E	Q38N_T85K	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
233-131	Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A
239-243	Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K_W103F	Q38N_T85E_F98L
239-240	Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K_W103H	Q38N_T85E_F98L
301-302	Q39E	Q38N_T85R	Q39R	Q38E_T85E
22-44	Q39E	Q38R	Q39R	Q38D
99-76	Q39E	Q38R	Q39R	Q38D_F98W
52-51, 51-52	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E
43-84	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E_F98W
141-142	Q39E	Q38R	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W
168-163	Q39E	Q38R	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W
99-77	Q39E	Q38R	V37I_Q39R	Q38D_F98W
43-17	Q39E	Q38R	V37I_Q39R	Q38E_F98W
190-191	Q39E	Q38R	V37W	F98A
206-136	Q39E	Q38R	V37W_Q39R	Q38D_F98A
37-36	Q39E	Q38R	V37W_Q39R	Q38E_F98A
273-274	Q39E	Q38R_F98W	Q39R_F100W_W103F	Q38E_F98M
210-138	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38D_F98A
105-42	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38E_F98A
200-147	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L
126-97	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L
200-146	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L
126-132	Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L
382*-381*, 381*-382*	Q39E	Q38R_L135W	Q39R_A139W	Q38E_F116A
371*-370*, 370*-371*	Q39E_A139G_V190A	Q38R_L135W	Q39R_A139W	Q38E_F116A_L135V
386*-387*, 387*-386*	Q39E_L124W	Q38R_V133A	Q39R_L124A	Q38E_V133F
327*-328*, 328*-	Q39E_S186R	Q38R_Q124E_Q160E_T180E	Q39R_K145L_Q179E	Q38E_S131K

30 20 10

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
327*				
333*-334*, 334*-333*	Q39E_S186R	Q38R_Q160E_T180E	Q39R_K145T_Q179E	Q38E_S131K
170-171	Q39K	Q38N_T85E	V37A_Q39E_W103H	Q38N_P44W_T85K
170-172	Q39K	Q38N_T85E	V37A_Q39E_W103V	Q38N_P44W_T85K
86-88	Q39K	Q38N_T85E	V37I_Q39E	Q38N_T85K
119-120	Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A
226-228	Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38N_T85K_F98L
226-227	Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38N_T85K_F98L
55-56, 56-55	Q39M	Q38M	Q39R	Q38E
22-151	Q39R	Q38D	V37I_Q39R	Q38R
45-28	Q39R	Q38D	V37W_Q39D	Q38R_F98A
27-28	Q39R	Q38D	V37W_Q39E	Q38R_F98A
89-98	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
115-122	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L
115-217	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L
89-90	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
115-116	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L
115-218	Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L
123-124	Q39R	Q38D_F98W	V37W_W103F	F98L
123-219	Q39R	Q38D_F98W	V37W_W103H	F98L
307*-305*, 305*-307*	Q39R	Q38E	V37W	F98A
39-40	Q39R	Q38E	V37W_Q39D	Q38R_F98A
39-34, 34-39	Q39R	Q38E	V37W_Q39E	Q38R_F98A
53-54, 54-53	Q39R	Q38E	WT	WT
93-38	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
118-91	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L
118-143	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
93-26, 26-93	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
118-74	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L
118-144	Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L
121-95	Q39R	Q38E_F98W	V37W_W103F	F98L
121-175	Q39R	Q38E_F98W	V37W_W103H	F98L
342*-341*, 341*-342*	S186R	F98W_Q160E_T180E	V37W_K145T_Q179E	F98A_S131K
	S188I	WT	WT	S176V_T178L
198-199	V37A_Q39E_W103H	Q38N_P44W_T85K	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A
220-199	V37A_Q39E_W103V	Q38N_P44W_T85K	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A
213-214	V37A_Q39K_W103H	Q38N_P44W_T85E	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A
173-174	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W	V37W	F98A
148-149	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
148-150	V37A_Q39R_W103V	Q38D_P44W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
158-159	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	V37W	F98A
152-153	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
152-154, 154-152	V37A_Q39R_W103V	Q38E_P44W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98L
	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98W
	V37A_W103H	P44W	V37I_F100W	F98L
242-244	V37A_W103H	P44W	V37T_A93Q_W103T	F98L
250-256	V37A_W103H	P44W	V37T_A93Q_W103T	Y87G
	V37A_W103H	P44W	V37W	F98A
241-242	V37A_W103H	P44W	V37W_W103H	F98L
177-157	V37A_W103H	P44W_F98W	V37W	F98A
221-222	V37A_W103H_A139G_V190A	P44W_L135W	V37W_A139W	F98A_F116A_L135A
	V37A_W103V	P44W	V37W	F98A
189-157	V37A_W103V	P44W_F98W	V37W	F98A

30 20 10

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
101-102	V37E	L89R_F98T	WT	WT
229-230	V37E	L89R_F98V	V37S_A93K	F98Y
109-110	V37E	L89R_F98V	WT	WT
182-183, 182-317*	V37E_F100D	L89R_F98W	V37S_A93K	F98Y
47-48, 48-47, 319*-310*, 309*-310*	V37E_F100D	L89R_F98W	WT	WT
359*-362*, 362*-359*	V37F	F98L	W103F	P44F
356*-357*, 357*-356*	V37F	F98L	W103F	P44W
359*-360*, 360*-359*	V37F	F98L	W103V	P44F
356*-365*	V37F	F98L	W103V	P44W
352*-186, 186-352*	V37F	F98L	WT	F98W
363*-186, 186-363*	V37F_W103F	F98L	WT	F98W
	V37I	F98W	V37W	F98A
	V37I	F98W	V37W_W103F	F98L
187-188	V37I	F98W	V37W_W103H	F98L
	V37I	WT	V37W	F98A
155-36	V37I_Q39D	Q38R	V37W_Q39R	Q38E_F98A
185-138	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38D_F98A
50-42	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38E_F98A
106-97	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L
106-132	V37I_Q39D	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L
129-128	V37I_Q39E	Q38N_T85K	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A
130-131	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K	Q38N_T85E_F98A
251-243	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K_W103F	Q38N_T85E_F98L
251-240	V37I_Q39E	Q38N_T85K_F98W	V37W_Q39K_W103H	Q38N_T85E_F98L

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
134-36	V37I_Q39E	Q38R	V37W_Q39R	Q38E_F98A
181-138	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38D_F98A
49-42	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R	Q38E_F98A
160-147	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38D_F98L
100-97	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103F	Q38E_F98L
160-146	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38D_F98L
100-132	V37I_Q39E	Q38R_F98W	V37W_Q39R_W103H	Q38E_F98L
253-120	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E	Q38N_T85K_F98A
252-228	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38N_T85K_F98L
252-227	V37I_Q39K	Q38N_T85E_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38N_T85K_F98L
92-98	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
117-122	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L
117-217	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L
92-90, 90-92	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
117-116	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L
117-218	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L
125-124	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_W103F	F98L
125-219	V37I_Q39R	Q38D_F98W	V37W_W103H	F98L
33-40	V37I_Q39R	Q38E	V37W_Q39D	Q38R_F98A
33-34	V37I_Q39R	Q38E	V37W_Q39E	Q38R_F98A
25-38	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D	Q38R_F98A
73-91	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D_W103F	Q38R_F98L
73-143	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39D_W103H	Q38R_F98L
25-26	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E	Q38R_F98A
73-74, 74-73	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E_W103F	Q38R_F98L
73-144	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_Q39E_W103H	Q38R_F98L
94-95	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_W103F	F98L
94-175	V37I_Q39R	Q38E_F98W	V37W_W103H	F98L

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
166-157	V37I_W103H	P44W_F98W	V37W	F98A
156-157	V37T_A93Q_W103L	P44W_F98W	V37W	F98A
169-157	V37T_A93Q_W103T	P44W_F98W	V37W	F98A
223-179	V37T_A93Q_W103T	P44W_L89W_F98A	V37W_F100W	F98A
167-157	V37T_A93Q_W103V	P44W_F98W	V37W	F98A
204-179	V37T_A93Q_W103V	P44W_L89W_F98A	V37W_F100W	F98A
300-349*, 349*-300	V37W	F98A	W103F	P44F
313*-361*, 361*-313*	V37W	F98A	W103F	P44W
157-176	V37W	F98A	W103H	P44W_F98W
300-343*, 343*-300	V37W	F98A	W103V	P44F
313*-339*, 339*-313*	V37W	F98A	W103V	P44W
157-178	V37W	F98A	W103V	P44W_F98W
325*-31, 31-325*	V37W	F98A	WT	F98W
46-30	V37W	F98A	WT	L89F_F98W
351*-312*, 312*-351*	V37W	F98A	WT	WT
31-32	V37W_A93V	F98A	WT	F98W
29-30	V37W_A93V	F98A	WT	L89F_F98W
179-245	V37W_F100W	F98A	W103H	P44W_L89W_F98A
179-180, 323*-324*	V37W_F100W	F98A	W103V	P44W_L89W_F98A
247-248	V37W_F100W_W103L	L89W_F98A	V37W_F100W	F98A
347*-348*, 348*-347*	V37W_K145T_Q179E	F98A_S131K	WT	F98W
338*-349*, 349*-338*	V37W_W103F	F98A	W103F	P44F
340*-361*, 361*-340*	V37W_W103F	F98A	W103F	P44W

【０３３７】
（表３１）

固有の識別名セット	H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
338*-343*, 343*-		F98A	W103V	P44F
338*	V37W_W103F			
340*-339*, 339*-		F98A	W103V	P44W
340*	V37W_W103F			
350*-31, 31-350*	V37W_W103F	F98A	WT	F98W
	V37W_W103F	F98L	WT	F98W
186-187	V37W_W103H	F98L	WT	F98W

【０３３８】

H1_突然変異	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異
A139W	F116A	WT	L135W
H172T	S174R	H172R	WT
K145T_Q179E および/または L143E_K145T および/または K145T_S186E	S131K および/または T178R および/または Q124R	S186R および/または Q179K および/または L143K	T178E および/または Q124E および/または T180E または Q160E および/または V133E
F174V_P175S_S188G	S176L	S188L	V133S
S188G	S176L	S188L	S176A
L124A	V133F	L124W	V133A
L124E	V133G_S176R	L124R	V133A_S176D
V37W	F98A	WT	WT
F100W	F98L	WT	WT
Q39E	Q38R	Q39R	Q38E
Q39E	Q38N_T85K	Q39K	Q38N_T85E
Q39M	Q38M	Q39R	Q38E
F100W	F98M	W103F	Y36W
V37E	L89R_F98T	WT	WT
L45A	P44F	WT	WT
W103V	P44W	V37W	F98A

表１４～２７および３０～３１における要所

表１４．Ｆａｂ対形式におけるＤ３Ｈ４４系についてのＬＣＣＡデータ

表１５．Ｆａｂ対形式におけるＤ３Ｈ４４系についてのさらなるＬＣＣＡデータ

表１６．選択された純度および混合系についてのＬＣＣＡデータ

表１７．Ｆａｂ対形式における選択された純度および混合系についてのＬＣＣＡデータ

表１８．選択された純度および混合系についてのＷＴ　ＬＣＣＡ__データ

表１９．表１７のデータ要約

表２０．表１８のデータ要約

表２１．Ｄ３Ｈ４４系についてのＭａｂアッセイデータ

表２２．ｐＨ４での選択された系についてのＳＭＣＡデータ

表２３．ＳＭＣＡ実験についてのＤＮＡの量の設定

表２４．ｐＨ７での選択された系についてのＳＭＣＡデータ

表２５．選択されたＳＭＣＡ設計についての熱安定性および抗原結合データ

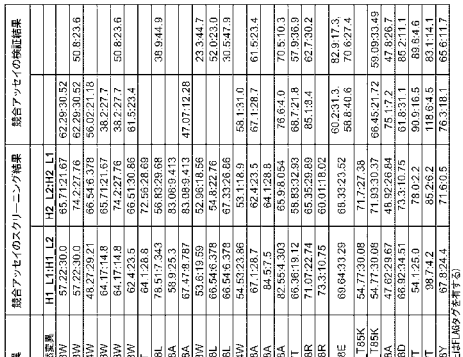
表２６．選択されたＷＴ（相対する軽鎖タグ）についてのＳＭＣＡデータ

表２７．ＬＣＣＡ（Ｄ３Ｈ４４）および少なくとも１つの試験されたＳＭＣＡ系の両方における成功した設計

表３０．設計ライブラリー

表３１．コア設計

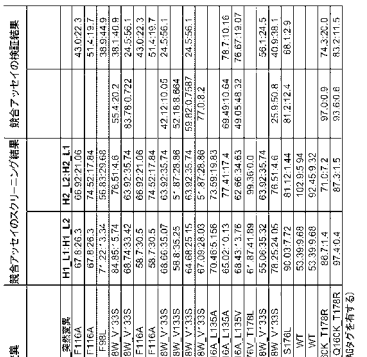
【図１】



		野生型からの突然変異			野生型からの突然変異		結合アッセイのスクリーニング結果		結合アッセイの検証結果
		可変ドメイン(VH:VL)							
セット番号	セット番号	H1 突然変異	L1 突然変異	H2 突然変異	L2 突然変異	H1_L1:H1_L2	H2_L2:H2_L1		
V001	V001	V37W_W103H**	F98L	V37I	F98W	57.22:30.0	65.77:21.67	62.28:30.52	
V001	V003	V37W_W103H	F98L	WT	F98W	57.22:30.0	74.2:27.76	62.28:30.52	50.8:23.6
V004	V005	V37W_W103H	F98L	V37A_W103H	P44W	46.27:29.21	66.54:6.378	56.02:21.18	
V006	V002	V37W_W103F	F98L	V37I	F98W	64.17:14.8	65.7:12.67	38.2:27.7	
V006	V003	V37W_W103F	F98L	WT	F98W	64.17:14.8	74.2:27.76	38.2:27.7	50.8:23.6
V007	V008	V37W	F98A	V37I	F98W	64.4:28.3	72.5:30.86	61.5:23.4	
V007	V010	V37I	WT	F100W	F98L	78.5:17.943	56.82:26.68		38.9:44.9
V013	V037	P44W	V37W	F98A	F98L	58.9:25.3	83.06:9.413		
V014	V034	V37A_W103H	P44W	V37W	F98A	67.4:28.787	83.09:9.413	47.07:12.28	
V017	V035	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98W	53.6:19.59	52.06:18.56		23.3:44.7
V018	V036	V37A_W103H	P44W	V37A_W103V	F98L	66.54:6.378	54.8:22.76		52.0:23.0
V019	V037	V37A_W103H	P44W	V37I_F100W	F98L	66.54:6.378	67.33:26.86		30.5:47.9
V021	V038	L45W	Y87G	V37A_W103H	P44W	54.53:23.86	53.1:18.9	58.1:31.0	
V022	V007	WT	F98W	V37W	F98A	67.1:28.7	62.4:23.5	67.1:28.7	61.5:23.4
V023	V009	WT	WT	V37W	F98A	84.5:7.5	84.1:28.8		
V024	V025	Q39R	Q38E	V37W	F98A	82.55:4.303	65.9:8.054	76.6:4.0	70.5:10.3
V026	V027	Q39R	Q38E	WT	F98A	66.36:19.12	58.83:32.83	66.7:21.8	57.9:36.9
V028	V029	Q39R	Q38E	Q39E	Q38R	71.07:22.74	65.35:28.89	85.1:8.4	62.7:30.2
V030	V031	Q39R	Q38D	Q39E	Q38R	73.3:10.75	60.01:18.02		
V032	V033	Q39M	Q38M	Q39E	Q38E	69.64:33.29	66.33:23.52	60.2:31.3	82.9:17.3
								58.8:40.6	70.6:27.4
V034	V035	Q39K	Q38N_T85E	Q39D	Q38N_T85K	54.77:30.08	71.7:27.38		
V034	V036	Q39K	Q38N_T85E	Q39E	Q38N_T85K	54.77:30.08	71.93:30.37	66.45:21.72	59.09:33.49
V037	V038	Q39E	Q38R	V37W	F98A	47.62:23.67	48.92:28.64	75.1:7.2	47.8:26.7
V039	V030	Q39D	Q38R	Q39R	Q38D	66.92:34.51	73.3:10.75	61.8:31.1	85.2:11.1
V040	V041	V37E	L89R_F98T	WT	WT	54.1:25.0	78.0:2.2	90.9:16.5	89.8:4.6
V043	V043	V37E_F100D	L89R_F98W	WT	WT	98.7:4.2	85.2:6.2	118.6:4.5	83.1:14.1
V045	V045	V37E_F100D	L89R_F98W	V37S_A97K	F98Y	67.8:24.4	71.6:0.5	76.3:18.1	65.6:11.7

*Kabat番号付け　##WT：野生型 D3H44 HC（定常領域2-Hisタグを有するが非ペア野生型 D3H44 LC（軽鎖領域またはFLAGタグを有する）

【図２】



		野生型からの突然変異			野生型からの突然変異		結合アッセイのスクリーニング結果		結合アッセイの検証結果
		定常ドメイン(CH1:CL)							
同時発現セット									
セット番号	セット番号	H1_突然変異*	L1_突然変異	H2_突然変異	L2_突然変異	H1_L1:H1_L2	H2_L2:H2_L1		
C500	C501	WT	WT	A139W	F116A	67.8:26.3	66.32:21.06		43.0:22.3
C500	C502	WT	WT	A139W_V190A	F116A	67.8:26.3	74.3:27.84		54.1:19.7
C504	C505	WT	WT	A139W	F98L	77.22:15.34	56.83:25.68		38.9:44.9
C505	C506	A139W_V190S	F116S	A139W	F116W_V133S	84.85:5.774	76.51:4.6	55.4:20.2	38.1:40.9
C507	C508	A139W_V190S	F116A	A139W	F116W_V133S	68.74:33.42	63.92:35.74	83.78:0.722	24.5:56.1
C509	C501	A139W	WT	A139W_V190S	F116A	68.7:30.5	66.92:21.06		43.0:22.3
C509	C502	A139W	WT	A139W_V190A	F116A	68.7:30.5	74.52:17.84		51.4:19.7
C510	C508	A139W_V190S	F116A	A139W	F116W_V133S	68.66:35.07	63.92:35.74	42.12:10.05	24.5:56.1
C511	C512	A139W_V190S	WT	A139W	F116W_V133S	58.8:35.25	5.87:28.98	52.16:8.8624	
C513	C505	A139W_V190S	F116A	A139W	F116W_V133S	68.66:35.07	63.92:35.74	58.82:13.97	24.5:56.1
C514	C506	A139W_V190S	WT	A139W	F116W_V133S	68.66:35.07	63.92:35.74	58.82:13.97	
C515	C516	A139G_V190A	L135W_N137A	A139W	F116A_L135A	70.46:5.196	73.98:19.83	77.2:3.2	
C517	C518	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135A	65.02:-0.13	77.4:17.4	69.49:10.64	78.7:10.16
C519	C520	A139G_V190A	L135W	A139W	F116A_L135V	68.43:-3.76	62.66:34.63	49.05:48.32	76.67:19.07
C521	C527	S168R	WT	WT	S176V_T178L	6*:87.41.69	99.36:0.0		
C523	C508	V190G	F116A	A139W	F116W_V133S	55.06:35.32	63.92:35.74		56.1:24.5
C524	C506	V190G	F116S	A139W	F116W_V133S	78.25:24.05	76.51:4.6	25.9:50.8	40.9:38.1
C525	C526	S168L_K145Y	V133S	F174V_P175S_S176G	S176L	36.03:7.72	81.12:1.44	81.4:2.4	68.1:2.9
C527	C528	F174V_P175S_S176G	S176L	F174V_P175S_S176G	WT	81.12:1.44	92.45:9.32		
C529	C530	F174V_P175S_S176G	S176L	WT	WT	92.45:9.32	53.35:9.68		
C531	C532	D144G_Q179R	Q124E_Q179E_T178D	K145T_Q179D_S188L	Q18DK_T178R	88.7:1.4	71.0:7.2	97.0:0.9	74.3:26.0
C532	C533	L143A_D144G_Q179R	Q124E_V133W_Q160E_T183E	K145T_Q179D_S188F	V133A_Q18DK_T178R	97.4:0.4	87.3:1.5	93.6:0.8	83.2:11.5

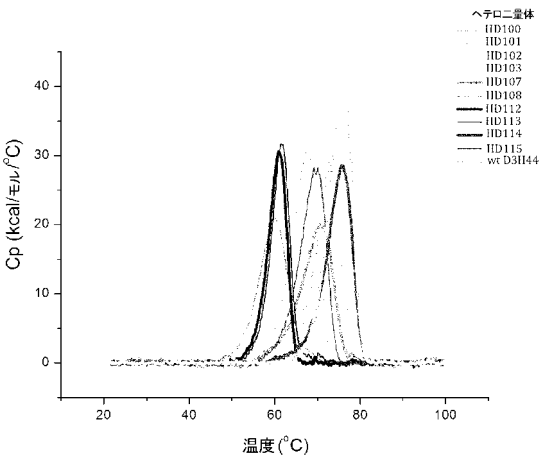
*Kabat番号付け　##WT：野生型 D3H44 HC（定常領域2-Hisタグを有するが非ペア野生型 D3H44 LC（軽鎖領域またはFLAGタグを有する）

【図３】

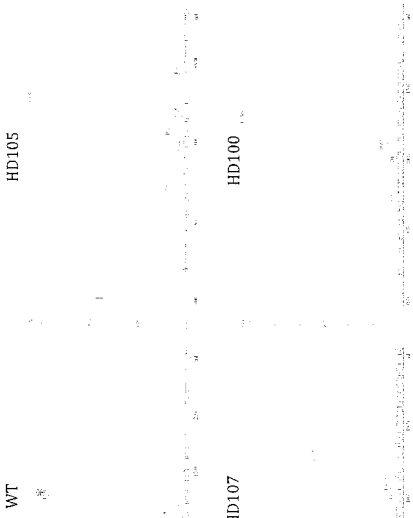
	野生型からの突然変異		対応する同時発現セット番号				
ヘテロ二量体	H1_突然変異	L1_突然変異	対合	誤対合	Tm (°C)	抗原親和性 (M)*
WT[#] (940)	-	-	-	-	76.0	3.30×10^{-11}
HD100	Q39E	Q38R	V029, V031, V037		72.9	1.26×10^{-10}
HD101	Q39E	Q38E		V029	67.4	2.32×10^{-11}
HD102	Q39R	Q38E	V028, V033, V026, V024		72.8	5.53×10^{-11}
HD103	Q39R	Q38R		V028, V030	66.5	6.53×10^{-11}
HD104	V37A_W103H	P44W	V015, V005, V016		56.2	7.70×10^{-10}
HD105	V37W	F98A	V009, V007, V014, V038, V025		76.9	9.77×10^{-10}
HD106	V37W	P44W		V014	64.5	8.31×10^{-09}
HD107	A139G_V190A	L135W_N137A	C515		70.7	3.81×10^{-11}
HD108	A139G_V190A	F116A_L135A		C517, C515	60.1	6.45×10^{-11}
HD109	A139W	F116A_L135A	C516, C518		72.5	5.06×10^{-11}
HD110	S188H	S176G_T178V			74.3	4.03×10^{-11}
HD111	S188H	S176L_T178S			75.2	7.68×10^{-09}
HD112	V37W_W103H	F98L	V001, V004		60.9	5.17×10^{-09}
HD113	V37W_W103H	F98W		V001	61.5	3.24×10^{-09}
HD114	V37I	F98W	V002, V008		75.8	3.93×10^{-11}
HD115	V37I	F98L		V002, V011	70.0	2.42×10^{-10}

[#] タグ付けされた野生型D3H44 Fab。HDタグは末端Hexa-His_6タグである。LDタグは、N末端ATまたはFLAGタグである。
*使用された抗原：組換え因子細胞外ドメイン

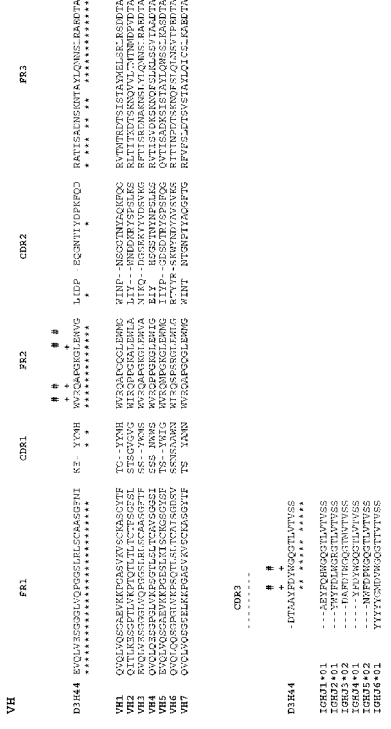
【図４】



【図５】



【図６Ａ】



【図６Ｄ】

CH1

```
                    #           #                    #
                    +           + + + ++             + ++   +     + + + +
D3H44     ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKKV
          **************************************************************************************************
IGHG1*01  ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICKVNHKPSNTKVDKKV
IGHG1*03  :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::R:
IGHG3*06  :::::::::::::C:R:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::T:::::::::::::R:
IGHG3*18  :::::::::::::C:R:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::T:::::::::::::R:
IGHG3*17  :::::::::::::C:R:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::NF:::::T:::::::::::::R:
IGHG2*04  :::::::::::::C:R:::ES:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::T:::D:::::::::T:
IGHG4*01  :::::::::::::C:R:::ES:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::KT:::D:::::::::R:
IGHG2*03  :::::::::::::C:R:::ES:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::NF:::::T:::D:::::::::T:
IGHG2*02  :::::::::::::C:R:::ES:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::T:NF:::::T:::D:::::::::T:
```

：IGHG1*01のものと同一の残基

【図６Ｅ】

CL（κ）

```
                # #             # #
                + +     +     + + + +                 +                 + + + +
D3H44     RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
          **************************************************************************************************
IGKC*01   RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IGKC*04   :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::L:::::::::::::::::::::::
IGKC*05   :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::N:::::::::::::::::::::::
IGKC*02   :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::E:::::::::::::::G:::::::::::::::::::::::
IGKC*03   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::R:::::::::::::::::::E:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
```

：IGKC*01のものと同一の残基

CL（λ）

```
                # #             # #
                + +     +     + + + +                 +             + + + +
D3H44     RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
            * * *  **** * *    *  ***   ***    * ** *           *    *  ** * *       *  * * *** *  * * *    **
IGλC1     -PKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQS-NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG--STVEKTVAPTECS
IGλC7     Q:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::--:::::::::::
IGλC2     Q:::A:S:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::S:::::::::::T:::::--:::::::::::::::::::::::::::::::--:::::::::::
IGλC3     ::::A:S:::::::::::::::::::::::::::::::::::::::S:::::::::::T:::::--:::::::::::::::::::::K:::::::::--:::::::::::
IGλC6     Q:::A:S:::::::::::::::::::::::::::::::::K:::::::::NT:::::T:::::--:::::::::::::::::::::::::::::::--:::::::A::::
```

：IGλC1のものと同一の残基

【図６Ｂ】

VL（κ）

```
                FR1                      CDR1              FR2          CDR2          FR3                                CDR3
          ------------------------  ----------------  -------------  -------  --------------------------------  -------
                                                        # #     #                                                 #
                                                        + +     +                                 + +             +
D3H44     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC  RASRDIKS------YLN  WYQQKPGKAPKVLIY  YATSLAE  GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC  LQHGESP
          ************************ ***  * *      ***  ************ ***  * **  ********************************  *    *

VKI       DIQKTQSPSSLSASVGDRVTITC  RASQSISS------YLN  WYQQKPGKAPKLLIY  AASSLQS  GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  QQSYSTP
VKII      DIVKTQTPLSLPVTPGEPASISC  RSSQSLLDSDDGNTYLD  WYLQKPGQSPQLLIY  TLSYRAS  GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC  MQRIEFP
VKIII     EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC  RASQSVSSS------YLA  WYQQKPGQAPRLLIY  GASSRAT  GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC  QQYGSSP
VKIV      DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC  KSSQSVLYSSNNKNYLA  WYQQKPGQPPKLLIY  WASTRES  GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC  QQYYSTP
VKV       ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISC  KASQDIDD------DDN  WYQQTPGEAATIIIQ  EATTLVP  GIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESDDAAYYFC  LQHDNFP
VKVI      EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC  RASQSIGS------SLH  WYQQKPDQSPKLLIK  YASQSFS  GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC  HQSSSLP
```

```
                CDR3
                --
                  #
                  +   +
D3H44     WTFGQGTKVEIK
          ************

IGKJ1*01  WTFGQGTKVEIK
IGKJ2*01  YTFGQGTKLEIK
IGKJ3*01  FTFGPGTKVDIK
IGKJ4*01  LTFGGGTKVEIK
IGKJ5*01  ITFGQGTRLEIK
```

【図６Ｃ】

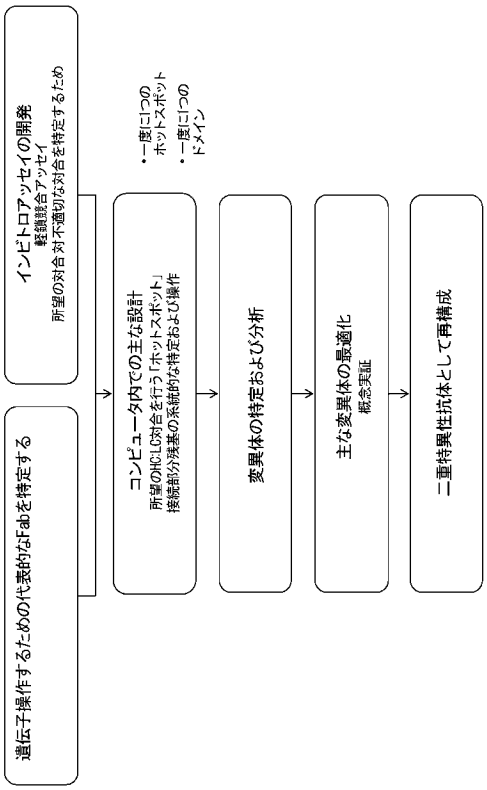
VL（λ）

```
                FR1                 CDR1              FR2          CDR2          FR3                                CDR3
                                                    # #     #                                                 #
                                                    + +     +                                 + +             +
D3H44     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC  R-AS-RDIKS-YLN  WYQQKPGKAPKVLIY  YATS-----LAE  GVPSRFSGSG--SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC  LQHGESP----
            ** **  *    **** *      *     *  *    **** ****** ***  *     *        **  *****  ***   * ** ** ** * ***        *
VLI       QSVLTQPPS-VSEAPRQRVTISC  SGSS-SNIGNNAVN  WYQQLPGKAPKLLIY  YDD------LND  GVSDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSEDEADYYC  AAWDDSLN---
VLII      QSALTQPRS-ASGSPGQSVTISC  TGTS-SDVGGYNYVS  WYQQHPGKAPKLMIY  EVSK-----RPS  GVPDRFSGSK--SGNTASLTVSGLQAEDEADYYC  SSYAGSNNF--
VLIII     JVELTQPPS-VSVAPGQTARITC  SGDK---LGDKYAC  WYQQKPGQSPVLVIY  QDSK-----RPS  GIPERFSGSN--SGNTATLTISGTQAMDEADYYC  QAWDSDTA---
VLIV      LPVLTQPPS-ASALLGASVKLTC  TLSS--EHSTYTIE  WYQQRPGRSPQYIVK  VKSDGSF-SKGD  GIPDRFVGSS--SGADRYLTFSNLQSEDEAEYFC  GESETT-QGVW
VLV       QPVLTQPPS-ASGSPGESVRLTC  TLRSGINVGTYRI  WYQQKPGSPPQYLLY  YKSDSDK-QQGS  GVPSRFSGSK-DASANTGILLISGLQSEDEADYYC  MIWHSNAG---
VLVI      YELTQPPS-VSVSPGQTASITC  SGDK--LGDKYAC  WYQQKPGQSPVLVIY  QDTKRPS  GIPERFSGSN-SGNTATLTISGTQAMDEADFYC  QAWDSSTV---
VLVII     QPVMTQPSP-LSVTPGQPVSISC  RSSQSLVHSDGNTYLE  WYQQKPGQSPQLLIY  KVSN-----RDS  GVPDRFSGSG-SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC  MQGTHWPPT---
VLVIII    QPVLTQPTS-LSASPGASARFTC  TLRSGINVGSYRI  YWYQQKPGSLPRYLLS  YKSDSDK-QQGS  GVSSRQSGSK-DASANAGILLISGLQSEDEADYYC  MIWHSSAS---
VLIX      QPVLTQPPS-ASAMLGASVKLTC  TLSS--GYSNYKVD  WYQQRQGKGPRFVMR  VGTGGIVGSKGD  GIPDRFSVLG--SGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC  GADHGSGSNFI
VLX       QAGLTQPPS-VSKGLRQTATLTC  TGNS-NNVGNQGAA  WLQQHQGHPPKLLSY  RNNN-----RPS  GISERLSATR--SGNTASLTITGLQPEDEADYYC  SAWDSRLSA--
```

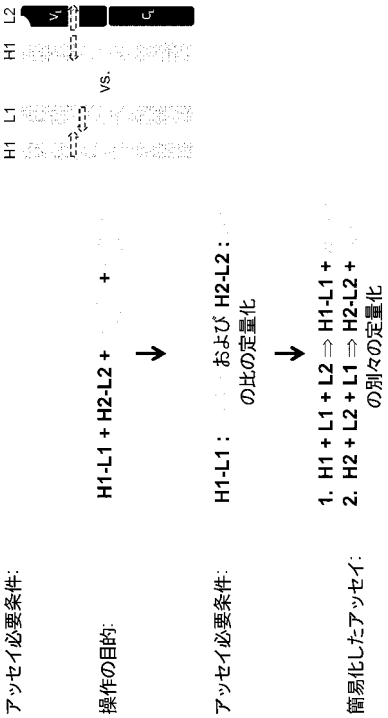
```
                CDR3
                --
                  #
                  +   +
D3H44     WTFGQGTKVEIK
          ** ****

IGLJ1*01  YVFGTGTKVTVL
IGLJ2*01  VVFGGGTKLTVL
IGLJ3*01  VVFGGGTKLTVL
IGLJ4*01  FVFGKGTQLTIL
IGLJ5*01  NVFGRGTRLTVL
IGLJ6*01  NVFGSGTKVTVL
IGLJ7*01  AVFGGGTQLTVL
```

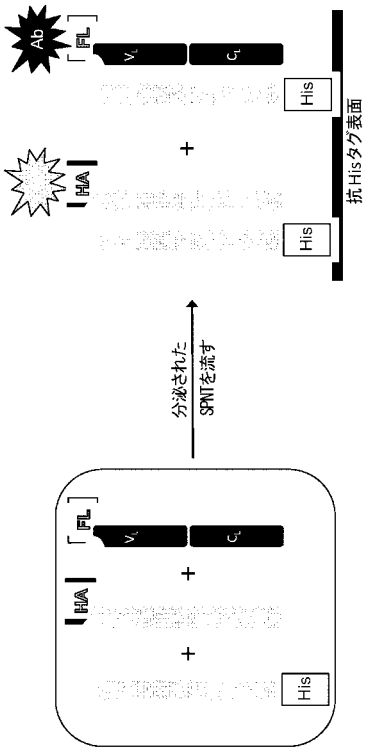
【図７】


インビトロアッセイの開発
軽鎖競合アッセイ
所望の対合対不適切な対合を特定するため
遺伝子操作するための代表的なFabを特定する
コンピュータ内での主な設計
所望のHC:LC対合を行う「ホットスポット」
接続部分残基の系統的な特定および操作
•一度につのホットスポット
•一度につのドメイン
変異体の特定および分析
主な変異体の最適化
概念実証
二重特異性抗体として再構成

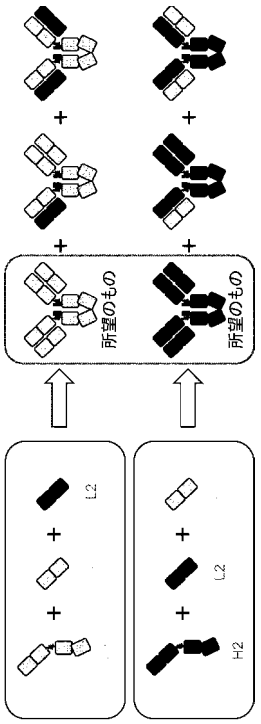
【図８】


H1
L1
vs.
H1
L2
アッセイ必要条件:
操作の目的:
H1-L1 + H2-L2 +
アッセイ必要条件:
H1-L1 : および H2-L2 :
の比の定量化
簡易化したアッセイ:
1. H1 + L1 + L2 ⇒ H1-L1 +
2. H2 + L2 + L1 ⇒ H2-L2 +
の別々の定量化

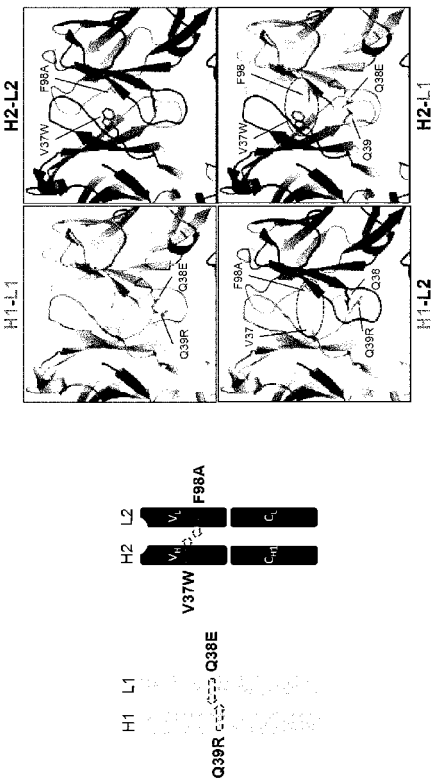
【図９】


Ab
HA
His
His
抗Hisタグ表面
分泌された
sFNITを流す
HA
His

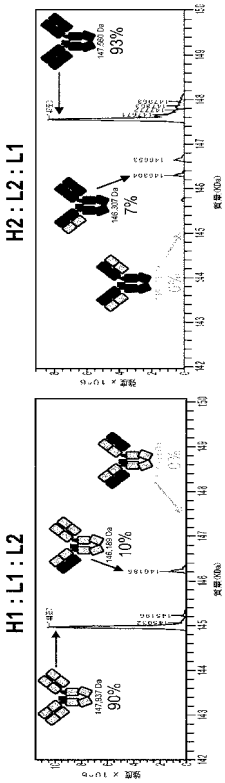
【図１０】


所望のもの
所望のもの
L2
L2
H2

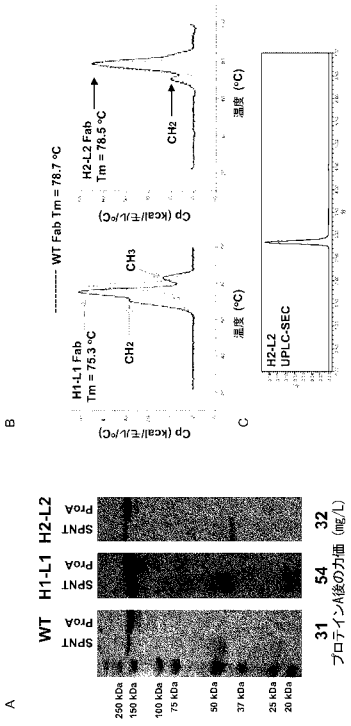
【図１１】



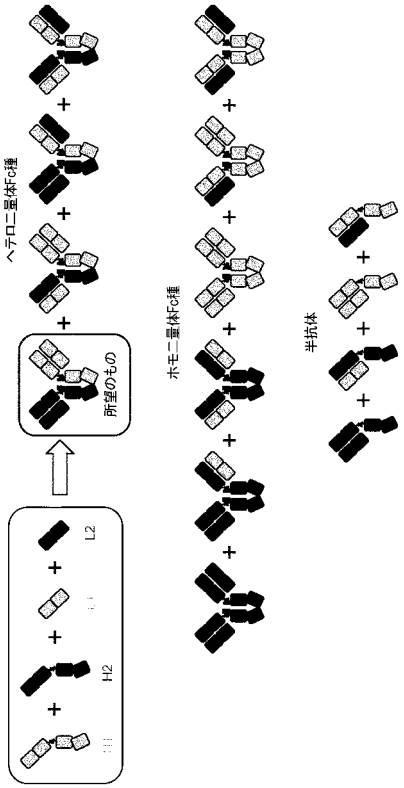
【図１２】



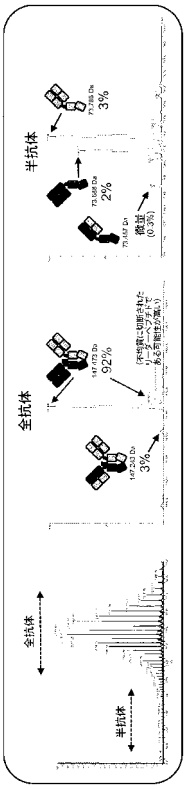
【図１３】



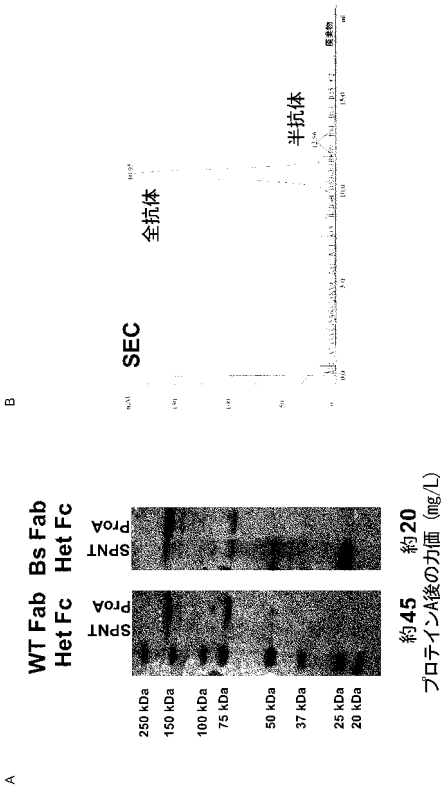
【図１４】



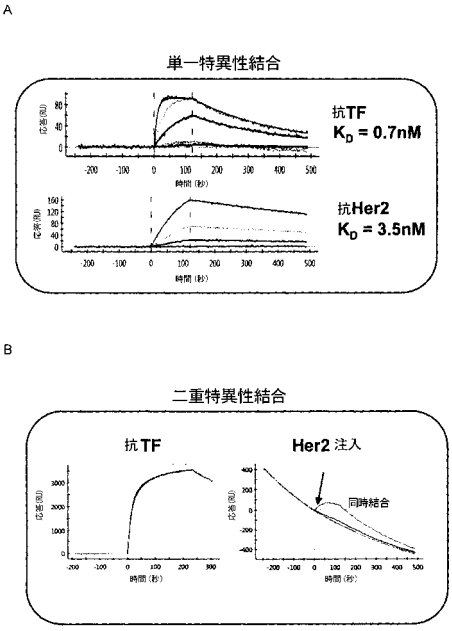
【図１５】



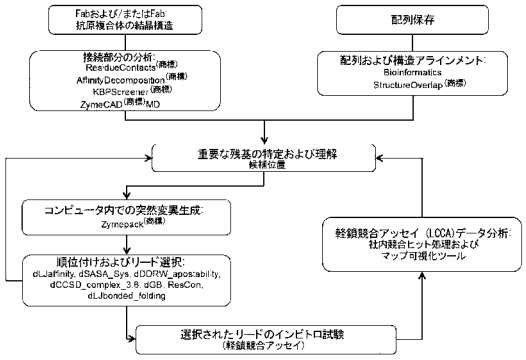
【図１６】



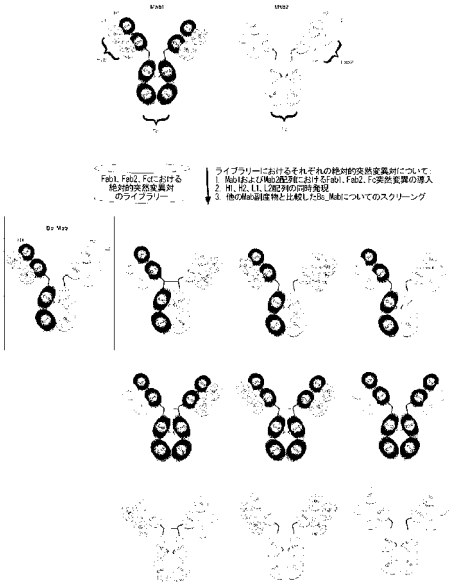
【図１７】



【図１８】



【図１９】



【配列表】
2016508117000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成27年7月30日(2015.7.30)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４３】
いくつかの態様において、本方法は、他のポリペプチド産物と比較して、発現産物における二重特異性構築物の量を決定する段階をさらに含む。いくつかの態様において、二重特異性構築物は、他のポリペプチド産物と比較して、７０％超の純度で生成される。いくつかの態様において、データセットは、本明細書に記載されるデータセットである。いくつかの態様において、本方法は、他のポリペプチド産物と比較して、二重特異性構築物の純度を増加させるために、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、またはＬ２のうちの少なくとも１つに、さらなるアミノ酸修飾を加える段階をさらに含む。いくつかの態様において、本構築物は、少なくとも２つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第１のヘテロ二量体および第２のヘテロ二量体と結合する。いくつかの態様において、Ｆｃは、任意で１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である。いくつかの態様において、抗原結合ポリペプチドは、抗体、Ｆａｂ、またはｓｃＦｖである。
[本発明1001]
単離された抗原結合ポリペプチド構築物であって、少なくとも第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体を含み、
第1のヘテロ二量体が、第1の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（H1）および第1の

免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ1）を含み、第2のヘテロ二量体が、第2の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ2）および第2の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ2）を含み、該第1のヘテロ二量体のＨ1またはＬ1配列のうちの少なくとも1つが、該第2のヘテロ二量体の対応するＨ2またはＬ2配列とは異なり、

Ｈ1およびＨ2がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、

Ｌ1およびＬ2がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、

Ｈ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2のうちの少なくとも1つが、少なくとも1つの定常ドメインおよび／または少なくとも1つの可変ドメインについて少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ1が、Ｌ2と比較してＬ1と優先的に対合し、Ｈ2が、Ｌ1と比較してＬ2と優先的に対合する、構築物。

[本発明1002]

構築物がヘテロ二量体Ｆｃをさらに含み、該Ｆｃが少なくとも2つのC_{H3}配列を含み、該Ｆｃが、1つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体と結合し、二量体化されたC_{H3}配列が、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により測定される約68℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有し、構築物が二重特異性である、本発明1001の構築物。

[本発明1003]

Ｈ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2が細胞または哺乳動物細胞において同時発現されるときに、またはＨ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2が無細胞発現系において同時発現されるときに、またはＨ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2が同時生成されるときに、またはＨ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2がレドックス生成系により同時生成されるときに、Ｈ1がＬ2と比較してＬ1と優先的に対合し、Ｈ2がＬ1と比較してＬ2と優先的に対合する、本発明1001～1002のいずれかの構築物。

[本発明1004]

Ｈ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2のうちの少なくとも1つが、Ｈ1がＬ2と比較してＬ1と優先的に対合し、かつ／またはＨ2がＬ1と比較してＬ2と優先的に対合するように、V_Hおよび／またはV_Lドメインの少なくとも1つのアミノ酸修飾ならびにC_{H1}および／またはC_Lドメインの少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、本発明1001～1003のいずれかの構築物。

[本発明1005]

Ｈ1がC_{H1}ドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ1およびＬ2のうちの少なくとも1つが、C_Lドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、かつ／またはＨ1がV_Hドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む場合、Ｌ1およびＬ2のうちの少なくとも1つが、V_Lドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、本発明1001～1004のいずれかの構築物。

[本発明1006]

Ｈ1、Ｌ1、Ｈ2、および／またはＬ2が、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸突然変異を含む、本発明1001～1005のいずれかの構築物。

[本発明1007]

Ｈ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2のうちの少なくとも1つが、少なくとも1つの定常ドメインおよび／または少なくとも1つの可変ドメインについて少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸修飾を含む、本発明1001～1006のいずれかの構築物。

[本発明1008]

Ｌ1およびＬ2の両方が、Ｈ1およびＨ2のうちの少なくとも1つと同時発現されるときに、Ｈ1－Ｌ1およびＨ2－Ｌ2のヘテロ二量体対のうちの少なくとも1つの相対的な対合が、それぞれの対応するＨ1－Ｌ2またはＨ2－Ｌ1のヘテロ二量体対のものと比べ、50、51、52

、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99％超であり、修飾されたＨ1－Ｌ1またはＨ2－Ｌ2のヘテロ二量体対の相対的な対合が、少なくとも1つのアミノ酸修飾を伴わない対応するＨ1－Ｌ1またはＨ2－Ｌ2のヘテロ二量体対において観察されるそれぞれの相対的な対合よりも大きい、本発明1001～1007のいずれかの構築物。

[本発明1009]

第1および第2のヘテロ二量体のうちの少なくとも1つの、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性が、少なくとも1つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10℃以内であるか、または

少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む各ヘテロ二量体の、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）により測定される熱安定性が、少なくとも1つのアミノ酸修飾を伴わない対応するヘテロ二量体のＴｍの約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10℃以内である、本発明1001～1008のいずれかの構築物。

[本発明1010]

各ヘテロ二量体の、それが結合する抗原に対する親和性が、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）またはＦＡＣＳにより測定されるそれぞれの非修飾ヘテロ二量体の、同一の抗原に対する親和性の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、30、35、40、45、または50倍以内である、本発明1001～1009のいずれかの構築物。

[本発明1011]

Ｈ1がＬ2と比較してＬ1と対合するときに、Ｈ1およびＬ1のうちの少なくとも1つが、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む少なくとも1つのドメインを含むか、または

Ｈ2がＬ1と比較してＬ2と対合するときに、Ｈ2およびＬ2のうちの少なくとも1つが、アミノ酸のより大きな立体的相補性をもたらす少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む少なくとも1つのドメインを含むか、または

Ｈ1がＬ2と比較してＬ1と対合するときに、Ｈ1およびＬ1のうちの少なくとも1つが、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む少なくとも1つのドメインを含むか、または

Ｈ2がＬ1と比較してＬ2と対合するときに、Ｈ2およびＬ2のうちの少なくとも1つが、荷電アミノ酸の間でより大きな静電気的相補性をもたらす少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む少なくとも1つのドメインを含む、本発明1001～1010のいずれかの構築物。

[本発明1012]

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、表29、表30、または表31に示されるもののうちの1つ以上から選択される、本発明1001～1011のいずれかの構築物。

[本発明1013]

構築物が、少なくとも2つのC_{H3}配列を含むＦｃをさらに含み、該Ｆｃが、1つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体と結合する、本発明1001～1012のいずれかの構築物。

[本発明1014]

Ｆｃが、ヒトＦｃ、ヒトＩｇＧ1　Ｆｃ、ヒトＩｇＡ　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ、ヒトＩｇＤ　Ｆｃ、ヒトＩｇＥ　Ｆｃ、ヒトＩｇＭ　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ2　Ｆｃ、ヒトＩｇＧ3　Ｆｃ、またはヒトＩｇＧ4　Ｆｃである、本発明1013の構築物。

[本発明1015]

Ｆｃが、ヘテロ二量体Ｆｃである、本発明1013～1014のいずれかの構築物。

[本発明1016]

Ｆｃが、C_{H3}配列のうちの少なくとも1つにおいて1つ以上の修飾を含む、本発明1013～1015のいずれかの構築物。

[本発明1017]

二量体化されたC$_{H3}$配列が、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77．5、78、79、80、81、82、83、84、または85℃、またはそれより高い、ＤＳＣにより測定される融解温度（Ｔｍ）を有する、本発明1013～1016のいずれかの構築物。

[本発明1018]

Ｆｃが、生成されるときに約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99％を超える純度で形成されるヘテロ二量体であるか、あるいはＦｃが、発現されるときにまたは単一細胞により発現されるときに約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99％を超える純度で形成されるヘテロ二量体である、本発明1013～1017のいずれかの構築物。

[本発明1019]

Ｆｃが、

野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する、C$_{H3}$配列のうちの少なくとも1つにおける1つ以上の修飾

を含む、本発明1013～1018のいずれかの構築物。

[本発明1020]

Ｆｃが、少なくとも1つのC$_{H2}$配列をさらに含む、本発明1013～1019のいずれかの構築物。

[本発明1021]

ＦｃのC$_{H2}$配列（複数を含む）が、1つ以上の修飾を含む、本発明1020の構築物。

[本発明1022]

Ｆｃが、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する1つ以上の修飾を含む、本発明1013～1021のいずれかの構築物。

[本発明1023]

Ｆｃが1つ以上のリンカーによりヘテロ二量体と結合するか、またはＦｃが1つ以上のリンカーによりH1およびH2と結合する、本発明1013～1022のいずれかの構築物。

[本発明1024]

1つ以上のリンカーが1つ以上のポリペプチドリンカーである、本発明1023の構築物。

[本発明1025]

1つ以上のリンカーが1つ以上の抗体ヒンジ領域を含む、本発明1023の構築物。

[本発明1026]

1つ以上のリンカーが1つ以上のＩｇG1ヒンジ領域を含む、本発明1023の構築物。

[本発明1027]

1つ以上のリンカーが1つ以上の修飾を含む、本発明1023～1026のいずれかの構築物。

[本発明1028]

1つ以上の修飾が、Ｆｃガンマ受容体の選択的結合を促進する、本発明1027の構築物。

[本発明1029]

少なくとも1つのアミノ酸修飾が、少なくとも1つのアミノ酸突然変異であるか、または少なくとも1つのアミノ酸修飾が、少なくとも1つのアミノ酸置換である、本発明1001～1028のいずれかの構築物。

[本発明1030]

Ｈ1、Ｈ2、Ｌ1、およびＬ2の各々の配列が、ヒト配列に由来する、本発明1001～1029のいずれかの構築物。

[本発明1031]

多重特異性または二重特異性である、本発明1001～1030のいずれかの構築物。

[本発明1032]

多価または二価である、本発明1001～1031のいずれかの構築物。

[本発明1033]

本発明1001～1032のいずれかの構築物をコードする少なくとも1つの配列を含む、単離されたポリペプチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。

[本発明1034]
ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが、ｃＤＮＡである、本発明1033の単離されたポリヌクレオチド。
[本発明1035]
本発明1033または1034のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの1つ以上を含む、ベクターまたはベクターのセット。
[本発明1036]
プラスミド、マルチシストロンベクター、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、および組換え発現ベクターからなる群から選択される、本発明1035のベクターまたはベクターのセット。
[本発明1037]
本発明1033または1034のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または本発明1035または1036のベクターもしくはベクターのセットを含む、単離された細胞。
[本発明1038]
細胞が、ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはＨＥＫ293細胞である、本発明1037の単離された細胞。
[本発明1039]
本発明1001～1032のいずれかの構築物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。
[本発明1040]
緩衝液、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート剤、安定剤、および賦形剤からなる群から選択される1つ以上の物質をさらに含む、本発明1039の薬学的組成物。
[本発明1041]
対象における疾患または障害または癌または血管系疾患の治療のための、あるいは医薬の製造における、本発明1001～1032のいずれかの構築物または本発明1039もしくは1040のいずれかの薬学的組成物の使用。
[本発明1042]
疾患または障害または癌または血管系疾患に罹患している対象の治療方法であって、該対象に、本発明1001～1032のいずれかの構築物または本発明1039もしくは1040のいずれかの組成物を投与する段階を含む、方法。
[本発明1043]
細胞内または細胞へのシグナルを、阻害する、減少させる、または遮断する方法であって、該細胞を、本発明1001～1032のいずれかの構築物または本発明1039～1040のいずれかの組成物と接触させる段階を含む、方法。
[本発明1044]
本発明1001～1032のいずれかの構築物を宿主細胞培養物から得る方法であって、
（ａ）構築物をコードする1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つの宿主細胞を含む宿主細胞培養物を得る段階と、
（ｂ）該宿主細胞培養物から構築物を回収する段階と
を含む、方法。
[本発明1045]
本発明1001～1032のいずれかの構築物を得る方法であって、
（ａ）Ｈ1、Ｌ1、Ｈ2、およびＬ2を得る段階と、
（ｂ）Ｈ1を、Ｌ2と比較してＬ1と優先的に対合させ、Ｈ2を、Ｌ1と比較してＬ2と優先的に対合させる段階と、
（ｃ）構築物を得る段階と
を含む、方法。
[本発明1046]
本発明1001～1032のいずれかの構築物を調製する方法であって、

ａ．少なくとも1つの構築物をコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを得る段階と、
ｂ．少なくとも1つの宿主細胞への導入のために、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの各々の最適比を決定する段階であって、該最適比が、Ｈ1、Ｌ1、Ｈ2、およびＬ2の発現時に形成された誤対合されたＨ1－Ｌ2およびＨ2－Ｌ1のヘテロ二量体対と比較して、Ｈ1、Ｌ1、Ｈ2、およびＬ2の発現時に形成されたＨ1－Ｌ1およびＨ2－Ｌ2のヘテロ二量体対の量を評価することにより決定される、段階と、
ｃ．好ましい最適比を選択する段階であって、該好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも1つの宿主細胞へのトランスフェクションが構築物の発現をもたらす、段階と、
ｄ．最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを少なくとも1つの宿主細胞にトランスフェクトする段階と、
ｅ．構築物を発現させるために、該少なくとも1つの宿主細胞を培養する段階と
を含む、方法。
[本発明1047]
最適比を選択する段階が、一過性トランスフェクション系におけるトランスフェクションにより評価される、本発明1046の方法。
[本発明1048]
好ましい最適比のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットの、少なくとも1つの宿主細胞へのトランスフェクションが、構築物の最適な発現をもたらす、本発明1046～1047のいずれかの方法。
[本発明1049]
構築物が、少なくとも2つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、該Ｆｃが、1つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体と結合する、本発明1046～1048のいずれかの方法。
[本発明1050]
Ｆｃが、任意で1つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である、本発明1049の方法。
[本発明1051]
第1の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ1）および第1の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ1）を含む第1のヘテロ二量体ならびに第2の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ2）および第2の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ2）を含む第2のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットであって、Ｈ1およびＨ2がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ1およびＬ2がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異の該データセットが、表29、30、または31に列挙されるこれらの突然変異あるいはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、データセットと、
Ｈ1が、Ｌ2と比較してＬ1と優先的に対合するであろう可能性、および／またはＨ2が、Ｌ1と比較してＬ2と優先的に対合するであろう可能性を決定するためのコンピュータ実行コードと
を保存する、コンピュータ可読記憶媒体。
[本発明1052]
優先的対合を決定するためのコンピュータ実装方法であって、
第1の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ1）および第1の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ1）を含む第1のヘテロ二量体ならびに第2の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ2）および第2の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ2）を含む第2のヘテロ二量体における相補的突然変異を表すデータを含むデータセットを得る段階であって、Ｈ1およびＨ2がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、Ｌ1およびＬ2がそれぞれ、少なくとも、軽

鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、相補的突然変異の該データセットが、表29、30、または31に列挙されるこれらの突然変異あるいはこれらの突然変異のサブセットを表すデータを含む、段階と、

コンピュータプロセッサにより、H1が、L2と比較してL1と優先的に対合するであろう可能性、および／またはH2が、L1と比較してL2と優先的に対合するであろう可能性を決定する段階と

を含む、方法。

[本発明1053]

本発明1001～1032のいずれかの構築物を生成する段階をさらに含む、本発明1052の方法。

[本発明1054]

二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を生成する方法であって、該二重特異性構築物が、第1の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第1の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（H1）および第1の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（L1）を含む第1のヘテロ二量体ならびに第2の単一特異性抗原結合ポリペプチドからの第2の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（H2）および第2の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（L2）を含む第2のヘテロ二量体を含み、H1およびH2がそれぞれ、少なくとも、重鎖可変ドメイン（V_Hドメイン）および重鎖定常ドメイン（C_{H1}ドメイン）を含み、L1およびL2がそれぞれ、少なくとも、軽鎖可変ドメイン（V_Lドメイン）および軽鎖定常ドメイン（C_Lドメイン）を含み、

ａ．H1、H2、L1、および／またはL2への修飾のサブセットの導入時に、試験系において、H1が、L2と比較してL1と優先的に対合し、H2が、L1と比較してL2と優先的に対合するように、H1、H2、L1、およびL2内のアミノ酸修飾のセットを表すデータを含むデータセットを得る段階と、

ｂ．該データセットからの1つ以上の修飾のサブセットを第1のヘテロ二量体および／または第2のヘテロ二量体に導入する段階と、

ｃ．二重特異性構築物を含む発現産物を生成するために、少なくとも1つの宿主細胞において第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体を同時発現する段階と

を含む、方法。

[本発明1055]

他のポリペプチド産物と比較して、発現産物における二重特異性構築物の量を決定する段階をさらに含む、本発明1054の方法。

[本発明1056]

二重特異性構築物が、他のポリペプチド産物と比較して、70％超の純度で生成される、本発明1054～1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

データセットが、本発明1051のデータセットである、本発明1054～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

他のポリペプチド産物と比較して、二重特異性構築物の純度を増加させるために、H1、H2、L1、またはL2のうちの少なくとも1つに、さらなるアミノ酸修飾を加える段階をさらに含む、本発明1054～1057のいずれかの方法。

[本発明1059]

構築物が、少なくとも2つのC_{H3}配列を含むＦｃを含み、該Ｆｃが、1つ以上のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第1のヘテロ二量体および第2のヘテロ二量体と結合する、本発明1054～1058のいずれかの方法。

[本発明1060]

Ｆｃが、任意で1つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体である、本発明1059の方法。

[本発明1061]

抗原結合ポリペプチドが、抗体、Ｆａｂ、またはｓｃＦｖである、本発明1054～1060のいずれかの方法。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３３４】
（表２６）

H1-L1_Ab	H1_突然変異	L1_突然変異	L1_タグ	H2-L2_Ab	H2_突然変異	L2_突然変異	L2_タグ	H1:H2:L1:L2 DNA 比	pA後に行われたSECステップは?	実験の数
D3H44	WT	WT	HA	PERT	WT	WT	FLAG	22:8:53:17	有	2
D3H44	WT	WT	なし	PERT	WT	WT	FLAG	22:8:53:17	有	1
D3H44	WT	WT	FLAG	PERT	WT	WT	HA	22:8:53:17	有	1

H1-L1_Ab	対合種:誤対合種(すべて)	対合種:誤対合種(平均)	対合_/_誤対合のスカラー	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1)	H1-L1_H2-L2 (および H1-L2_H2-L1) サイドピーク	H1-L1_H1-L1	H1-L1_H1-L2
D3H44	3:97_2:98	2:98	-3.72	1.55		0	0
D3H44	18:82	18:82	-1.5	18.2		0	0
D3H44	1:99	1:99	-4.59	0		0	1.3

H1-L1_Ab	H1-L2_H1-L2	H2-L1_H2-L1	H2-L1_H2-L2	H2-L2_H2-L2	H1-L1_H2-L1	H1-L2_H2-L2	H1-L1	H1-L2	H2-L1	H2-L2
D3H44	0	0	0	0	0	96.9	0	0.7	0	0.9
D3H44	0	0	0	0	5.4	76.4	0	0	0	0
D3H44	0	0	10	1	2	85.6	0	0	0	0

JP 2016-508117 A 2016.3.17

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2013/050914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C07K 16/46*** (2006.01), ***C07K 16/00*** (2006.01), ***C12N 15/13*** (2006.01), ***C12N 5/10*** (2006.01), ***C12Q 1/68*** (2006.01), ***G06F 19/10*** (2011.01)
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)
IPC: ***C07K 16/46*** (2006.01), ***C07K 16/00*** (2006.01), ***C12N 15/13*** (2006.01), ***C12N 5/10*** (2006.01), ***C12Q 1/68*** (2006.01), ***G06F 19/10*** (2011.01)

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: TotalPat, Scopus, Medline, Canadian Patent Database, Google Scholar.
Keywords: bispecific, heterodimer*, antibod*, IgG, light chain, mutation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2009/0182127 A1 (NOVO NORDISK A/S) 16 July 2009 (16-07-2009) See whole document including table 1, on page 3.	1-11, 13-41, 44-50 and 54-61 12 and 51-53
Y	ZHU, Z. et al. "Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation", PROTEIN SCIENCE. April 1997 (04-1997). Vol. 6, No. 4, Pages 781-788. ISSN: 1469-896X. See whole document including page 784, Table 1.	12 and 51-53
Y	IGAWA, T. et al. "V_H/V_L interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION. August 2010 (08-2010). Vol. 23, No. 8, Pages 667-677. ISSN: 1741-0134. See whole document.	12 and 51-53
A	WO 2006/106905 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 12 October 2006 (12-10-2006).	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 January 2014 (31-01-2014)	07 February 2014 (07-02-2014)

Name and mailing address of the ISA/CA	Authorized officer
Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Kristoffer Wilde (819) 953-0551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2013/050914

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KLEIN, C. et al. "Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies", MABS. November/December 2012 (11/12-2012). Vol. 4, No. 6, Pages 653-663. ISSN: 1942-0870. See whole document.	
T, X	LEWIS, S. M. et al. "Generation of bispecific IgG antibodies by structura-based design of an orthogonal Fab interface" NATURE BIOTECHNOLOGY. 26 January 2014 (26-01-2014). Advanced online publication. doi:10.1038/nbt.2797	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2013/050914

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

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

1. [X] Claim Nos. : 42 and 43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 42 and 43 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, which the International Searching Authority is not required to search under Rule 39.1(iv) of the PCT. However, this Authority has carried out a search based on the alleged use of the construct or composition of the alleged invention for treating a subject having a disease or disorder or cancer or vascular disease, or based on the alleged use of the construct or composition of the alleged invention for inhibiting, reducing or blocking a signal within or to a cell.

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

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

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest
[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2013/050914

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2009182127A1	16 July 2009 (16-07-2009)	EP2035456A1	18 March 2009 (18-03-2009)
		JP2009541275A	26 November 2009 (26-11-2009)
		WO2007147901A1	27 December 2007 (27-12-2007)
WO2006106905A1	12 October 2006 (12-10-2006)	AU2006232287A1	12 October 2006 (12-10-2006)
		AU2006232287A8	24 January 2008 (24-01-2008)
		AU2006232287B2	06 October 2011 (06-10-2011)
		CA2603408A1	12 October 2006 (12-10-2006)
		CN101198698A	11 June 2008 (11-06-2008)
		EP1870459A1	26 December 2007 (26-12-2007)
		EP1870459A4	01 September 2010 (01-09-2010)
		JP2013009675A	17 January 2013 (17-01-2013)
		KR20080013875A	13 February 2008 (13-02-2008)
		US2010015133A1	21 January 2010 (21-01-2010)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	***9/00***	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	
A61P	***9/14***	***(2006.01)***	A61P	9/00		
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61P	9/14		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	A61P	35/00		
C12P	***21/02***	***(2006.01)***	A61P	43/00	１０５	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	
C07K	*16/36*	*(2006.01)*	C07K	16/18		
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	C07K	16/36		
			C07K	16/30		

(31)優先権主張番号 61/869,200
(32)優先日 平成25年8月23日(2013.8.23)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 コーパー アダム ルイ
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ６６ス アベニュー １５５２
(72)発明者 ウロセブ ドウニャ
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト １４ス アベニュー ４０７－５１８
(72)発明者 トム‐ユー ステイシー エー．エル．
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 コキットラム ホライズン ドライブ ３３９５
(72)発明者 ブレイル ダスティン ウェイランド ブルー
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ４８ス アベニュー １０８ ビーエスエムティー

(72)発明者　スプレター　フォン　クレウデンステイン　トーマス
カナダ国　ブリティッシュコロンビア州　バンクーバー　６ス　アベニュー　ウエスト　２８１６
(72)発明者　ディクシット　スージット
カナダ国　ブリティッシュコロンビア州　リッチモンド　キングフィッシャー　ドライブ　１１６５１　＃５１
(72)発明者　ラリオ　パウラ　アイリーン
カナダ国　ブリティッシュコロンビア州　サウス　バンクーバー　イースト　ケント　アベニュー　２０１－２０８０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA02 EA04
GA11 HA01
4B064 AG26 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB41 BB43 BB44 DD62 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】

