(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7674560号
(P7674560)

(45)発行日　令和7年5月9日(2025.5.9)

(24)登録日　令和7年4月28日(2025.4.28)

(51)国際特許分類

		FI		
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46	ZNA
A61K 38/17 (2006.01)		A61K	38/17	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	39/395	Y
A61P 43/00 (2006.01)		A61K	45/00	

請求項の数　20　外国語出願　（全252頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-69098(P2024-69098)
(22)出願日　令和6年4月22日(2024.4.22)
(62)分割の表示　特願2023-45131(P2023-45131)の分割
原出願日　平成28年10月7日(2016.10.7)
(65)公開番号　特開2024-97017(P2024-97017A)
(43)公開日　令和6年7月17日(2024.7.17)
審査請求日　令和6年4月22日(2024.4.22)
(31)優先権主張番号　62/239,206
(32)優先日　平成27年10月8日(2015.10.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/261,769
(32)優先日　平成27年12月1日(2015.12.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　510214045
ザイムワークス ビーシー インコーポレイテッド
カナダ ブイ５ティー １ジー４ ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース アベニュー １１４ スイート ８００
(74)代理人　100130845
弁理士　渡邉 伸一
(72)発明者　ウロセブ、 ドウニャ
カナダ国 ブイ５ゼット ４エヌ５ 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　サンチェス、 マリオ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　カッパ及びラムダ軽鎖を含む抗原結合ポリペプチド構築物及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体を含む抗原結合ポリペプチド構築物であって、

前記第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）は、第１の免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び第１の抗原に特異的に結合する第１のＦａｂ領域を形成する免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含み；前記第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）は、第２の免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び第２の抗原に特異的に結合する第２のＦａｂ領域を形成する免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含み、

Ｈ１は、Ｈ２とは異なり、Ｈ１及びＨ２の各々は、重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）及び重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１ドメイン）を含み；

Ｌ１は、ラムダ軽鎖可変（ＶＬ－ラムダ）ドメイン及びラムダ軽鎖定常（ＣＬ－ラムダ）ドメインを含み、Ｌ２は、カッパ軽鎖可変（ＶＬ－カッパ）ドメイン及びカッパ軽鎖定常（ＣＬ－カッパ）ドメインを含み；

Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２は、以下のアミノ酸置換：

ａ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１４３Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１３３Ｄを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そしてＬ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３１８２－１３４５８）

ｂ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８８Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、１７６Ｄ、および１７８Ｔを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３２０６－１３４５４）

ｃ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２９Ｋ、および１３１Ｋを含む；（１３１９７－１３３５３）

ｄ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、および１７９Ｅを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２４Ｒ、１３５Ｗ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３１８８－１３４３０）

ｅ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３１９２－１３４５２）

ｆ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅおよび１４５Ｔを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２４Ｒ、１３５Ｗ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３２００－１３４２１）

ｇ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３２０２－１３４２６）

ｈ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３２０３－１３４２７）

ｉ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋおよび１３１Ｋを含む；（１３２０４－１３３５１）

ｊ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２９Ｋ、および１３１Ｋを含む；（１３２０５－１３３５３）

ｋ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅおよび１４５Ｔを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２４Ｒ、１３５Ｗ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３１８８－１３４２１）

ｌ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅおよび１４５Ｔを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２４Ｒ、１３５Ｗ、および１７８Ｒを含む；（１３１９０－１３４２２）

ｍ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３１９２－１３４２６）

ｎ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、お

よび２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３１９４－１３４２７）
ｏ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、および１７９Ｅを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２４Ｒ、１３５Ｗ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３２００－１３４３０）
ｐ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３１９４－１３４５６）
ｑ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、１６０Ｋ、および１７８Ｒを含む；（１３２０２－１３４５２）
ｒ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８６Ｒを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３２０３－１３４５６）
ｓ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８８Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、１７６Ｅ、および１７８Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む；（１３２０８－１３４５５）、または
ｔ）Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１７９Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、および１８０Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、そして、Ｌ２は、アミノ酸置換１２１Ｋおよび１３１Ｋを含む；（１３１９６－１３３５１）
を含み、ここで前記アミノ酸置換は、Ｈ１のＬ２に対する対合と比較してＨ１のＬ１に対する対合を優先的に促進し、及び／またはＨ２のＬ１に対する対合と比較してＨ２のＬ２に対する対合を優先的に促進し、ここでアミノ酸残基の番号付けはＫａｂａｔによる、前記抗原結合ポリペプチド構築物。

【請求項２】
Ｈ１は、アミノ酸置換１２５Ｒおよび１８８Ｋを含み、Ｌ１は、アミノ酸置換１２２Ｄ、１２９Ｔ、１７６Ｅ、および１７８Ｅを含み、Ｈ２は、アミノ酸置換１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、および２２８Ｄを含み、およびＬ２は、アミノ酸置換１２１Ｋ、１２４Ｒ、および１７８Ｒを含む（１３２０８－１３４５５）、請求項１に記載の構築物。

【請求項３】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２が細胞または哺乳動物細胞中で同時発現される場合、または、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２が無細胞発現系中で同時発現される場合、または、Ｈ１及びＬ１が細胞中で生成され、Ｈ２及びＬ２が異なる細胞中で生成され、かつ、前記２つの細胞の産物が酸化還元生成方法を介して混合される場合、または、Ｈ１及びＬ１が無細胞発現系中で生成され、Ｈ２及びＬ２が異なる無細胞発現系中で生成され、かつ、前記２つの無細胞発現系の産物が混合される場合、前記アミノ酸置換が、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、及び／またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進する、請求項１または２に記載の構成物。

【請求項４】
Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、及びＬ２の各々の配列が、ヒト配列またはヒト化配列に由来する、請求項１～３のいずれか１項に記載の構築物。

【請求項５】
前記構築物が、２つのＦｃポリペプチドを有する二量体Ｆｃをさらに含み、各Ｆｃポリペプチドは、ＣＨ２ドメイン配列及びＣＨ３ドメイン配列を含み、リンカーを有してまた

は有さずに、前記第１のＦａｂ領域及び第２のＦａｂ領域の１つに結合している、請求項１～４のいずれか１項に記載の構築物。
【請求項６】
前記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５に記載の構築物。
【請求項７】
前記Ｆｃが、ホモ二量体ＣＨ３ドメイン配列と比較してヘテロ二量体ＣＨ３ドメイン配列間の優先的対合を促進する、ＣＨ３ドメイン配列の少なくとも１つにおける１つ以上の置換を野生型に対して含む、請求項５に記載の構成物。
【請求項８】
前記Ｆｃが、
ｉ）前記第１のＦｃポリペプチド中に置換Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び前記第２のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；
ｉｉ）前記第１のＦｃポリペプチド中に置換Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；
ｉｉｉ）前記第１のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び前記第２のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；
ｉｖ）前記第１のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び前記第２のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；または
ｖ）前記第１のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び前記第２のＦｃポリペプチド中に置換Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ
を含み、ここで、Ｆｃのアミノ酸残基の番号付けはＥＵ番号付けに従う、請求項７に記載の構築物。
【請求項９】
前記Ｆｃが、Ｆｃ－γ受容体の選択的結合を促進し、Ｆｃ－γ受容体への結合を減少または排除し、またはＦｃＲｎへの結合を促進するために１つ以上の修飾を含む、請求項５～８のいずれか１項に記載の構築物。
【請求項１０】
前記リンカーが、１つ以上のポリペプチドリンカーである、請求項５～９のいずれか１項に記載の構築物。
【請求項１１】
前記リンカーが、１つ以上の抗体ヒンジ領域を含む、請求項１０に記載の構築物。
【請求項１２】
前記リンカーが、１つ以上のＩｇＧ１ヒンジ領域を含む、請求項１１に記載の構築物。
【請求項１３】
治療剤または薬物にコンジュゲートした、請求項１～１２のいずれか１項に記載の構築物。
【請求項１４】
請求項１～１２のいずれか１項に記載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セット。
【請求項１５】
請求項１４に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドセットのうちの１つ以上を含む、ベクターまたはベクターセット。
【請求項１６】

請求項１４に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドセット、または請求項１５に記載のベクターまたはベクターセットを含む、単離細胞。
【請求項１７】
請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合ポリペプチド構築物、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１８】
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、及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１７に記載の薬学的組成物。
【請求項１９】
請求項１～１２のいずれか１項に記載の構築物の調製方法であって、
（ａ）前記抗原結合ポリペプチド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セットを含む宿主細胞を得るステップ；
（ｂ）前記抗原結合ポリペプチド構築物を発現させる条件下で宿主細胞培養中の前記宿主細胞を培養するステップ、及び
（ｃ）前記宿主細胞培養から前記抗原結合ポリペプチド構築物を収集するステップ
を含む、前記方法。
【請求項２０】
前記宿主細胞が、前記ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドセットで一過的にトランスフェクトされるかまたは安定的にトランスフェクトされる、請求項１９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０１５年１２月１日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、０９６６２１６と名付けられ、２０．０バイトのサイズである。
【背景技術】
【０００２】
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、２つの異なる単一特異性親抗体の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖に基づいて調製されることが多い。２つの異なるエピトープまたは抗原と結合する能力は、二重特異性抗体を、疾患の治療において１つを超える抗原またはエピトープを標的とすることに利益がある治療的適応のための魅力的ツールにする。しかしながら、抗体重鎖は、比較的無差別な方法で抗体軽鎖と結合するように進化しているため、天然に生じる抗体と同様の形態で二重特異性抗体を効率的に産生することは困難な場合がある。この無差別な対合の結果として、二重特異性抗体の２つの異なる重鎖及び２つの異なる軽鎖の同時発現は、重鎖－軽鎖の対合のスクランブリングを自然にもたらす。このスクランブリングは、均質対合が良好な製造可能性及び生物学的効率における必須条件である二重特異性治療薬の創出の主な課題である。
【０００３】
天然に生じる抗体と同様の形態で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。しかしながら、これらのアプローチは、二重特異性抗体を調製するのに使用した両方の親抗体がカッパ遺伝子ファミリーの軽鎖を有する場合のために開発され、例示されている。
【０００４】
公知の治療抗体（従って、可能性のある親抗体）の大多数はカッパ軽鎖を有するが、ラムダ軽鎖を有するものも存在する。カッパ及びラムダ軽鎖は、構造及び配列の両方において互いに異なる。
【０００５】
２つの親抗体から天然に生じる抗体に類似の形式で二重特異性抗体を産生するための様

々なアプローチの概説は、Ｋｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１２）ｍＡｂｓ　４：６，１－１１に見出され得る。国際特許出願第ＰＣＴ／ＥＰ２０１１／０５６３８８号（ＷＯ２０１１／１３１７４６）は、還元条件下でのインキュベーションの際に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。

【０００６】

米国特許公開第２００９／０１８２１２７号（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接続部分及び軽鎖－重鎖対のＣＨ１：ＣＬ接続部分でのアミノ酸残基を修飾することによる二重特異性抗体の生成を記載している。国際特許公開第ＷＯ２０１４／０８１９５５号（Ａｍｇｅｎ）及びＷＯ２０１４／１５０９７３（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ）には、所望の対合特異性をもたらすように修飾される可能性があるラムダ軽鎖におけるアミノ酸残基が記載されている。これらの刊行物のどちらも、カッパ軽鎖を有する１つの親抗体とラムダ軽鎖を有する別の親抗体から二重特異性抗体を調製するために使用することができる相補的アミノ酸修飾について記載されていない。国際特許公開第ＷＯ２０１２／１３１５５５号（Ｇｌｅｎｍａｒｋ）には、抗体の重鎖とラムダ軽鎖の間の接続部分をＴＣＲ（Ｔ細胞受容体）ドメイン接続部分のものに置換することが記載されている。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、免疫グロブリンラムダ軽鎖及び免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む多重特異性抗原結合ポリペプチドを提供する。一態様において、抗原結合ポリペプチドは、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体を含む構築物である。一実施形態において、第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）は、第１の抗原と特異的に結合する第１のＦａｂ領域を形成する第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含み；第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）は、第２の抗原と特異的に結合する第２のＦａｂ領域を形成する第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、Ｈ２とは異なる。いくつかの実施形態において、Ｈ１及びＨ２は、重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）及び重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１ドメイン）を含む。一実施形態において、Ｌ１は、ラムダ軽鎖可変（ＶＬ－ラムダ）ドメイン及びラムダ軽鎖定常（ＣＬ－ラムダ）ドメインを含む。一実施形態において、Ｌ２は、カッパ軽鎖可変（ＶＬ－カッパ）ドメイン及びカッパ軽鎖定常（ＣＬ－カッパ）ドメインを含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、及びＬ２のうちの１つ以上は、対応する野生型のＨ１、Ｈ２、Ｌ１、及びＬ２ポリペプチド配列と比較してアミノ酸修飾を含み、アミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、及び／またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進する。いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、新しいシステイン残基を導入しない。一実施形態において、アミノ酸修飾は、天然に発生するシステイン残基を除去しない。

【０００８】

いくつかの実施形態において、構築物は、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２が細胞または哺乳類細胞中で同時発現される場合、または、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２が無細胞発現系中で同時発現される場合、または、Ｈ１及びＬ１が（第１の）細胞中で生成され、Ｈ２及びＬ２が第２の（例えば、異なる）細胞中で生成され、かつ、２つの細胞の産物が酸化還元生成方法を介して混合される場合、または、Ｈ１及びＬ１が第１の無細胞発現系中で生成され、Ｈ２及びＬ２が第２の（例えば、異なる）無細胞発現系中で生成され、かつ、２つの無細胞発現系の産物が混合される場合、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、及び／またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。

【０００９】

構築物のいくつかの実施形態において、各ヘテロ二量体は、単一Ｆａｂを含む。

【００１０】

本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物のいくつかの実施形態において、

ａ．Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；及び

ｉ．Ｈ１は、１８６または１７９位にアミノ酸置換を含み、及びＬ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；

ｉｉ．Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；

ｉｉｉ．Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；または

ｉｖ．Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含み；

ｂ．Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；

ｉ．Ｈ２は、１８６または１２４及び１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３または１３３及び１６０または１２４及び１３３または１７６及び１８０；または

ｉｉ．Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含み；

ｉｉｉ．Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４及び１３３または１２４及び１３３及び１８０位にアミノ酸置換を含み；

ｃ．Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；

ｉ．Ｈ２は、１２４及び１８６または１２４及び１７９または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６及び１７８または１７６及び１８０または１３１位にアミノ酸置換を含み；または

ｉｉ．Ｈ２は、１４３及び１８８または１４３または１２４及び１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４及び１７６及び１７８または１２４及び１７８または１２４及び１８０または１２４及び１７６及び１８０、または１２４、または１２４及び１７６位にアミノ酸置換を含み；

ｄ．Ｈ１は、１７９、１８６、１４３及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０、１３３及び／または１７６及び１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１及び／または１２４位にアミノ酸置換を含み；

ｅ．Ｈ１は、３９位にアミノ酸置換を含み、または、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず；Ｌ１は、３８位にアミノ酸置換を含み、または、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず；Ｈ２は、３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、３８位にアミノ酸置換を含み；

ｆ．Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；

ｉ．Ｈ２は、１８８または１２４及び１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６及び１７８または１７６及び１８０または１３１位にアミノ酸置換を含み；または

ｉｉ．Ｈ２は、１４３または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４及び１３３または１２４及び１３３及び１８０位にアミノ酸置換を含み；

ｇ．Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６及び１７８または１７８位にアミノ酸置換を含み；及び

ｉ．Ｈ２は、１７７及び１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６及び１７８位にアミノ酸置換を含み；または

ｉｉ．Ｈ２は、１８６または１２４または１２４及び１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６または１３１及び１７６位にアミノ酸置換を含み；

ｈ．Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；

ｉ．Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含み；または

ｉｉ．Ｈ２は、１７７及び１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６及び１７８位にアミノ酸置換を含み；または
Ｈ１は、１２４及び１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６または１７６及び１７８位にアミノ酸置換を含み；
ｉ．Ｈ１は、１７７及び１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６及び１７８位にアミノ酸置換を含み；及び
ａ．Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６及び１７８または１３１位にアミノ酸置換を含み；
ｂ．Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３３または１２４及び１６０及び１８０位にアミノ酸置換を含み；
ｃ．Ｈ２は、１２４または１２４及び１７９または１２４及び１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６または１７６及び１７８または１７６及び１８０位にアミノ酸置換を含み；または
ｄ．Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３３または１２４及び１３３位にアミノ酸置換を含み；
ｊ．Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６及び１７８または１７６及び１８０または１７６位にアミノ酸置換を含み；
ｋ．Ｈ１は、１４５及び１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４、１３３、及び１７８のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含み；
ｌ．Ｈ１は、１７４、１７９または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６または１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３または１９０位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１、１３５または１２４位にアミノ酸置換を含み；または
ｍ．Ｈ１は、１７４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、または１３５位にアミノ酸置換を含み；
ｎ．Ｈ１は、１４３及び１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３１及び１３５位にアミノ酸置換を含み；
ｏ．Ｈ１は、１４３及び／または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含み；
ｐ．Ｈ１は、１４３及び１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４及び１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７８及び１８０または１６０及び１８０位にアミノ酸置換を含み；
ｑ．Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１７９または１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４及び１６０及び１８０位にアミノ酸置換を含み；
ｒ．Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０または１７８及び１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３及び／または１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４及び１７８または１３１位にアミノ酸置換を含み；
ｓ．Ｈ１は、１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；
ｔ．Ｈ１は、１４３または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず；Ｈ２は、１４３及び１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；
ｕ．Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず；Ｌ１は、１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１１６位にアミノ酸置

換を含み；
ｖ．Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、または４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず；Ｈ２は、４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、４４位にアミノ酸置換を含み；
ｗ．Ｈ１は、１３９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１１６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、Ｌ２は、１３５位にアミノ酸置換を含み；または
ｘ．Ｈ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６位にアミノ酸置換を含む。

【００１１】
いくつかの実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対して対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域の親和性の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０または１００倍以内であり、及び／または第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対して対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域の親和性の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０または１００倍以内である。

【００１２】
いくつかの実施形態において、第１のＦａｂ領域の融解温度（Ｔｍ）は、第１の抗原に対して対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０℃以内であり、及び／または第２のＦａｂ領域の融解温度（Ｔｍ）は、第２の抗原に対して対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０℃以内である。

【００１３】
抗原結合ポリペプチド構築物のいくつかの実施形態において、
ａ．Ｈ１及びＬ１は、野生型ポリペプチド配列であり、Ｈ２及びＬ２の各々は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み；
ｂ．Ｈ１、Ｌ１、及びＨ２のうちの１つ以上は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｌ２は、野生型ポリペプチド配列であり；
ｃ．Ｈ１、Ｌ１、及びＬ２のうちの１つ以上は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ２は、野生型ポリペプチド配列であり；
ｄ．Ｈ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｌ１は、野生型ポリペプチド配列であり；
ｅ．Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ１は、野生型ポリペプチド配列であり；または
ｆ．Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２の各々は、少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む。

【００１４】
いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、
ａ．Ｈ１及びＨ２のＣＨ１ドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパドメイン；または
ｂ．Ｈ１及びＨ２のＣＨ１及びＶＨドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダドメイン及びＶＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパドメイン及びＶＬ－カッパドメイン中である。

【００１５】
いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、
ａ．Ｈ１のＣＨ１ドメイン、Ｈ２のＣＨ１ドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパドメインのうちの少なくとも２つ；
ｂ．Ｈ１及びＨ２のＣＨ１及びＶＨドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダドメイン及びＶＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパドメイン及びＶＬ－カッパドメインのうちの少なくとも２つ、または

ｃ．Ｈ１のＶＨドメイン、Ｈ２のＶＨドメイン、Ｌ１のＶＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＶＬ－カッパドメインのうちの少なくとも２つ中である。

【００１６】

いくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及び／またはＬ２は、Ｆａｂ領域中に少なくとも１、２、３、４、５、６、７、または８個のアミノ酸突然変異を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つの定常ドメイン及び／または少なくとも１つの可変ドメインの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、または１０のアミノ酸修飾を含む。

【００１７】

一実施形態において、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２のうちの少なくとも１つの相対的対合が野生型に対して少なくとも約１０％より大きく、かつ、他方の相対的対合が野生型の約１０％以内または野生型に対して少なくとも約１０％より大きくなるように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含む。

【００１８】

いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成する、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも６０：４０であり；またはアミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成し、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも４０：６０であり、及びＨ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも６０：４０である。

【００１９】

いくつかの実施形態において、第１のＦａｂ領域の熱安定性は、対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、または３℃以内である。いくつかの実施形態において、第２のＦａｂ領域の熱安定性は、対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、または３℃以内である。

【００２０】

いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、表４Ａまたは４Ｂに示す固有の識別子Ｍａｂ設計セットからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２のうちの１つ以上に示す固有の識別子Ｍａｂ設計セットからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、表１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０のいずれか１つに示す固有の識別子Ｍａｂ設計セットからなる群から選択される。

【００２１】

いくつかの実施形態において、構築物は、各々は、ＣＨ３ドメイン配列を含み、リンカーを有してまたは有さずに、第１のＦａｂ領域及び第２のＦａｂ領域の１つに連結した２つのＦｃポリペプチドを有する二量体Ｆｃをさらに含む。いくつかの実施形態において、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。一実施形態において、Ｆｃは、ヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進するＣＨ３ドメイン配列のうちの少なくとも１つにおいて、野生型と比較して１つ以上の修飾を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態において、Ｆｃは、

ｉ）第１のＦｃポリペプチド中に修飾Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中に修飾Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体

ＩｇＧ１　Ｆｃ；
　ｉｉ）第１のＦｃポリペプチド中に修飾Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；
　ｉｉｉ）第１のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；
　ｉｖ）第１のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；または
　ｖ）第１のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、及び第２のＦｃポリペプチド中の修飾Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗを有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃを含む。

【００２３】

いくつかの実施形態において、Ｆｃは、少なくとも１つのＣＨ２ドメイン配列をさらに含む。一実施形態において、Ｆｃは、Ｆｃ－γ受容体の選択的結合を促進し、Ｆｃ－γ受容体への結合を減少または排除し、またはＦｃＲｎへの結合を促進するために１つ以上の修飾を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２は同時発現される場合、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２対合の合計によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、または４５％よりも大きく、または、生成されたハーフ抗体以外の種のパーセンテージとして生成された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きく、または、生成された全ての種のパーセンテージとして生成された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きい。

【００２５】

いくつかの実施形態において、リンカーは、１つ以上のポリペプチドリンカー、１つ以上の抗体ヒンジ領域、または１つ以上のＩｇＧ１ヒンジ領域を含む。一実施形態において、１つ以上のポリペプチドリンカーは、野生型ポリペプチドリンカーと比較して１つ以上の修飾を含む。

【００２６】

いくつかの実施形態において、アミノ酸修飾は、アミノ酸置換を含む。

【００２７】

いくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、及びＬ２のうちの１つ以上の配列は、ヒト配列またはヒト化配列に由来する。

【００２８】

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、治療剤または薬物にコンジュゲートしている。

【００２９】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される構築物をコードする単離組換えポリヌクレオチドまたは単離組換えポリヌクレオチドセットを提供する。いくつかの実施形態において、提供されるのは、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セットである。いくつかの実施形態において、ベクター、またはベクターセットのうちの少なくとも１つのベクターは、多シストロン性である。

【００３０】

別の態様において、本開示は、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セット、またはベクターまたはベクターセットを含む単離細胞を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、酵母細胞、細菌性細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞である。いくつかの実施形態において、単離細胞は、本明細書に記載されるベクターまたはベクターセットで安定的にトランスフェクトされるかまたは一過的にトランスフェクトされる。

【００３１】

別の態様において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物を含む薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含む。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、緩衝液、酸化防止剤、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、及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。

【００３２】

別の態様において、本明細書に記載される構築物の調製方法を説明する。いくつかの実施形態において、方法は、

（ａ）抗原結合ポリペプチド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セットを含む宿主細胞を得る工程；

（ｂ）抗原結合ポリペプチド構築物を発現させる条件下で宿主細胞培養物中の宿主細胞を培養する工程、及び

（ｃ）宿主細胞培養物から抗原結合ポリペプチド構築物を収集する工程を含む。

【００３３】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、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セットで一過的にトランスフェクトされるかまたは安定的にトランスフェクトされる。

【００３４】

別の態様において、コンピューター読み取り可能な記憶媒体を提供する。いくつかの実施形態において、コンピューター読み取り可能な記憶媒体は、第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び第１の免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体；及び第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び第２の免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を含む第２のヘテロ二量体中で相補的アミノ酸修飾を表すデータを含むデータセットを記憶する。いくつかの実施形態において、データセットに記憶されるＨ１及びＨ２ポリペプチド配列は、少なくとも重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）及び重鎖定常ドメイン（ＣＨ１ドメイン）を含み、かつ、互いに異なる。いくつかの実施形態において、データセットに記憶されるＬ１及びＬ２ポリペプチド配列は、少なくとも軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）及び軽鎖定常ドメイン（ＣＬドメイン）を含む。いくつかの実施形態において、データセットに記憶される相補的アミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進する。いくつかの実施形態において、データセットは、表４Ａまたは表４Ｂに記載されたそれら修飾またはそれら修飾のサブセットを表すデータを含む。いくつかの実施形態において、データセットは、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２または表１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０のうちの１つ以上に記載されたそれら修飾またはそれら修飾のサブセットを表すデータを含む。

【００３５】

別の態様において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の生成方法を説明する。いくつかの実施形態において、方法によって生成された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、

ａ．第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び第１の免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を含む第１のヘテロ二量体；及び
ｂ．第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び第２の免疫グロブリンカッパ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む。

【００３６】

いくつかの実施形態において、方法によって生成されたＨ１及びＨ２ポリペプチド配列は、少なくとも重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）及び重鎖定常ドメイン（ＣＨ１ドメイン）を含み、かつ、互いに異なる。いくつかの実施形態において、方法によって生成されたＬ１及びＬ２ポリペプチド配列は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）及び軽鎖定常ドメイン（ＣＬドメイン）を含む。いくつかの実施形態において、方法によって生成されたＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上ポリペプチド配列は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。

【００３７】

いくつかの実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の生成方法は、
ａ．本明細書に記載されるデータセットからの１つ以上の相補的アミノ酸修飾をＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及び／またはＬ２に導入すること；及び
ｂ．宿主細胞中でＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２を同時発現し、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を含む発現産物を産生することを含む。

【００３８】

いくつかの実施形態において、方法は、他のポリペプチド産物に対する発現産物中の二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量を決定して、野生型Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２の同時発現から得られる発現産物中の二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量と比較して二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量の増加をもたらす相補的アミノ酸修飾の好ましいサブセットを選択することをさらに含む。いくつかの実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、他のポリペプチド産物と比較して７０％以上の純度で生成される。いくつかの実施形態において、方法によって生成された構築物は、少なくとも２つのＣＨ３ドメイン配列を含むＦｃを含み、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを有してまたは有さずに、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体に連結する。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ホモ二量体Ｆｃを上回ってヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する１つ以上のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃである。

【００３９】

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のいくつかの実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２は同時発現される場合、産生された％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２の合計によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、または４５％よりも大きく；または、産生されたハーフ抗体以外の種のパーセンテージとして産生された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きく；または、産生された全ての種のパーセンテージとして産生された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化は、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きい。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１】可変及び定常ドメインのヒト生殖細胞系列配列に対して整列されたＤ３Ｈ４４、ペルツズマブ、及びＣＡＴ－２２００重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を示す。各ドメイン、生

殖細胞系列、及び対立遺伝子の翻訳されたタンパク質配列は、ＩＭＧＴ／ＧＥＮＥ－ＤＢ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ｇｅｎｅｄｂ／ｑｕｅｒｙ）に直接問い合わせることによって得られた。ＩＭＧＴ／ＤｏｍａｉｎＧａｐＡｌｉｇｎ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／３Ｄｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ＤＢ／ｃｇｉ／ＤｏｍａｉｎＧａｐＡｌｉｇｎ．ｃｇｉ）を使用して、最も近い遺伝子／対立遺伝子を決定した。コンセンサス配列の同定は、０．８カットオフによるＢｏｘＳｈａｄｅ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｈ．ｅｍｂｎｅｔ．ｏｒｇ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／ＢＯＸ＿ｆｏｒｍ．ｈｔｍｌ）によって行われた。黒色で陰影したアミノ酸残基は、アミノ酸配列同一性を表すが、灰色で陰影したものは、アミノ酸配列類似性を表す。図１の各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ．－Ｐ．ｅｔ ａｌ．「ＩＭＧＴ ｕｎｉｑｕｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ａｎｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｃｏｎｓｔａｎｔ ｄｏｍａｉｎｓ ａｎｄ Ｉｇ ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ Ｃ－ｌｉｋｅ ｄｏｍａｉｎｓ」Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００５，２９，１８５－２０３，ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｐｏｍｍｉｅ，Ｃ．，Ｒｕｉｚ，Ｍ．，Ｇｉｕｄｉｃｅｌｌｉ，Ｖ．，Ｆｏｕｌｑｕｉｅｒ，Ｅ．，Ｔｒｕｏｎｇ，Ｌ．，Ｔｈｏｕｖｅｎｉｎ－Ｃｏｎｔｅｔ，Ｖ．ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｇ．「ＩＭＧＴ ｕｎｉｑｕｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ａｎｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｄ Ｉｇ ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ Ｖ－ｌｉｋｅ ｄｏｍａｉｎｓ」Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２７，５５－７７（２００３）に記載されるＩＭＧＴ定義に従って行われた。図１Ａは、ヒトＩＧＨＶ及びＩＧＨＪ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４可変重鎖（ＶＨ）ドメインを示す（１つの代表的な配列を、遺伝子及び対立遺伝子ごとに示す）。ペルツズマブＩＧＨＶ及びＩＧＨＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｘ９２２１８｜ＩＧＨＶ３－６６＊０１及びＪ００２５６｜ＩＧＨＪ４＊０１である。Ｄ３Ｈ４４　ＩＧＨＶ及びＩＧＨＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｘ９２２１８｜ＩＧＨＶ３－６６＊０１及びＪ００２５６｜ＩＧＨＪ４＊０１である。図１Ｂは、ヒトカッパＩＧＫＶ及びＩＧＫＪ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４可変軽鎖（ＶＬ）ドメインを示す（１つの代表的な配列を、遺伝子及び対立遺伝子ごとに示す）。ペルツズマブＩＧＫＶ及びＩＧＫＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｙ１４８６５｜ＩＧＫＶ１－ＮＬ１＊０１及びＪ００２４２｜ＩＧＫＪ２＊０１である。Ｄ３Ｈ４４　ＩＧＫＶ及びＩＧＫＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｘ５９３１５｜ＩＧＫＶ１－３９＊０１及びＪ００２４２｜ＩＧＫＪ１＊０１である。図１Ｃは、ヒトＣＨ１　ＩＧＨＧ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４定常重鎖１（ＣＨ１）ドメインを示す。ペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４　ＩＧＨＧに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、Ｊ００２２８｜ＩＧＨＧ１＊０１である。図１Ｄは、ヒトカッパＩＧＫＣ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４定常軽鎖（ＣＬ）ドメインを示す。ペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４　ＩＧＫＣに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、Ｊ００２４１｜ＩＧＫＣ＊０１である。図１Ｅは、ヒトＩＧＨＶ及びＩＧＨＪ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたＣＡＴ－２２００　ＶＨドメインを示す（１つの代表的な配列を、遺伝子及び対立遺伝子ごとに示す）。ＣＡＴ－２２００　ＩＧＨＶ及びＩＧＨＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｍ９９６６０｜ＩＧＨＶ３－２３＊０１及びＪ００２５６｜ＩＧＨＪ４＊０１である。図１Ｆは、ヒトラムダＩＧＬＶ及びＩＧＬＪ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたＣＡＴ－２２００　ＶＬドメインを示す（１つの代表的な配列を、遺伝子及び対立遺伝子ごとに示す）。ＣＡＴ－２２００　ＩＧＬＶ及びＩＧＬＪに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、それぞれ、Ｚ７３６７３｜ＩＧＬＶ６－５７＊０１及びＭ１５６４１｜ＩＧＬＪ２＊０１である。図１Ｇは、ヒトＣＨ１　ＩＧＨＧ生殖細胞系列サブグループに対して整列されたＣＡＴ－２２００ＣＨ１ドメインを示す。ＣＡＴ－２２００　ＩＧＨＧに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、Ｊ００２２８｜ＩＧＨＧ１＊０１である。図１Ｈは、ヒトラムダＩＧＬＣ生殖細胞

系列サブグループに対して整列されたＣＡＴ－２２００　ＣＬドメインを示す。ＣＡＴ－２２００　ＩＧＬＣに最も近い遺伝子及び対立遺伝子配列は、Ｊ００２５３｜ＩＧＬＣ２＊０１である。

【図２】接続部分残基を同定し、優先的重鎖－軽鎖対合による設計の計算モデリングのためのフローチャートを示す。

【図３】Ｄ３Ｈ４４（ＰＤＢ　ＩＤ　１ＪＰＴ）及びＣＡＴ－２２００（ＰＤＢ－ＩＤ　２ＶＸＳ）の定常ドメイン間の３Ｄ構造アラインメントを示す。図３Ａは、それぞれの重鎖上に整列された場合にカッパ及びラムダ軽鎖の間に見られる一般的な立体配座の差異を例示する。図３Ｂは、立体配座の差異をさらに例示するために、図３Ａに提示したモデルの（重鎖を除去した）軽鎖接続部分の図を提示する。点線の矢印は、重鎖と軽鎖の間の接続部分で二次構造要素の立体配座再配置を指し示す。

【図４】二重特異性抗体を形成するためのエンジニアリング要件、及び重鎖軽鎖（Ｈ－Ｌ）対を定量化するのに必要なアッセイ要件の高レベルの概略図を示す。高純度（すなわち、誤対合Ｈ－Ｌ会合がほとんどまたは全くない）で二重特異性抗体をエンジニアリングする設計ゴールは、（特異的アミノ酸突然変異の導入を介して）固有の同族軽鎖に対する２つの固有の重鎖の優先的対合の合理的なエンジニアリングによって達成することができる。このプロセスは、概略的に示し；ここで、Ｈ１は、Ｌ２（「Ｘ」で示される）ではなくＬ１（チェックマークで示される）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。Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体上の矢印は、これらのＨ－Ｌ対間の対合のし易さを表すが、Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１ヘテロ二量体の矢印は、後者のＨ－Ｌ対間の対合の破壊を表す。優先的対合を促進するための設計の実験的なスクリーニングは、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２とＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１を同時に定量化することが可能なアッセイが必要となる。これらのアッセイ要件は、各二重特異性Ｆａｂアームが独立して遺伝子操作可能であると想定することによって単純化することができる。この場合、アッセイは、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２またはＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１を定量化するだけでよく、及び両方を同時に定量化する必要はない。

【図５】重鎖及び軽鎖をどのようにタグ付けすることができ、かつ、優先的対合をどのよう決定するかを示す概略図を提供する。この概略図では、円形境界は、３つの構築物（１つの重鎖及び２つの固有の軽鎖）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、検出デバイス、この場合には、ＳＰＲチップの上に上清（ＳＰＮＴ）を通過させる。重鎖対合に競合する２つの軽鎖に融合した２つの異なるタグの検出に基づいて、２つの軽鎖への重鎖の優先的対合の定量的推定を得ることができる。

【図６】設計ごとの２つのＬＣＣＡ結果に基づいた性能フィルタリング基準を示す。これらの性能フィルタリング基準を使用して、Ｋ－Ｌ設計ライブラリー及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計ライブラリーを同定した。含まれるために、設計は、中立ゾーン（中立ゾーンは、４０：６０～６０：４０の対合：誤対合比の間の領域として定義される）を上回る陽性のＬＣＣＡ結果の含むべきである一方、他のＬＣＣＡは、中立ゾーン（４０：６０の対合：誤対合比）の下限値を上回る必要がある。シナリオＡ及びＢは、フィルタリング基準を通過する設計を表す。Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１　ＬＣＣＡが中立ゾーンを上回り、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２　ＬＣＣＡが中立ゾーン内である（それを下回らない）ため、シナリオＢは含まれることに留意されたい。シナリオＣは、両方のＬＣＣＡ結果が陽性であるが、どちらも中立ゾーンを上回らない場合に除外される設計を表す。他方のＬＣＣＡが中立ゾーン（シナリオＤを参照）を上回ったとしてもＬＣＣＡ結果のうちの少なくとも１つが中立ゾーンを下回るため、シナリオＤ及びＥは、除外される設計を表す。Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２の指定を逆にした設計も含まれる。この図の説明は、野生型対合比が５０：５０であると仮定している。

【図７】設計強度＝ΔＨ１：Ｌ１：Ｌ２＿スカラー＋ΔＨ２：Ｌ２：Ｌ１＿スカラーによって定義された（表４Ａ及び４ＢにおけるＭａｂ設計セットのＬＣＣＡデータに基づいて）選択されたＫ－Ｌ設計並びにＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の性能を示す。このメトリックは、設計レベルでの全体の対合成功のインジケータである。

【図８】２つの異なる軽鎖が細胞中で２つの異なる重鎖と同時発現される場合に予想される可能性のある重鎖関連産物を示す。
【図９】本明細書に提供されるＭａｂ設計セットライブラリーを用いた二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の一般的な調製方法を示す。
【図１０】設計クラスターによる、３つの二重特異系におけるＳＭＣＡで試験した全てのＫ－Ｌ設計の性能をまとめた最小最大の箱ひげ図を示す。図１０Ａは、総二重特異性計算（Δ二重特異性％）によって測定される性能を示す。図１０Ｂは、総対合計算（Δ対合％）によって測定される性能を示す。
【図１１】伝達性グループによる、二重特異系当たりのＫ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の性能をまとめた最小最大の箱ひげグラフを示し；「ｋｌ　３／３」は、３／３二重特異系で伝達可能なＫ－Ｌ設計を示し、「ｋｌ　３／３＋２／３」は、少なくとも２つの二重特異系で伝達可能なＫ－Ｌ設計を示し、「ｋｌ　ａｌｌ」は、試験した全てのＫ－Ｌ設計を示す。同様に、「ｋｋ　３／３」は、３／３二重特異系で伝達可能なＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計を示し、「ｋｋ　３／３＋２／３」は、少なくとも２つの二重特異系で伝達可能なＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計を示し、「ｋｋ　ａｌｌ」は、試験した全てのＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計を示し；結果は、総二重特異性計算（Δ二重特異性％）に基づいて提示する。
【図１２】（３つの二重特異系の各々における）Ｍａｂ設計セット３９７２（ＳＭＣＡ設計ＩＤ）を用いて産生された二重特異性抗体、及び系ごとの野生型親抗体のＤＳＣセンサーグラムを示す。図１２Ａは、野生型ＣＡＴ－２２００　ｍＡｂ（暗灰色）、野生型ペルツズマブｍＡｂ（中灰色）及び設計３９７２　ＣＡＴ－２２００／ペルツズマブＳＭＣＡ（明灰色）を示し；図１２Ｂは、野生型ＣＡＴ－２２００　ｍＡｂ（暗灰色）、野生型ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ｍＡｂ（中灰色）及び設計３９７２　ＣＡＴ－２２００／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ＳＭＣＡ（明灰色）を示し；図１２Ｃは、野生型ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ｍＡｂ（暗灰色）、野生型ＣＲ８０７１　ｍＡｂ（中灰色）及び設計３９７２　ＣＲ８０７１／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ＳＭＣＡ（明灰色）を示す。
【図１３】試験したＦａｂのＴｍに対するＭａｂ設計のアミノ酸置換の効果をまとめた最小最大の箱ひげ図を示す。結果は、野生型と比較したＦａｂ　Ｔｍの変化として報告され、Ｔｍを測定し（「全て」）、パラトープによって分離された全ての設計について示す。
【図１４】その抗原について試験したＦａｂの親和性に対するＭａｂ設計のアミノ酸置換の効果をまとめた最小最大の箱ひげ図を示す。結果は、野生型からの二重特異性の適切なＦａｂのｌｏｇ（ＫＤ）における差異として報告される（－（ｌｏｇ（ＫＤ＿変異体）－ｌｏｇ（ＫＤ＿ｗｔ））。結果は、親和性を測定し（「全て」）、パラトープによって分離された全ての設計について示す。
【図１５】タンパク質Ａ、及び分取ＳＥＣ精製された二重特異性抗体及び親抗体のＵＰＬＣ－ＳＥＣプロファイルを示す。図１５Ａは、野生型親ＣＡＴ－２２００　ｍＡｂを示し；図１５Ｂは、野生型親ＣＲ８０７１　ｍＡｂを示し；図１５Ｃは、野生型親ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ｍＡｂを示し；図１５Ｄは、野生型親ペルツズマブｍＡｂを示し；図１５Ｅは、設計３９７２　ＣＡＴ－２２００／ペルツズマブＳＭＣＡを用いて産生された二重特異性抗体を示し；図１５Ｆは、設計３９７２　ＣＡＴ－２２００／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ＳＭＣＡを用いて産生された二重特異性抗体を示し；図１５Ｇは、設計３９７２　ＣＲ８０７１／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ＳＭＣＡを用いて産生された二重特異性抗体を示す。
【図１６】対応する野生型の二重特異性構築物がＳＭＣＡによって評価されなかった場合に、ＳＭＣＡにおいて試験した設計の、「野生型に対する総対合の変化」及び「野生型に対する」総二重特異性の変化」を計算する野生型参照値を選択するためのプロセスを示す。図１６Ａは、３つの二重特異系ごとの「総対合」（「％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合」）の野生型参照値を選択するためのプロセスを示し；図１６Ｂは、３つの二重特異系ごとの「総二重特異性」（「Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＊＊」）の野生型参照値を選択するためのプロセスを示す。
【発明を実施するための形態】
【００４１】

本明細書で提供されるのは、対合して第１のＦａｂ領域を形成する第１の免疫グロブリン重鎖（Ｈ１）及び免疫グロブリンラムダ軽鎖（Ｌ１）を有する第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）、及び対合して第２のＦａｂ領域を形成する免疫グロブリン重鎖（Ｈ２）及び免疫グロブリンカッパ軽鎖（Ｌ２）を有する第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）を含み得る遺伝子操作された抗体（本明細書中で、多重特異性抗原結合ポリペプチド構築物とも呼ばれる）である。第１のＦａｂ領域は、典型的には、第１の抗原と結合し、第２のＦａｂ領域は、典型的には、第２の抗原と結合する。いくつかの実施形態において、第１及び第２の抗原は互いに異なる。Ｈ１は、Ｈ２とは異なる。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のうちの１つ以上は、同時発現または共生成される場合に、正しく対合された重鎖及び軽鎖（Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２）の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含むように遺伝子操作される。より具体的には、第１のヘテロ二量体（Ｈ１）の重鎖が、Ｌ２よりもＬ１と優先的に対合でき、かつ、第２のヘテロ二量体（Ｈ２）の重鎖が、Ｌ１よりもＬ２と優先的に対合できるように、アミノ酸修飾は、各重鎖と正しい軽鎖の間の優先的対合を促進する。その結果、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチドの同時発現により、誤対合を減少または制限させて正しく対合された二重特異性抗体を産生することが可能になるため、産生された誤対合種の数及び量を減少し、製造性を改善させる可能性がある。一実施形態において、Ｆａｂ領域中のアミノ酸修飾は、Ｆｃ領域中のアミノ酸修飾と対合して、ヘテロ二量体Ｆｃ領域の形成を促進し、誤対合重鎖の量をさらに減少させる。アミノ酸修飾は、野生型Ｈ１及びＬ１またはＨ２及びＬ２ポリペプチドから形成されるヘテロ二量体と比較して、正しく対合されたヘテロ二量体の熱安定性、または抗原に対してそれぞれ正しく対合されたヘテロ二量体の結合親和性に有意な影響を及ぼさない。

【００４２】

また、本明細書で提供されるのは、上述の多重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を作製する方法である。

【００４３】

定義

特に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、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または他のこのような識別子またはアドレスで引用がなされている場合には、こ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、このような情報の利用可能性及び公的な普及を証明する。

【００４４】

前述の一般的な説明及び以下の発明を実施するための形態は、単に例示及び説明であって、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。

【００４５】

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及び１／１００など）とを含むと理解される。本明細書で使用される場合、「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±１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、または１０％を意味する。本明細書で使用される場合、「１つ（ａ）」及び「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場合、「含む（Ｉｎｃｌｕｄｅ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」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及び置換基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と理解されるべきである。従って、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、本開示の範囲内にある。

【００４６】

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、マニュアル及び論文を含むが、これらに限定されない、本明細書で引用される全ての文書、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。

【００４７】

本明細書に記載される方法及び組成物は、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、及び試薬に限定されず、従って、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及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。

【００４８】

本明細書で言及される全ての刊行物及び特許は、例えば、刊行物に記載される構築物及び方法論といった、説明及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、及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、こ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。

【００４９】

本出願において、アミノ酸名及び原子名（例えば、Ｎ、Ｏ、Ｃなど）は、ＩＵＰＡＣ命名法（ＩＵＰＡＣ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ ａｎｄ Ｓｙｍｂｏｌｉｓｍ ｆｏｒ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓａｎｄ 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個の天然に生じるアミノ酸、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）、及びチロシン（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。

【００５０】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「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、ペプチドの記載及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つ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を包含する。

【００５１】

「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。

【００５２】

「細胞」、「宿主細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」は、本明細書において交換可能に使用され、このような全ての用語には、細胞の増殖及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」及び「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。

【００５３】

「アミノ酸」という用語は、天然に生じるアミノ酸、及び天然に生じないアミノ酸、並びに、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及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、及びバリン）、並びにピロリジン及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などの炭素が水素、カルボキシル基、アミノ基、及び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（ノルロイシンなど）、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（アミノ酸の変異体及び誘導体など）；アラニン、オルニチンなどの天然に生じる非タンパク新生アミノ酸；及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、Ｎ－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）、並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つ以上のＤ－アミノ酸を含む、非天然アミノ酸を、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物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などは、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。従って、Ｄ－アミノ酸を組み込むというペプチドの構築などは、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－ペプチドなどは、内因性のペプチダーゼ及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－ペプチドなどは、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。

【００５４】

アミノ酸は、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生物化学命名委員会が推薦する一般に知られている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、一般に受け入れられている１文字コードにより称され得る。

【００５５】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸及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、及びＧＣＵのコドンは

全て、アミノ酸アラニンをコードしている。従って、コドンによりアラニンが特定される全ての位置では、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いず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全ての核酸配列はまた、この核酸の全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、及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）。従って、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。

【００５６】

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、こ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。機能的に類似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、及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。

【００５７】

機能的に類似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考えられ得るアミノ酸を含んでいる：

アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；

アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；

アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；

アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；

イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；

フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；及び

セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；

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

【００５８】

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及び整列させ、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パーセンテージが同じである場合、配列は「実質的に同一」または「実質的に類似」である（すなわち、指定の領域にわたって少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または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。本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物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、前記ポリヌクレオチド配列を含有する全長のｃＤＮＡ及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、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物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。

【００５９】

配列同一性％及び配列類似性％を決定するのに適切なアルゴリズムの例は、ＢＬＡＳＴ（商標）及びＢＬＡＳＴ（商標）２．０アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－４０２、１９７７）及びＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０、１９９０）において記載されている。ＢＬＡＳＴ（商標）解析を実施するためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎを通じて公に利用可能である（インターネットｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照されたい）。累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメーターＭ（一致した残基対の報酬スコア；常に０より大きい）及びＮ（一致しない残基のペナルティースコア；常に０より小さい）を用いて計算される。アミノ酸配列について、スコア付けマトリクスが、累積スコアを計算するために使用される。各方向におけるそのワードヒットの伸長は、以下の場合停止される：累積アラインメントスコアが、最大達成値から量Ｘが減少する場合；１つ以上の負のスコア残基アラインメントの蓄積に起因して、累積スコアが、ゼロ以下になる場合；または、いずれかの配列の末端が届いた場合。ＢＬＡＳＴアルゴリズムパラメーターＷ、Ｔ、及びＸは、アラインメントの感度及び速さを決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列について）のアルゴリズムパラメーターの例は、１１のワード長（Ｗ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両鎖の比較である。アミノ酸配列について、ＢＬＡＳＴＰプログラムのアルゴリズムパラメーターの例は、３のワード長、１０の期待値（Ｅ）、及びＢＬＯＳＵＭ６２のスコア付けマトリクスである（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ及びＨｅｎｉｋｏｆｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０９１５，１９８９を参照されたい）。

【００６０】

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アミノ酸長である配列にわたって少なくとも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。ある特定の実施形態において、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のいずれかと少なくとも７５％同一である。ある特定の実施形態において、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のいずれかと少なくとも８５％同一である。ある特定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。ある特定の実施形態において、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のいずれかと少なくとも９９％同一である。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「単離された」ポリペプチドまたは構築物は、その天然細胞培養物環境の成分から同定及び分離及び／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及び治療への使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、及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。

【００６２】

ある特定の実施形態において、本明細書で使用される場合、「単離された」抗原結合ポリペプチド構築物とは、その天然細胞培養物環境の成分から同定及び分離及び／または回収された抗原結合ポリペプチド構築物を記載する。例えば、本明細書に記載される単離された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、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、その天然細胞培養物環境の成分から同定及び分離及び／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ポリペプチド構築物の診断及び治療への使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、及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。

【００６３】

ヘテロ二量体及び抗原結合ポリペプチド構築物は、実質的に均質になるまで精製され得る。「実質的に均質な」、「実質的に均質な形態」、及び「実質的均質性」という語句は、正しく対合された産物が、望ましくないポリペプチドの組み合わせ（例えば、ホモ二量体または誤対合ヘテロ二量体）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。ＬＣＣＡ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｌ２）の文脈において、正しく対合された産物は、Ｈ１及びＬ１（Ｈ１Ｌ１）を含むヘテロ二量体である。ＬＣＣＡ設計セット（Ｈ２Ｌ１Ｌ２）の文脈において、正しく対合された産物は、Ｈ２及びＬ２（Ｈ２Ｌ２）を含むヘテロ二量体である。一実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の文脈において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２が発現される場合、正しく対合された産物は、正しく対合されたＨ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）を含むヘテロ二量体対である。いくつかの実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の文脈において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２が発現される場合、正しく対合された産物は、例えば、Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ１またはＨ１Ｌ２Ｈ２Ｌ２、または「ハーフ抗体」が生成される場合、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２などの、少なくとも１つのＦａｂ領域において正しい対合を示す追加産物を含み得る。純度によって表される場合に、一実施形態において、実質的均質性は、完全に誤対合の副産物の量が、混合物に存在する全ての種からの合計ＬＣ－ＭＳ強度の２０％を超えない、例えば、１０％を下回る、５％を下回る、１％を下回る、または０．５％を下回ることを意味し、％は、質量分光分析からの結果を反映している。

【００６４】

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、及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及び機能は、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ，Ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｈａｐｔｅｒ １４（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８８）において概説されている。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「抗体」及び「免疫グロブリン」または「抗原結合ポリペプチド構築物」は、交換可能に使用される。「抗原結合ポリペプチド構築物」は、分析物（抗原）と特異的と結合する、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、及びミュー定常領域遺伝子、並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、及び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。

【００６６】

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つの免疫グロブリン「軽」鎖（約２５ｋＤ）及び１つの免疫グロブリン「重」鎖（約５０～７０ｋＤ）を有する。このタイプの免疫グロブリンまたは抗体構造単位は、「天然に生じる」と考えられる。「軽鎖」という用語には、完全長の軽鎖及び結合特異性を与えるために十分な可変ドメイン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、及び定常領域ドメイン、ＣＬを含む。軽鎖の可変ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。軽鎖は、カッパ鎖及びラムダ鎖を含む。「重鎖」という用語

には、完全長の重鎖及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、可変ドメイン、ＶＨ、並びに３つの定常ドメインＣＨ１、ＣＨ２、及び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、及びＩｇＧ４サブタイプが含まれる）、ＩｇＡ（ＩｇＡ１及びＩｇＡ２サブタイプが含まれる）、ＩｇＭ、ＩｇＤ及び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及び／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及び軽鎖（ＶＬ）において約１００～１１０のアミノ末端アミノ酸を含む。

【００６７】

「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」は、抗原結合特異性及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、軽鎖及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、及び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及び１９９１））の定義に従っている。

【００６８】

「多重特異性抗原結合ポリペプチド構築物」または「多重特異性抗体」は、１つを超える異なる抗原またはエピトープを標的とするかまたはそれらと結合するものである。「二重特異性」、「デュアル特異性」、または「二機能性」抗原結合ポリペプチド構築物または抗体は、２つの異なる抗原またはエピトープを標的とするかまたはそれらと結合する多重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の一種である。一般に、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、２つの異なる抗原結合ドメインを有し得る。二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物または抗体の２つの抗原結合ドメインは、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。一実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、天然に生じる形態である。言い換えれば、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、天然に生じるＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、またはＩｇＥ抗体と同じ形態を有する。

【００６９】

抗体重鎖は、抗体軽鎖と対合し、互いに１つ以上の「接続部分」で相接するかまたは接触する。「接続部分」は、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」アミノ酸残基を含む。例えば、接続部分は、二量体化Ｆｃ領域の２つのＣＨ３ドメインの間、重鎖のＣＨ１ドメインと軽鎖のＣＬドメインの間、及び重鎖のＶＨドメインと軽鎖のＶＬドメインの間に存在する。「接続部分」は、ＩｇＧ抗体、例えば、ヒトＩｇＧ１抗体に由来し得る。

【００７０】

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

【００７１】

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のアミノ酸残基は、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔ ａｎｄ Ｗｕ，１９９１；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ－ＵＳ Ｄｅｐ

ａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｎｏ．９１－３２４２，ｐ ６４７（１９９１）に記載されるように）、ＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，ｅｔ ａｌ．．ＩＭＧＴ（登録商標），ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，３７，Ｄ１００６－Ｄ１０１２（２００９），ａｎｄ Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，ＩＭＧＴ，ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１１ Ｊｕｎ １；２０１１（６）に記載されるように）、１ＪＰＴ（Ｋａｔｊａ Ｆａｅｌｂｅｒ，Ｄａｎｉｅｌ Ｋｉｒｃｈｈｏｆｅｒ，Ｌｅｏｎａｒｄ Ｐｒｅｓｔａ，Ｒｏｂｅｒｔ Ｆ Ｋｅｌｌｅｙ，Ｙｖｅｓ Ａ Ｍｕｌｌｅｒ，Ｔｈｅ １．８５ Å ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｏｆ ｔｉｓｓｕｅ ｆａｃｔｏｒ ｉｎ ｃｏｍｐｌｅｘ ｗｉｔｈ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｆａｂ ｄ３ｈ４４ ａｎｄ ｏｆ ｆｒｅｅ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｆａｂ ｄ３ｈ４４：ｒｅｖｉｓｉｔｉｎｇ ｔｈｅ ｓｏｌｖａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｇｅｎ ｃｏｍｂｉｎｉｎｇ ｓｉｔｅｓ１，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ３１３，Ｉｓｓｕｅ １，Ｐａｇｅｓ ８３－９７，に記載されるように）及びＥＵ（ＥＵ抗体（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９６９，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ６３：７８－８５）の番号付けを参照するＫａｂａｔと同様のＥＵインデックスに従う）を含む、いくつかの慣習に従って番号付けしてもよい。Ｋａｂａｔ番号付けは、特に示されない限り、ＶＨ、ＣＨ１、ＣＬ、及びＶＬドメインに対して本明細書で使用される。ＥＵ番号付けは、特に示されない限り、ＣＨ３及びＣＨ２ドメイン、及びヒンジ領域に対して本明細書で使用される。表２２Ａは、ＩＭＧＴ、Ｋａｂａｔ、１ＪＰＴ、及びＥＵ番号付けシステムを用いて、ＩｇＧ１重鎖ポリペプチドにおいて選択された位置のアミノ酸番号付けを示す対応表を提供する。表２２Ｂは、ＩＭＧＴ及びＫａｂａｔ番号付けシステムを用いて、ラムダ軽鎖ポリペプチドにおいて選択された位置のアミノ酸番号付けを示す対応表を提供する。表２２Ｃは、ＩＭＧＴ、１ＪＰＴ、及びＫａｂａｔ番号付けシステムを用いて、カッパ軽鎖ポリペプチドにおいて選択された位置のアミノ酸番号付けを示す対応表を提供する。

【００７２】

抗原結合ポリペプチド構築物

本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物（すなわち、抗体）は、多重特異性または二重特異性であってもよい。多重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、第１のＦａｂ領域を形成する第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を有する少なくとも１つの第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）と、第２のＦａｂ領域を形成する免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を有する少なくとも１つの第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）を含み得、Ｈ１及びＨ２は互いに異なる。一実施形態において、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物は、第１のＦａｂ領域を形成する第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）及び免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）を有する第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）と、第２のＦａｂ領域を形成する免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）及び免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）を有する第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）を含み、Ｈ１及びＨ２は互いに異なる。一実施形態において、各ヘテロ二量体は、単一Ｆａｂ領域を含む。「Ｆａｂ領域」という用語は、本明細書で使用される場合、１つの免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列と１つの免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列の対合から得られる領域を指し、免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列のＶＨ及びＣＨ１ドメイン、及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列のＶＬ及びＣＬドメインからなる。いくつかの実施形態において、第１のＦａｂ領域は、第１の抗原と結合し、第２のＦａｂ領域は、第２の抗原と結合する。第１及び第２の抗原は、同じであってもよく、または異なってもよい。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のうちの１つ以上は、同時発現または共生成される場合に、正しく対合された重鎖

及び軽鎖の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含み得る。

【００７３】

抗原結合ポリペプチド構築物が二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物（すなわち、二重特異性抗体）である場合、「ヘテロ二量体対」と呼ぶこともできる。

【００７４】

説明のために、抗原結合ポリペプチド構築物の第１のヘテロ二量体は、Ｈ１Ｌ１と呼ばれ、免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ１）と対合された第１の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ１）を含み、第２のヘテロ二量体は、Ｈ２Ｌ２と呼ばれ、免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列（Ｌ２）と対合された第２の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（Ｈ２）を含む。しかしながら、この指定は任意であり、一方のヘテロ二量体が免疫グロブリンカッパ軽鎖を含み、他方が免疫グロブリンラムダ軽鎖を含むことのみを指定することを意味すると理解すべきである。第１のヘテロ二量体、Ｈ１Ｌ１のＦａｂ領域は、「ラムダＦａｂ」とも本明細書で呼ばれ得るが；一方で、第２のヘテロ二量体、Ｈ２Ｌ２のＦａｂ領域は、「カッパＦａｂ」とも本明細書で呼ばれ得る。

【００７５】

親抗体

各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列（「重鎖」とも呼ばれる）及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列（「軽鎖」とも呼ばれる）は、１つ以上の親抗体から得ることができ、少なくとも１つの親抗体は、カッパ軽鎖を含み、少なくとも１つの他の親抗体は、ラムダ軽鎖を含み、優先的対合を促進するアミノ酸修飾は、これらの重鎖及び軽鎖に遺伝子操作される。優先的対合を促進するアミノ酸修飾が欠如している親の免疫グロブリン重鎖配列及び免疫グロブリン軽鎖配列は、野生型の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列、野生型の免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列、及び野生型の免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列と呼ばれる。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物のヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は、２つの親抗体から得られる。一般に、２つの親抗体は互いに異なる；しかしながら、これは必ずしも常にそうである必要はない。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物であり、各ヘテロ二量体は、異なる親抗体から得られる。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物であり、両方の親抗体は、同じ抗原と結合するが、同じ抗原上の異なるエピトープを標的にする。一実施形態において、少なくとも１つの親抗体は、単一特異性であり、すなわち、ただ１つのエピトープと結合し得る。別の実施形態において、少なくとも１つの親抗体は、１つを超えるエピトープと結合し得る。

【００７６】

抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は対合して、それから得られた親抗体と同じ抗原と特異的に結合するＦａｂ領域を形成する。例えば、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物が、親抗体である（ラムダ軽鎖を含有し、ＩＬ－１７Ａと結合する）ＣＡＴ－２２００及び（カッパ軽鎖を含有し、組織因子と結合する）Ｄ３Ｈ４４に基づいて調製された場合、１つのヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は対合して、ＩＬ－１７Ａと結合するＦａｂ領域を形成し、第２のヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は対合して、組織因子と結合するＦａｂ領域を形成する。

【００７７】

親抗体は、これらに限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、またはラクダを含む種から得ることができる。一実施形態において、親抗体は、ヒトまたはマウスから得ることができる。

【００７８】

親抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５－４９７，１９７５）により記載されるものなどの標準モノクローナル抗体産生プロトコルを用いてハイブリドーマから調製されるものも含まれ得る。

【００７９】

特定の標的と結合する抗体は、ファージディスプレイ、インビトロディスプレイ、及び他の方法を含む、多くの異なる戦略によって同定されてもよい。これらの戦略により、ｓｃＦｖ形態、Ｆａｂ形態または完全長のＩｇＧ形態である形態が得られる。これらの戦略の概説は、Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．Ｓｔｒｏｈｌ ａｎｄ Ｌｉｌａ Ｍ．Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ｓｅｒｉｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｎｏ １１，ＩＳＢＮ １９０７５６８３７９，Ｏｃｔ ２０１２によるＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇの第４章に見られる。一実施形態において、親抗体には、ファージディスプレイまたはインビトロディスプレイにより同定される抗体が含まれる。Ｆａｂまたは全長ＩｇＧ形態以外の形態で同定された抗体は、当該技術分野で公知のものと同じものに変換することができる。ｓｃＦｖｓをＦａｂに変換する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Ｓｔｅｉｎｗａｎｄ ｅｔ ａｌ．Ｍａｂｓ ６：２０４－２１８，またはＺｕｂｅｒｂｕｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ ＆ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ２２：１６９－１７４を参照されたい）。一実施形態において、抗体は、ｓｃＦｖとして元々同定されたが、ｓｃＦｖがＦａｂ形態に変換され、従来または天然に生じる抗体の形態に遺伝子操作されている場合にも、親抗体として使用してもよい。

【００８０】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は、ヒト化抗体である親抗体から得ることができる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス由来の抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒト抗体のＣＤＲに置換することによって得ることができる。ＣＤＲを同定するための方法は、当該技術分野で公知である（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（１９８７），Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３４２：８７７）。また、この目的に適している一般的な遺伝子組換え技術も公知である（欧州特許出願公開番号ＥＰ１２５０２３号公報、ＷＯ９６／０２５７６号公報を参照されたい）。例えば、マウス抗体のＣＤＲは、公知の方法により決定することができ、ＤＮＡは、ＣＤＲがヒト抗体のフレームワーク領域（ＦＲ）とライゲーションする抗体をコードするように調製することができ、その後、ヒト化抗体は、従来の発現ベクターを用いた系により産生することができる。このようなＤＮＡは、ＣＤＲ及びＦＲ領域の両方の末端にオーバーラップする部分を有するように設計された数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ＰＣＲによって合成することができる（ＷＯ９８／１３３８８号公報に記載の方法を参照されたい）。ＣＤＲを介して連結されたヒト抗体ＦＲは、ＣＤＲが適当な抗原結合部位を形成するように選択される。必要に応じて、再構成ヒト抗体のＣＤＲが適切な抗原結合ドメインを形成できるように、抗体可変領域のＦＲ中のアミノ酸を修飾してもよい（Ｓａｔｏ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（１９９３）５３：８５１－８５６）。ＦＲ中の修飾可能なアミノ酸残基には、抗原に直接、非共有結合により結合する部分（Ａｍｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８６）２３３：７４７－５３）、ＣＤＲ構造にある程度影響または作用する部分（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９８７）１９６：９０１－１７）及びＶＨ－ＶＬ相互作用に関連する部分（ＥＰ２３９４００号特許公報）が含まれる。

【００８１】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は、キメラ抗体である親抗体から得ることができる。キメラ抗体は、異なる動物に由来する配列を組み合わせることによって調製された抗体である。例えば、キメラ抗体は、マウス抗体由来の重鎖及び軽鎖可変ドメインをヒト抗体由来の重鎖及び軽鎖定常ドメインと組み合わせることによって生成することができる。キメラ抗体は、公知の方法によって調製することができる。このようなキメラ抗体を得るため、例えば、抗体可変ドメインをコードするＤＮＡを、ヒト抗体定常ドメインをコードする核酸でライゲーションしてもよく；得られたライゲーション産物は、発現ベクターに挿入することができ；構築物は、宿主細胞

中に導入して、キメラ抗体を生成することができる。

【００８２】

ヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖は、当該技術分野で公知の多くの親抗体から得ることができる。免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列と対合して、抗原と結合するＦａｂ領域を形成する免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列を含むという条件で、ほとんどの抗体は、親抗体として役割を果たし得る。一実施形態において、少なくとも１つの親抗体は、治療抗体、すなわち、疾患の治療に使用される抗体である。カッパ軽鎖と該抗体と結合する抗原を含む適切な治療抗体の非限定例は、以下の表Ａで同定される：

【００８３】

表Ａ：カッパ軽鎖を含む例示的な治療抗体

抗体	抗原
ABI793	CD40 リガンド
ABT-806	上皮成長因子受容体
AV-203	受容体チロシン-プロテインキナーゼ erbB-3
BTI-322	CD2
Bioanalytica 特許の抗 HSP90	熱ショックタンパク質 90 ホモログ
CTM01	ムチン 1
Centocor 特許の抗 GLP-1R	グルカゴン様ペプチド 1 受容体
Chugai AHM	骨髄間質抗原 2
DX-2930	カリクレイン
Genmab 特許の抗 CD20	B リンパ球抗原 CD20
HuMax-CD32b	Fc-ガンマ-RIIB（CD32b）
HuMax-IL8	インターロイキン 8
IMA-026	インターロイキン 13
IMMU-114	HLA-DR
Immunomedics hA19	CD19
Immunomedics 特許の抗 IGF-1R	インスリン様成長因子 1 受容体
MDX-1303	炭疽保護抗原
MDX-1401	CD30
MEDI0639	デルタ様リガンド 4
MEDI4893	黄色ブドウ球菌アルファ毒素
MGA271	B7-H3
MGAWN1	West Nile ウイルスのエンベロープタンパク質
MH166	インターロイキン 6
MT293	コラーゲン
Macrogenics 特許の抗 KID3	KID3
OPR-003	インターロイキン 6
Stem Centrx 特許の抗カドヘリン-1	カドヘリン-1
アバゴボマブ	癌抗原 125 に対する抗体
アビッズマブ	インテグリンアルファ-V
アブリルマブ	インテグリンアルファ 4 ベータ 7
アクトクスマブ	C.difficile 毒素 A
アダリムマブ	腫瘍壊死因子-アルファ
アデカツムマブ	上皮細胞付着分子
アデュカヌマブ	アミロイドベータ
afasevi クマブ	インターロイキン 17A、インターロイキン 17F

抗体	抗原
アレムツズマブ	CD52
アリロクマブ	プロタンパク質転換サブチリシン/ケキシン９型
アマツキシマブ	メソテリン
アニフロルマブ	インターフェロンアルファ受容体１
アンルキンズマブ	インターロイキン13
アスクリンバクマブ	アクチビン受容体様キナーゼ１
アテゾリズマブ	プログラム細胞死１リガンド１
アチヌマブ	ノゴ A
バシリキシマブ	インターロイキン-2受容体アルファ鎖
バビツキシマブ	ホスファチジルセリン
ベゲロマブ	CD26
ベンラリズマブ	インターロイキン５受容体サブユニットアルファ
ベルチリムマブ	ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド11
ベシレソマブ	CEA（癌胎児性抗原）関連抗原
ベズロトクスマブ	C.difficile毒素B
ビメキズマブ	インターロイキン17A、インターロイキン17F
ブレセルマブ	CD40
ブロソズマブ	スクレロスチン
ボコシズマブ	プロタンパク質転換サブチリシン/ケキシン９型
ブルダルマブ	インターロイキン17受容体アルファ
カナキヌマブ	インターロイキン1、ベータ
カルルマブ	単球走化性タンパク質-1
セツキシマブ	上皮成長因子受容体
クラザキズマブ	インターロイキン６
コドリツズマブ	グリピカン３
コナツムマブ	サイトカイン死受容体５
コンシズマブ	組織因子経路阻害剤
クレネズマブ	アミロイドベータ
デカツズマブ	CD40
ダクリズマブ	インターロイキン-2受容体アルファ鎖
ダロツズマブ	インスリン様成長因子１受容体
ダラツムマブ	CD38（ADPリボシルシクラーゼ1）
デクトレクマブ	インターロイキン13
デムシズマブ	デルタ様リガンド４
ジヌツキシマブ	GD2ガングリオシド
デュピルマブ	インターロイキン４受容体アルファ
デュルバルマブ	プログラム細胞死１リガンド１
エクロメキシマブ	GD3ガングリオシド
エファリズマブ	インテグリンÎ±L
エルデルマブ	インターフェロンガンマ誘導性タンパク質（IP-10）

抗体	抗原
エルゲムツマブ	受容体チロシン-プロテインキナーゼ erbB-3
エロツズマブ	SLAM ファミリーメンバー7
エルシリモマブ	インターロイキン6
エマクツズマブ	CSF-1 受容体
エミベツズマブ	cMet 受容体
エナバツズマブ	TWEAK 受容体
エノキズマブ	インターロイキン9
エノチクマブ	デルタ様リガンド4
エンシツキシマブ	ムチン 5AC
エタラシズマブ	インテグリンアルファ V ベータ 3
エトロリズマブ	インテグリンアルファ 4 ベータ 7
エビナクマブ	アンジオポエチン様タンパク質 3
ファルレツズマブ	葉酸受容体アルファ
ファシヌマブ	神経成長因子
フィバツズマブ	EphA3 受容体チロシンキナーゼ
フィクラツズマブ	肝細胞成長/散乱因子
フィジツムマブ	インスリン様成長因子 1 受容体
フランボツマブ	チロシナーゼ関連タンパク質 1
フレチクマブ	インターロイキン20
フォラルマブ	T 細胞表面糖タンパク質 CD3 イプシロン鎖
フォラビルマブ	狂犬病ウイルス糖タンパク質
フレソリムマブ	形質転換成長因子ベータ
フルラヌマブ	神経成長因子
ガニツマブ	インスリン様成長因子 1 受容体
ガンテネルマブ	アミロイドベータ
ゲボキズマブ	インターロイキン1、ベータ
ギレンツキシマブ	炭酸脱水酵素 IX
ゴリムマブ	腫瘍壊死因子-アルファ
イバリズマブ	CD4
イクルクマブ	FMS 様チロシンキナーゼ-1
イマルマブ	マクロファージ遊走阻害因子
イムガツズマブ	上皮成長因子受容体
インクラクマブ	P-セレクチン
インヅサツマブ	グアニル酸シクラーゼ C
イネビリズマブ	CD19
インフリキシマブ	腫瘍壊死因子-アルファ
インテツムマブ	インテグリンアルファ-V
イピリムマブ	細胞毒性 T リンパ球抗原 4
イサツキシマブ	CD38（ADP リボシルシクラーゼ 1）
イトリズマブ	CD6

抗体	抗原
イキセキズマブ	インターロイキン17A
ケリキシマブ	CD4
ラベツズマブ	癌胎児性抗原
ランドグロズマブ	ミオスタチン
レブリキズマブ	インターロイキン13
レマレソマブ	NCA-90顆粒球細胞抗原
レンジルマブ	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
リビビルマブ	B型肝炎ウイルス表面抗原
リゲリズマブ	免疫グロブリンE
リロトマブ	白血球抗原CD37
リリルマブ	KIR阻害受容体
ロデルシズマブ	プロタンパク質転換サブチリシン/ケキシン9型
ルカツムマブ	CD40
ルミリキシマブ	CD23低親和性IgE Fc受容体
ルムレツズマブ	受容体チロシン-プロテインキナーゼerbB-3
マルゲツキシマブ	ヒト上皮成長因子受容体2
マツズマブ	上皮成長因子受容体
メポリズマブ	インターロイキン5
メテリムマブ	形質転換成長因子ベータ1
ミラツズマブ	主要組織適合遺伝子複合体
モガムリズマブ	C-Cケモカイン受容体4型
モナリズマブ	NKG2A
モタビズマブ	呼吸器合胞体ウイルスFタンパク質
ナミルマブ	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
ナタリズマブ	インテグリンアルファ4
ネシツムマブ	上皮成長因子受容体
ネモリズマブ	インターロイキン31受容体サブユニットアルファ
ネスバクマブ	アンジオポエチン2
ニモツズマブ	上皮成長因子受容体
ニボルマブ	プログラム細胞死1
オビヌツズマブ	Bリンパ球抗原CD20
オカラツズマブ	Bリンパ球抗原CD20
オクレリズマブ	Bリンパ球抗原CD20
オファツムマブ	Bリンパ球抗原CD20
オララツマブ	血小板由来成長因子受容体アルファサブユニット
オロキズマブ	インターロイキン6
オマリズマブ	免疫グロブリンE
オンツキシズマブ	エンドシアリン
オピシヌマブ	LRR及びIgドメイン「含有ノゴ受容体」相互作用タンパク質
オレゴボマブ	癌抗原125

抗体	抗原
オキセルマブ	OX40リガンド
オザネズマブ	ノゴ-A
バギバキシマブ	表皮ブドウ球菌リボテイコ酸
パリビズマブ	呼吸器合胞体ウイルスＦタンパク質
バムレブルマブ	結合組織成長因子
バニツムマブ	上皮成長因子受容体
パノバクマブ	緑膿菌血清型IATSO11
バルサツズマブ	上皮成長因子ドメイン様7
パスコリズマブ	インターロイキン4
バテクリズマブ	リンホトキシンアルファ
パトリツマブ	受容体チロシン-プロテインキナーゼerbB-3
ペムブロリズマブ	プログラム細胞死1
ペラキズマブ	インターロイキン17A
ペルツズマブ	ヒト上皮成長因子受容体2
ピディリズマブ	プログラム細胞死1
ブロザリズマブ	C-Cケモカイン受容体2型
ボネズマブ	アミロイドベータ
ブリトキサキシマブ	志賀毒素（E.coli）
ブリツムマブ	ビメンチン
キリズマブ	免疫グロブリンＥM1プライム
ラコツモマブ	ガングリオシドGM3
ラルパンシズマブ	プロタンパク質転換サブチリシン/ケキシン9型
ラムシルマブ	VEGFR-2キナーゼ挿入ドメイン受容体
リロツムマブ	肝細胞成長/散乱因子
リヌクマブ	血小板由来成長因子受容体ベータ
ラサンキズマブ	インターロイキン23 p19
リツキシマブ	Ｂリンパ球抗原CD20
ロバツムマブ	インスリン様成長因子1受容体
ロレデュマブ	Rh血液型、Ｄ抗原
ロモソズマブ	スクレロスチン
ロンタリズマブ	インターフェロンアルファ
ロバルピツズマブ	DLL3
ルプリズマブ	CD40リガンド
サマリズマブ	CD200
サリルマブ	インターロイキン6受容体
セクキヌマブ	インターロイキン17A
セトキサキシマブ	志賀毒素（E.coli）
シファリムマブ	インターフェロンアルファ
シルツキシマブ	インターロイキン6
シムツズマブ	リシルオキシダーゼ様2

抗体	抗原
シルクマブ	インターロイキン6
ソフィツズマブ	癌抗原 125
ソラネズマブ	アミロイドベータ
ソンツズマブ	ムチン1
スビズマブ	HIV-1 エンベロープ糖タンパク質 gp120 第３可変ループ V3
タバルマブ	B 細胞活性化因子
タリズマブ	免疫グロブリンE
タネズマブ	神経成長因子
タレクスツマブ	ノッチ 2、ノッチ 3
テフィバズマブ	黄色ブドウ球菌クランピング因子 A
タネツモマブ	テネイシンC
テプリズマブ	T 細胞表面糖タンパク質 CD3 イプシロン鎖
テプロツムマブ	インスリン様成長因子 1 受容体
チガツズマブ	サイトカイン死受容体 5
チルドラキズマブ	インターロイキン 23 p19
トシリズマブ	インターロイキン-6 受容体
トラリズマブ	CD40 リガンド
トベツマブ	血小板由来成長因子受容体アルファサブユニット
トラスツズマブ	ヒト上皮成長因子受容体 2
トレガリズマブ	CD4
トレメリムマブ	細胞毒性 T リンパ球抗原 4
トレボグルマブ	ミオスタチン
ウブリツキシマブ	B リンパ球抗原 CD20
ウロクプルマブ	ケモカイン受容体 CXCR4
ウレルマブ	4-1BB リガンド受容体
ウルトキサズマブ	Escherichia coli 志賀様毒素 II B サブユニット
バパリキシマブ	血管接着タンパク質 VAP-1
バルリルマブ	CD27
バテリズマブ	インテグリンアルファ 2 ベータ 1
ベドリズマブ	インテグリンアルファ 4 ベータ 7
ベルツズマブ	B リンパ球抗原 CD20
ベセンクマブ	ニューロピリン-1
ビシリズマブ	CD3 T 細胞補助受容体
ボルセツズマブ	CD70
ザルツムマブ	上皮成長因子受容体
ザノリムマブ	CD4
ザッキシマブ	上皮成長因子受容体

【００８４】

ラムダ軽鎖と該抗体と結合する抗原を含む適切な治療抗体の非限定例は、以下の表Ｂで同定される：

【００８５】

表Ｂ：ラムダ軽鎖を含む例示的な治療抗体

抗体	抗原
アベルマブ	プログラム細胞死１リガンド１
ベリムマブ	Ｂ細胞活性化因子
ビマグルマブ	アクチビン受容体ＭＢ
ブリアキヌマブ	インターロイキン１２
ブロンチクツズマブ	ノッチ１
シキスツムマブ	インスリン様成長因子１受容体
ドロジツマブ	サイトカイン死受容体５
エボロクマブ	プロタンパク質転換サブチリシン/ケキシン９型
エクスビビルマブ	肝炎Ｂウイルス表面抗原
フェザキヌマブ	インターロイキン２２
ガリキシマブ	ＣＤ８０
グセルクマブ	インターロイキン２３ｐ１９
レキサツムマブ	サイトカイン死受容体５
マパツムマブ	ＴＲＡＩＬ受容体-１
マブリリムマブ	顆粒球-マクロファージコロニー-刺激因子受容体サブユニットアルファ
ナルナツマブ	Ｒｏｎ受容体
オルチクマブ	Ｏｘｉｄｉｚｅｄ ＬＤＬ
オテリキシズマブ	ＣＤ３ Ｔ細胞補助受容体
ラフィビルマブ	狂犬病ウイルス糖タンパク質
ラキシバクマブ	炭疽保護抗原
セリバンツマブ	受容体チロシン-プロテインキナーゼ ｅｒｂＢ-３
テシドルマブ	補体成分５
テゼペルマブ	胸腺間質リンホポエチン
トラロキヌマブ	インターロイキン１３
バンチクツマブ	フリッツルド受容体

【００８６】

免疫グロブリンサブクラス

親抗体の免疫グロブリン重鎖は、以下のクラス：ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の範囲内である。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の第１及び第２のヘテロ二量体は、ＩｇＧ重鎖を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の第１及び第２のヘテロ二量体は、ＩｇＧ１重鎖を含む。親抗体の免疫グロブリン軽鎖は、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖のいずれかである。

【００８７】

本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列を有する少なくとも１つのヘテロ二量体、及び免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列を有する少なくとも別のヘテロ二量体を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ＩｇＧ重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリンカッパ軽鎖ポリペプチド配列を有する１つのヘテロ二量体、及びＩｇＧ重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリンラムダ軽鎖ポリペプチド配列を有する別のヘテロ二量体を含む。

【００８８】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ＶＨドメイン生殖細胞系列グループＩＧＨＶ１、ＩＧＨＶ２、ＩＧＨＶ３、ＩＧＨＶ４、ＩＧＨＶ５、ＩＧＨＶ６、またはＩＧＨＶ７から選択されたＶＨドメインをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。一実

施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＨＶ３からのＶＨドメインをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｊセグメント生殖細胞系列遺伝子ＩＧＨＪ１、ＩＧＨＪ２、ＩＧＨＪ３、ＩＧＨＪ４、ＩＧＨＪ５、またはＩＧＨＪ６から選択されたＪセグメントをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＨＪ４からのＪセグメントをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ＣＨ１ドメイン生殖細胞系列サブグループＩＧＨＧ１、ＩＧＨＧ２、ＩＧＨＧ３、またはＩＧＨＧ４から選択されたＣＨ１ドメインをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＨＧ１からのＣＨ１ドメインをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。

【００８９】

ラムダ軽鎖ポリペプチド配列を含むヘテロ二量体では、ラムダ軽鎖は、生殖細胞系列遺伝子ＩＧＬＣ１、ＩＧＬＣ２、ＩＧＬＣ３、ＩＧＬＣ６、またはＩＧＬＣ７から選択されたＣＬ－ラムダドメインを含み得る。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＬＣ２からのＣＬ－ラムダドメインを含むラムダ軽鎖を有するヘテロ二量体を含む。ラムダ軽鎖は、生殖細胞系列サブグループＩＧＬＶ１、ＩＧＬＶ２、ＩＧＬＶ３、ＩＧＬＶ４、ＩＧＬＶ５、ＩＧＬＶ６、ＩＧＬＶ７、ＩＧＬＶ８、ＩＧＬＶ９、ＩＧＬＶ１０、またはＩＧＬＶ１１から選択されたＶＬ－ラムダドメインを含み得る。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＬＶ６からのＶＬ－ラムダドメインを有するラムダ軽鎖をもつヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｊセグメント生殖細胞系列遺伝子ＩＧＬＪ１、ＩＧＬＪ２、ＩＧＬＪ３、ＩＧＬＪ６、またはＩＧＬＪ７から選択されたラムダＪセグメントをもつラムダ軽鎖を有するヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＬＪ２からのラムダＪセグメントをもつ重鎖を有するヘテロ二量体を含む。

【００９０】

カッパ軽鎖ポリペプチド配列を含むヘテロ二量体では、カッパ軽鎖は、ＣＬ生殖細胞系列対立遺伝子ＩＧＫＣ＊０１、ＩＧＫＣ＊０２、ＩＧＫＣ＊０３、ＩＧＫＣ＊０４、またはＩＧＫＣ＊０５から選択されたＣＬ－カッパドメインを含み得る。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＫＣ＊０１からのＣＬ－カッパドメインを含むカッパ軽鎖を有するヘテロ二量体を含む。カッパ軽鎖は、生殖細胞系列サブグループＩＧＫＶ１、ＩＧＫＶ１Ｄ、ＩＧＫＶ２、ＩＧＫＶ３、ＩＧＫＶ４、ＩＧＫＶ５、またはＩＧＫＶ６から選択されたＶＬ－カッパドメインを含み得る。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＫＶ１からのＶＬ－カッパドメインを有するカッパ軽鎖をもつヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｊセグメント生殖細胞系列遺伝子ＩＧＫＪ１、ＩＧＫＪ２、ＩＧＫＪ３、ＩＧＫＪ４、またはＩＧＫＪ５から選択されたＪセグメントをもつカッパ軽鎖を有するヘテロ二量体を含む。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、生殖細胞系列サブグループＩＧＫＪ１またはＩＧＫＪ２からのＪセグメントをもつカッパ軽鎖を有するヘテロ二量体を含む。

【００９１】

免疫グロブリン重鎖は、典型的には、少なくとも１つの可変（ＶＨ）ドメイン、及び３つの定常ドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体の各重鎖は、ＶＨドメイン、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、及びＣＨ３ドメインを含む。別の実施形態において、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体の各重鎖は、ＶＨドメイン、ＣＨ１ドメイン、及びＣＨ３ドメインを含む。さらに別の実施形態において、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体の各重鎖は、ＶＨドメイン及びＣＨ１ドメインを含む。免疫グロブリン軽鎖は、典型的には、１つの可変（ＶＬ）ドメイン及び１つの定常（ＣＬ）ドメイン

を含む。一実施形態において、各ヘテロ二量体の軽鎖は、ＶＬドメイン及びＣＬドメインを含む。

【００９２】

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ポリペプチド配列及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列は、公知の治療抗体、または様々な標的分子または癌抗原と結合する抗体から得ることができる。多くのこのような分子のアミノ酸及びヌクレオチド配列は、容易に入手可能である（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＪ３０８０８７．１（ヒト化抗ヒト組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４軽鎖可変領域及びＣＬドメイン）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＪ３０８０８６．１（ヒト化抗ヒト組織因子抗体Ｄ３Ｈ４４重鎖可変領域及びＣＨ１ドメイン）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＨＣ３５９０２５．１（ペルツズマブＦａｂ軽鎖遺伝子モジュール）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＨＣ３５９０２４．１（ペルツズマブＦａｂ重鎖遺伝子モジュール）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＧＭ６８５４６５．１（抗体トラスツズマブ（＝ハーセプチン）－野生型；軽鎖）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＧＭ６８５４６３．１（抗体トラスツズマブ（＝ハーセプチン）－野生型；重鎖）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＧＭ６８５４６６．１（抗体トラスツズマブ（＝ハーセプチン）－ＧＣ－最適化軽鎖）；及びＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＧＭ６８５４６４．１（抗体トラスツズマブ（＝ハーセプチン）－ＧＣ－最適化重鎖を参照されたい。上述のポリペプチドの各々の配列は、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、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。セツキシマブのアミノ酸及びヌクレオチド配列も当該技術分野で公知であり、例えば、Ｃａｎａｄｉａｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ａｌｂｅｒｔａ Ｉｎｎｏｖａｔｅｓ－Ｈｅａｌｔｈ ＳｏｌｕｔｉｏｎｓによりサポートされるＤｒｕｇ Ｂａｎｋウェブサイト、並びにＴｈｅ Ｍｅｔａｂｏｌｏｍｉｃｓ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｒｅ（ＴＭＩＣ）、受託番号ＤＢ００００２を参照されたい。

【００９３】

優先的対合を促進するアミノ酸修飾

重鎖及び軽鎖Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、親抗体の重鎖及び軽鎖に遺伝子操作される重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。一実施形態において、重鎖及び軽鎖Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの２つは、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。一実施形態において、重鎖及び軽鎖Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの３つは、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。

【００９４】

いくつかの実施形態において、修飾されるアミノ酸位置がＨ１とＨ２、及びＬ１とＬ２で異なるように、アミノ酸修飾は、非対称であってもよい。

【００９５】

一実施形態において、Ｈ２及びＬ２は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含むが、Ｈ１及びＬ１は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、及びＨ２は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含むが、Ｌ２は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、及びＬ２は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含むが、Ｌ１は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｌ１、Ｈ２及びＬ２は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含むが、Ｈ１は、重鎖と軽鎖の間の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。

【００９６】

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。Ｈ１またはＨ２がＬ１及びＬ２と同時発現される場合、またはＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２が同時発現される場合、アミノ酸修飾は、Ｌ１とＨ１の優先的対合、及びＬ２とＨ２の優先的対合を促進する。上述のように、説明のために、抗原結合ポリペプチド構築物のヘテ

ロ二量体は、以下のように同定されるであろう：Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、ラムダ軽鎖Ｌ１を含み、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、カッパ軽鎖Ｌ２を含む。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「Ｍａｂ設計」または「Ｍａｂ設計セット」は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２の１つのセット中に存在し、Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２としても同定される優先的対合を促進するアミノ酸修飾の特異的集合を指す。優先的対合を促進するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾は、Ｍａｂ設計またはＭａｂ設計セット（すなわち、Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）と呼ばれ、かつそれとして提示される。Ｍａｂ設計セットをＬＣＣＡ設計セット（すなわち、Ｈ１Ｌ１Ｌ２またはＨ２Ｌ１Ｌ２）としてまず試験し、Ｈ１及びＨ２がＬ１及びＬ２と独立して同時発現される場合の対合特異性の強度を決定する。

【００９８】

一実施形態において、アミノ酸修飾は、軽鎖と重鎖の間の接続部分の一部である１つ以上のアミノ酸に施すことができる。一実施形態において、免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列に導入されるアミノ酸修飾は、互いに相補的である。重鎖及び軽鎖の接続部分での相補性は、立体的及び疎水性接触、静電気的／荷電相互作用、またはこれら及び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、ノブ・イントゥ・ホール、突出部と空洞、ドナーとアクセプターなどに関して文献に幅広く記載され、全ては、２つの相互作用する表面間の、構造的及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、接続部分で軽鎖及び重鎖にわたって新しい水素結合を導入する免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖中に導入されたアミノ酸修飾を含む。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、接続部分で軽鎖及び重鎖にわたって新しい塩橋を導入する免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖中に導入されたアミノ酸修飾を含む。

【００９９】

一実施形態において、Ｍａｂ設計セットのアミノ酸修飾は、主に静電引力及び反発を介して優先的対合を促進する。一実施形態において、Ｍａｂ設計セットのアミノ酸修飾は、主に立体機構を介して優先的対合を促進する。このようなＭａｂ設計は、表４Ａ、４Ｂ、７Ａ及び７Ｂに含まれ、その中には、固有の識別子１０７７１－１１３３５、１０７７１－１１３６０、１０７８０－１１４１７を有するものを含む例が選択される。一実施形態において、Ｍａｂ設計セットのアミノ酸修飾は、立体機構及び静電機構の両方を用いて優先的対合を促進する。

【０１００】

一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｈ１及びＬ１は、優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まず、Ｈ２及びＬ２の各々は、優先的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｈ１、Ｌ１、及びＨ２のうちの１つ以上は、優先的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｌ２は、優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｈ１、Ｌ１、及びＬ２のうちの１つ以上は、優先的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ２は、優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｈ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、優先的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、優先的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、アミノ酸修飾を含み、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２の各々は、優先

的対合を促進する少なくとも１つのアミノ酸修飾を含む。

【０１０１】

アミノ酸修飾は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上の定常ドメイン及び／または可変ドメイン中であってもよい。一実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｈ１及びＨ２のＣＨ１ドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパドメイン中であってもよい。別の実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｈ１及びＨ２のＣＨ１及びＶＨドメイン、Ｌ１のＣＬ－ラムダ及びＶＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＣＬ－カッパ及びＶＬ－カッパドメイン中であってもよい。別の実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｈ１及びＨ２のＶＨドメイン、Ｌ１のＶＬ－ラムダドメイン、及びＬ２のＶＬ－カッパドメイン中であってもよい。

【０１０２】

一実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上のフレームワーク領域中であってもよい。一実施形態において、アミノ酸修飾は、残基のＫａｂａｔ番号付けにより示されるように、可変（ＶＨ、ＶＬ）及び定常（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、及び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。

【０１０３】

各Ｍａｂ設計またはＭａｂ設計セットにおけるアミノ酸修飾の数は変化し得る。一実施形態において、Ｈ１は、０～８のアミノ酸修飾、０～７のアミノ酸修飾、０～６のアミノ酸修飾、０～５のアミノ酸修飾、０～４のアミノ酸修飾、０～３のアミノ酸修飾、０～２のアミノ酸修飾、１のアミノ酸修飾を含む、またはアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｌ１は、０～８のアミノ酸修飾、０～７のアミノ酸修飾、０～６のアミノ酸修飾、０～５のアミノ酸修飾、０～４のアミノ酸修飾、０～３のアミノ酸修飾、０～２のアミノ酸修飾、１のアミノ酸修飾を含む、またはアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｈ２は、０～８のアミノ酸修飾、０～７のアミノ酸修飾、０～６のアミノ酸修飾、０～５のアミノ酸修飾、０～４のアミノ酸修飾、０～３のアミノ酸修飾、０～２のアミノ酸修飾、１のアミノ酸修飾を含む、またはアミノ酸修飾を含まない。一実施形態において、Ｌ２は、０～８のアミノ酸修飾、０～７のアミノ酸修飾、０～６のアミノ酸修飾、０～５のアミノ酸修飾、０～４のアミノ酸修飾、０～３のアミノ酸修飾、０～２のアミノ酸修飾、１のアミノ酸修飾を含む、またはアミノ酸修飾を含まない。

【０１０４】

一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２中のアミノ酸修飾の合計数は、２０未満、１５未満、１２未満、１１未満、１０未満、９未満、８未満、７未満、６未満、５未満、４未満、または３未満である。一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２中のアミノ酸修飾の合計数は、２である。

【０１０５】

一実施形態において、アミノ酸修飾は、特に、カッパ－ラムダ系用に設計することができ、ここで、１つの親抗体は、カッパ軽鎖ポリペプチド配列を含み、１つの親抗体は、ラムダ軽鎖ポリペプチド配列を含む。このようなアミノ酸修飾または設計は、Ｋ－Ｌ設計と本明細書で呼ばれる。このようなアミノ酸修飾またはＫ－Ｌ設計の例を表４Ａ、表７Ａ、及び表１０－Ａ１～１０－Ａ１２に示す。

【０１０６】

別の実施形態において、アミノ酸修飾は、カッパ－カッパ系（Ｋ－Ｋ設計）に対して最初に同定することができ、ここで、両方の親抗体は、カッパ軽鎖ポリペプチド配列を含み、その後、カッパ－ラムダ系に移植することができる。当業者は、これらの設計をカッパ－ラムダ系にどのように移植することができることが分かるであろう。例えば、カッパ及びラムダ親抗体の重鎖及び軽鎖を整列させて、Ｋ－Ｋ設計に対応する等価のラムダ軽鎖位置を決定することができる。その後、等価のラムダ軽鎖位置をＫ－Ｋ設計に準拠するよう

に修飾することができる。このようなアミノ酸修飾または設計は、Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計と本明細書で呼ばれ、以下のグループ：ａ）設計を変化させる必要がなく、かつ、カッパ－カッパ系におけるアミノ酸残基修飾が、カッパ－ラムダ系における修飾と同一であるグループ；ｂ）サイレント修飾を含有し、カッパ－カッパ系でなされた少なくとも１つの修飾が、ラムダ軽鎖ポリペプチド配列中に修飾が天然に存在するため、カッパ－ラムダ系で不要であるグループ；ｃ）カッパ軽鎖ポリペプチド配列及びラムダ軽鎖ポリペプチド配列において同じ相対位置で少なくとも１つのアミノ酸残基にアミノ酸修飾を含有するが、その位置での最初のアミノ酸残基がカッパ及びラムダ軽鎖ポリペプチド配列の間で異なり、その位置で同じアミノ酸修飾をもたらすグループ、及びｄ）カッパ－カッパ系と比較してカッパ－ラムダ系において少なくとも１つの追加アミノ酸修飾を含有するグループに分類することができる。このようなＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の例を表４Ｂ、表７Ｂ、及び表１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０に提供する。グループａ）の具体例は、表４Ｂのアスタリスクによってマーキングされる。グループｂ）の具体例は、固有の識別子１０６８９－１０７０７をもつＭａｂ設計セットによって示される。サイレント修飾は、Ｌ１中である（１６０位での残基がＥでありＱではないため、Ｑ１６０Ｅは、ラムダにおける野生型に不在である）。グループｃ）の具体例は、固有の識別子１０６５２－１０７３４をもつＭａｂ設計セットによって示され、Ｌ１では、アミノ酸残基１２４は、野生型のラムダにおけるＥ、及び野生型のカッパにおけるＱである。グループｄ）の具体例は、アミノ酸修飾Ｋ１２９Ｔを含む、固有の識別子１０６８４－１０７０６をもつＭａｂ設計セットによって示される。

【０１０７】

一実施形態において、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、かつ、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含み、アミノ酸修飾は、表４Ａ、表４Ｂ、表７Ａ、表７Ｂ、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２、及び表１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０に提供されるＭａｂ設計セットの保存的アミノ酸置換を含む。

【０１０８】

一実施形態において、アミノ酸修飾は、新しいシステイン残基を導入せず、同じ設計内の免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖における天然に生じるシステイン残基を除去しない。

【０１０９】

優先的対合を促進するＨ１、Ｌ１、Ｈ２及びＬ２におけるアミノ酸修飾の組み合わせは、設計として一般に呼ばれる。設計は、より具体的には、（Ｈ１、Ｌ１、Ｌ２またはＨ２、Ｌ１、Ｌ２の文脈において）「ＬＣＣＡ設計」または（Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、Ｌ２の文脈において）「Ｍａｂ設計」と呼ぶことができる。典型的には、ＬＣＣＡ設計は、所望の二重特異性抗体の各重鎖に基づいて、１つ以上の具体的な相補的ＬＣＣＡ設計で遺伝子操作されるため、典型的には、二重特異性抗体の４つ全てのポリペプチド鎖におけるアミノ酸修飾が同定される形態で提示される（例えば、表４Ａ及び４Ｂを参照）。具体的なアミノ酸置換がそれを通じて同定され得るが、各アミノ酸位置での保存的置換も考えられ得ることを理解すべきである。さらに、説明のために、特に指示されない限り、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、ラムダ軽鎖を含むヘテロ二量体を表し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、カッパ軽鎖を含むヘテロ二量体を表す。最終的に、全てのアミノ酸残基または位置は、特に指示されない限り、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従って番号付けされる。

【０１１０】

設計は、相補的優先的対合を促進するアミノ酸置換のドライバーセットを含み、二次置換も含み得る。二次置換は、ドライバーセットの性能を最適化するように作用し得る。

【０１１１】

１つ以上のドライバーセットを使用して、優先的対合を促進してもよい。これらのドライバーセットは、優先的対合を促進するために個別にまたは組み合わせて使用してもよい。一実施形態において、ドライバーセットは、静電引力及び反発が優先的対合を促進する主要因子であると考えられる静電ドライバーセットである。例えば、Ｈ１がアミノ酸置換

１８６Ｋを含み、Ｌ１がアミノ酸置換１３３Ｄを含み、Ｈ２がアミノ酸置換１８８Ｄを含み、Ｌ２がアミノ酸置換１３１Ｋを含む設計は、静電機構によって優先的対合を促進し得る。静電ドライバーの多くの他の例は、実施例を通じて見出される。一実施形態において、１つ以上の静電ドライバーセットは、表Ｃで同定されたものから選択してもよい：

【０１１２】

表C：例示的な静電ドライバーセット

静電ドライバー	H1	L1	H2	L2
1	L143D または L143D_Q179E	T131R/K	S188K または L124R_S186R	S176D_T178E または S176D_T180E または S131D
2	L143D または L143D_Q179E	T131R/K	L143R または S186K	Q124E_V133D または Q124E_V133D_T180D
3	L143D または L143D_Q179E	T131K/R	S186K または L124R_S186K	V133D または V133D_Q160E または Q124E_V133D または S176D_T180E
4	L143D または L143D_Q179E	T131K/R	S188K	S131D/E
5	L143D または L143D_Q179E	T131K/R	L143R/K	Q124E_V133D または Q124E_V133D_T180D
6	L143D または L143D_Q179E	T131K/R	L124R_S186R/K または L124R_Q179K または S188K	S176D_T178E または S176D_T180E または S131D/E
7	L143D または L143D_Q179E	T131K/R	L143R_S188K または L143K/R または L124R_L143K	Q124E_V133D_S176D_T178D/E または Q124E_V133D_T178E または Q124E_V133D_T180D または Q124E_S176D_T180E
8	S188K	S176E/D_Y178E または Y178E/D または S176D_Y178T	V177D_S188D	S176K_T178R/K
9	S188K	S176E/D_Y178E または Y178E/D または S176D_Y178T	S186E または L124E/L124E_Q179E	S176K/R または S131K/R_S176R/K
10	S186K	V133D	S188D	S131K
11	S186K	V133D	V177D_S188D	S176K_T178R/K
12	V177D_S188D	S176K_Y178K/R	S188K	S176E/D_T178E または S131D/E
13	V177D_S188D	S176K_Y178K/R	S186K/R	V133D または Q124E_Q160E_T180E
14	V177D_S188D	S176K_Y178K/R	L124R または L124R_Q179K または L124R_S186R	S176D または S176D_T178D S176D_T180E
15	V177D_S188D	S176K_Y178K/R	L143K/R	V133D または Q124E_V133D

16	S188E	Y178K	L124R または S188K(L143K または S186R または Q179K とも組み合わせる)	S176D/E_T178D/E または S176D/E_T180E または S176D または、Q124E または Q124E_V133D または Q124E_Q160E と組み合わせる
17	S186R または Q179K	S180E	L143E または L143E_Q179E	Q124R/K_T178R または Q124R_Q160R/K_T178R または Q124R_T129K_T178R または Q124R_T129K_Q160K_T178R
18	S186K	V133D	L143E または L143E_Q179E	Q124R/K_T178R または Q124R_Q160R/K_T178R または Q124R_T129K_T178R または Q124R_T129K_Q160K_T178R
19	L143K または L143K_V190K または L124K_L143K	V133D または T131E/D_V133D	L143E または L143E_Q179E	Q124R/K_T178R または Q124R_Q160R/K_T178R または Q124R_T129K_T178R または Q124R_T129K_Q160K_T178R
20	S188K	S176D/E_Y178E または Y178E/D	L143E または L143E_Q179E	Q124R/K_T178R または Q124R_Q160R/K_T178R または Q124R_T129K_T178R または Q124R_T129K_Q160K_T178R
21	Q179K または S186R または L143K または S188K	S180E または V133D または S176E_Y178E	L143E または L143E_Q179E	S131K または Q124R_T178R または Q124R_Q160K_T178R または T129K_S131K
22	Q179K または S186R	S180E	L143E または L143E_Q179E	S131K または Q124R_T178R または Q124R_Q160K_T178R
23	L143K_V190K	V133D	L124E	S131K_L135K
24	L143K または S186K または L124K_L143K	V133D または T131D/E_V133D	L124E_Q179E または L124E_S186E または L124E_K143E	S131K/R_S176R または S131R_L135K
25	L143E_Q179E	E124K_Y178R	S186R	T178E_T180E または Q160E_T180E
26	L143E	E124R	S186R または Q179K	Q124E_Q160E_T180E
27	S186R	S180E または Y178E_S180E	L143E 及び/または Q179E	Q124K_T178R または S131K
28	Q179K	S180E	L143E	Q124R または Q124R_Q160K_T178R
29	L124E	S176R	L124R	S176D

【０１１３】

一実施形態において、ドライバーセットは、ジスルフィドステアリングドライバーセットであり、これは、誤対合ヘテロ二量体におけるジスルフィド結合の形成に不利なように作用し得る。このタイプのドライバーセットの例としては、Ｈ１における１２５Ｒ、Ｌ１における１２２Ｄ、Ｈ２における２２８Ｄ、及びＬ２における１２１Ｋが挙げられるであろう。

【０１１４】

一実施形態において、ドライバーセットは、正しく対合されたヘテロ二量体の間の立体的に相補的な相互作用、及び誤対合ヘテロ二量体の間の立体的な非互換性を促進するよう

に作用し得る立体ドライバーセットであってもよい。立体ドライバーセットの非限定例を表Ｄに示し、ここで、「－」は、優先的対合を促進するアミノ酸置換が存在しないことを示す。

【０１１５】

表Ｄ：例示的な立体ドライバーセット

ドライバー	H1	L1	H2	L2
立体１	174G	116F_176F	190F	135A
立体２	139W	-	-	135W
立体３	- または 188A	- または 176A_178W	188W または 186I/L_188W	176V または 176A_178A
立体４	- または 143A	- または 133W	124W	133A

【０１１６】

一実施形態において、ドライバーセットは、可変設計ドライバーセットである。そのような可変設計ドライバーセットは、優先的対合を促進するカッパ及び／またはラムダＦａｂの可変ドメインにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を含む。一実施形態において、可変設計ドライバーセットは、立体機構に基づいて優先的対合を促進する。一実施形態において、可変設計ドライバーセットは、静電機構に基づいて優先的対合を促進する。可変設計ドライバーセットの非限定例を表Ｅに示し、ここで、「－」は、優先的対合を促進するポリペプチドにおいてアミノ酸置換が存在しないことを示す。

【０１１７】

表Ｅ：例示的な可変ドメインドライバーセット

ドライバー	H1	L1	H2	L2
可変ドメイン（立体）	45F	-	45A/P	44F
可変ドメイン（立体）	-	-	45A/P	44F
可変ドメイン（静電）	39K/R	38E/D	39E/D	38K/R
可変ドメイン（静電）	39E/D	38K/R	39K/R	38E/D
可変ドメイン（静電）	-	-	39E/D	38R/K

【０１１８】

一実施形態において、１つ以上の天然に生じないジスルフィド結合は、抗原結合ポリペプチド構築物の一方または双方のヘテロ二量体に遺伝子操作されてもよい。このタイプのアミノ酸修飾の一例は、重鎖が、カッパ軽鎖において１２４Ｃ置換と対合された１２２Ｃ置換を含むものである。

【０１１９】

二次置換は、設計の対合性能を最適化するために設計に含めてもよい。例えば、二次置換は、Ａ）重鎖と正しく対合された軽鎖の間の接点の数を最適化し、Ｂ）ドライバーに対して導電環境を提供するように作用し得、Ｃ）ドライバーセットに対する水素結合ネットワークを最適化し、またはＤ）ドライバーに対して立体適応をもたらす。これらの種の二次置換の非限定例を表Ｆに示し、ここで、「Ｌｋ」は、カッパ軽鎖特異的置換を指定し、「Ｌ１」は、ラムダ軽鎖特異的置換を指定し、「Ｌ」は、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかにおける軽鎖特異的置換を指定し、「Ｈ」は、重鎖特異的置換を指定する。

【０１２０】

表Ｆ：例示的な二次置換

A)接点の最適化	B)導電環境	C)水素結合ネットワーク最適化	D)立体適応
			LI/178F/T
			LI/178L
Lk/178F			
Lk/178L			
			L/133A
			L/133G
			H/143I
	H/146G		
			L/133I/L
			L/131S
		H/143T/S	H/143T/S
		Lk/178S	
		H/177T	
H/188T			
H/177I			
			L/135S
H/188L			
H/139I			
H/190I			
		L/133S/T	
	H/145T		
	LI/129T		
	LI/124Q		

【０１２１】

抗原結合ポリペプチド構築物は、上述のドライバーセット及び二次置換に対応するアミノ酸修飾の異なる組み合わせで遺伝子操作されてもよい。共通の特徴に基づいてクラスターにグループ化したそのような組み合わせの非限定的な具体例を以下に記載する。本明細書に記載される通り、一本鎖内の複数の位置でのアミノ酸修飾の組み合わせは、修飾された各位置の間に「＿」を用いて同定される。例えば、「１２４＿１８６」は、１２４位及び１８６位の両方が、言及されたポリペプチド鎖で修飾されることを示す。同様に、「１２４＿１３３＿１８０」は、１２４位、１３３位、及び１８０位の全てが、言及されたポリペプチド鎖で修飾されることを示す。

【０１２２】

Ｋ－Ｌクラスター１：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、

Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；及び

ａ）Ｈ２は、１８８または１２４＿１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８または１７６＿１８０または１３１位にアミノ酸置換を含み；または

ｂ）Ｈ２は、１４３または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４＿１３３または１２４＿１３３＿１８０位にアミノ酸置換を含む。

【０１２３】

いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５、１４５及び１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２、１２４、及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、２２８位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１２４】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５＿１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２４＿１３１位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、２２８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１３３位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１７９位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１２４、１４３、１８６、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ２は、１２４、１３１、１７６、１７８、及び１８０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１２５】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５＿１４３＿１４５、または１２５＿１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２４＿１３１、または１２２＿１２４＿１３１＿１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１８６＿２２８、１４３＿２２８、１４３＿１８６＿２２８、１８６＿２２８、または１８８＿２２８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１２４＿１３３、１２１＿１２４＿１３３＿１８０、１２１＿１３１＿１３３＿１７８、１２１＿１３３＿１７６＿１７８、または１２１＿１３３＿１７６＿１８０位にアミノ酸置換を含む。

【０１２６】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２５Ｒ、１４５Ｔ、１４３Ｄ、１４３Ｅ、１７９Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｑ、１２２Ｄ、１３１Ｋ、１３１Ｒ、１３３Ｓ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、２２８Ｄ、１２４Ｒ、１４３１、１４３Ｒ、１８６Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１２１Ｋ、１３１Ｄ、１７６Ｄ、１７８Ｅ、１７８Ｆ、１８０Ｄ、１８０Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｇ、１３３１、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１２７】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
125R_143D_145T	122D_124Q_131K_133S
125R_143E_145T_179E	122D_124Q_131R
125R_143E_145T_179E	122D_124Q_131K

【０１２８】
一実施形態において、Ｈ１は、１２５Ｒ＿１４３Ｅ＿１４５Ｔ＿１７９Ｅを含み、Ｌ１は、１２２Ｄ＿１２４Ｑ＿１３１Ｒを含む。別の実施形態において、Ｈ１は、１２５Ｒ＿１４３Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ１は、１２２Ｄ＿１２４Ｑ＿１３１Ｒを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
188K_228D	121K_133I_176D_178E
188K_228D	121K_131D_133G_178F
124R_186R_228D	121K_133G_176D_180E
124R_186R_228D	121K_133G_176D_180E
143R_228D	121K_124E_133D_180D
143R_228D	121K_124E_133D
143I_186K_228D	121K_124E_133D
186K_228D	121K_124E_133D

【０１２９】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１は、１２５Ｒ＿１４３Ｅ＿１４５Ｔ＿１７９Ｅを含み、Ｌ１は、１２２Ｄ＿１２４Ｑ＿１３１Ｒを含み、Ｈ２は、１８８Ｋ＿２２８Ｄを含み、Ｌ２は、１２１Ｋ＿１３３Ｉ＿１７６Ｄ＿１７８Ｅを含む。別の実施形態において、Ｈ１は、１２５Ｒ＿１４３Ｄ＿１４５Ｔを含み、Ｌ１は、１２２Ｄ＿１２４Ｑ＿１３１Ｒを含み、Ｈ２は、１４３Ｒ＿２２８Ｄを含み、Ｌ２は、１２１Ｋ＿１２４Ｅ＿１３３Ｄを含む。
【０１３０】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ジスルフィドステアリングドライバーセットを含む、Ｋ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０１３１】
一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター１のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０１３２】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ１の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０１３３】
Ｋ－Ｌクラスター２：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；及び
ｃ）Ｈ２は、１８６または１２４＿１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３または１３３＿１６０または１２４＿１３３または１７６＿１８０位にアミノ酸置換を含み；または
ｄ）Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含み；
ｅ）Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４＿１３３または１２４＿１３３＿１８０位にアミノ酸置換を含む；
【０１３４】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１３９、１４５、１７４、及び１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６、１２４、１３３及び１７６位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１９０、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３５、１７８、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０１３５】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３または１８６または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において

、Ｈ１は、１３９、１７４、及び１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６、１２４、１３３、及び１７６位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１２４、１９０、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ２は、１２４、１３１、１３５、１６０、１７６、１７８、１８０、３８、４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１３９＿１４３＿１４５、１４３＿１４５、１４３＿１４５＿１７４、または１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１１６＿１２４＿１３１＿１７６、１２４＿１３１、１２４＿１３１＿１３３、１２４＿１３１＿１３３＿１７６、１３１、または１３１＿１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１８６＿１９０、１４３、１４３＿１８６、１４３＿１８６＿１９０、１４３＿１９０、１８６、１８６＿１９０、１８８、３９＿１４３、または４５＿１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１３３、１２４＿１３３＿１３５、１２４＿１３３＿１３５＿１８０、１２４＿１３３＿１８０、１３１＿１３３＿１３５＿１７８、１３１＿１３３＿１７８、１３３、１３３＿１３５＿１７６＿１８０、１３３＿１６０、３８＿１２４＿１３３、または４４＿１２４＿１３３位にアミノ酸置換を含む。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１３９Ｗ、１４３Ｄ、１４５Ｔ、１７４Ｇ、１７９Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｑ、１７６Ｆ、１１６Ｆ、１３１Ｋ、１３１Ｒ、１３３Ｓ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１４３Ｉ、１４３Ｋ、１４３Ｒ、１８６Ｋ、１８８Ｋ、１９０Ｆ、３９Ｅ、４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１３１Ｄ、１３１Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｇ、１３５Ａ、１３５Ｗ、１６０Ｅ、１７６Ｄ、１７８Ｆ、１８０Ｄ、１８０Ｅ、３８Ｒ、４４Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１３８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
139W_143D_145T	124Q_131K_133S
139W_143D_145T	124Q_131R
143D_145T	124Q_131K
143D_145T	124Q_131K_133S
143D_145T	124Q_131R
143D_145T	131K
143D_145T	131K_133S
143D_145T_174G	116F_124Q_131R_176F
143D_145T_174G	124Q_131K_133S_176F
143D_145T_174G	116F_124Q_131K_176F
143D_145T_179E	124Q_131K
143D_145T_179E	124Q_131K_133S
143D_145T_179E	131K
143D_145T_179E	131K_133S

【０１３９】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
143I_186K	133D
143I_186K	133D_160E
143I_186K	124E_133D_135W
143I_186K_190F	124E_133D_135A
186K	124E_133D
186K	133D_160E
186K	133D
186K	124E_133D_135W
186K_190F	124E_133D_135A
124R_186K_190F	133G_135A_176D_180E
188K	131D_133G_135W_178F
188K	131D_133G_178F
188K	131E_133G_178F
143K/R	124E_133D
143R	124E_133D_135W_180D
143R	124E_133D_135W
143R	124E_133D_180D
143R_190F	124E_133D_135A
45P_143R	44F_124E_133D
39E_143R	38R_124E_133D

【０１４０】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
143D_145T	124Q_131R	188K	131D_133G_178F
143D_145T_174G	116F_124Q_131R_176F	143R_190F	124E_133D_135A
139W_143D_145T	124Q_131R	143R	124E_133D_135W
143D_145T	124Q_131R	143R	124E_133D_180D

【０１４１】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、立体１、立体２、可変ドメイン立体、または可変ドメイン静電ドライバーセットのうちの１つ以上を有する、Ｋ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１４２】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター２のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０１４３】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ２の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１４４】

Ｋ－Ｌクラスター３：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、

Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１位にアミノ酸置換を含み；及び

ａ）Ｈ２は、１２４＿１８６または１２４＿１７９または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８または１７６＿１８０または１３１位にアミノ酸置換を含み；または

ｂ）Ｈ２は、１４３＿１８８または１４３または１２４＿１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４＿１７６＿１７８または１２４＿１７８または１２４＿１８０また

は１２４＿１７６＿１８０、または１２４、または１２４＿１７６位にアミノ酸置換を含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１３９、１４５、１７４、及び１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６、１２４、及び１７６位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１７７、１９０、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３３、１３５、１７８、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１４６】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４＿１３１位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３、１２４、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１３９、１７４、及び１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６または１７６位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１７７、１７９、１８６、１９０、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２４、１３１、１３５、１８０、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさら含む。

【０１４７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１３９＿１４３＿１４５、１３９＿１４３＿１４５＿１７９、１４３＿１４５、１４３＿１４５＿１７４＿１７９、または１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１１６＿１２４＿１３１＿１７６、または１２４＿１３１位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１４３、１２４＿１７９、１２４＿１８６、１４３、１４３＿１８８、１７７＿１８８、１８８、１８８＿１９０、３９＿１２４＿１７９、または４５＿１２４＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１３３、１２４＿１３３＿１７６、１２４＿１３３＿１７６＿１７８、１２４＿１３３＿１７６＿１８０、１２４＿１３３＿１７８、１２４＿１３３＿１８０、１３１＿１３３＿１７８、１３３＿１３５＿１７６＿１７８、１３３＿１３５＿１７６＿１８０、１３３＿１７６＿１７８、１３３＿１７６＿１８０、１７６＿１７８、３８＿１３３＿１７６＿１８０、または４４＿１３３＿１７６＿１８０位にアミノ酸置換を含む。

【０１４８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１３９Ｗ、１７４Ｇ、１４５Ｔ、１４３Ｄ、１４３Ｅ、１７９Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１１６Ｆ、１２４Ｑ、１３１Ｋ、１３１Ｒ、１７６Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１４３Ｋ、１４３Ｒ、１７７Ｉ、１７９Ｋ、１８６Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、１９０Ｆ、３９Ｅ、４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１３５Ａ、１３５Ｗ、４４Ｆ、１２４Ｅ、３８Ｒ、１３１Ｄ、１３１Ｅ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１７８Ｄ、１７８Ｅ、１７８Ｆ、１８０Ｄ、１８０Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｇ、１３３Ｉ、１３３Ｌ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１４９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
139W_143D_145T	124Q_131R
139W_143E_145T_179E	124Q_131K
143D_145T	124Q_131R
143E_145T_179E	124Q_131R
143E_145T_174G_179E	116F_124Q_131R_176F

【０１５０】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
124R_179K	133G_176D_178E
124R_186K/R	133G_176D_180E
124R_186K/R	133G_135W_176D_180E
188K	131D_133G_178F
188K	131E_133G_178F
188K	176E_178E
188K	133I_135W_176D_178E
188K	133I_176D_178E
143R_188K	124E_133D_176D_178D
143R_188K	124E_133D_176D_178E
143R_188K	124E_133D_178E
143K/R	124E_133D
143K/R	124E_133D_180D
124R_143K	124E_133G_176D_180E
124R_143K	124E_133G_176D

【０１５１】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
143E_145T_179E	124Q_131K	124R_186K	133G_176D_178E
143E_145T_179E	124Q_131K	143K	124E_133D
143D_145T	124Q_131R	188K	176E_178E
143D_145T	124Q_131K	124R_186R	133G_176D_180E
139W_143D_145T	124Q_131R	124R_186K	133G_135W_176D_180E

【０１５２】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、立体１、立体２、可変ドメイン立体または可変ドメイン静電ドライバーセットのうちの１つ以上を有する、Ｋ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１５３】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター３のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０１５４】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ３の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１５５】

Ｋ－Ｌクラスター４：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６＿１７８または１７８位にアミノ酸置換を含み；及び
ａ）Ｈ２は、１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；または
ｂ）Ｈ２は、１８６または１２４または１２４＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６または１３１＿１７６位にアミノ酸置換を含む。

【０１５６】

いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５、１３９、及び１７７位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２、１２９、及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４５、２２８、４５、及び３９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３５、４４、３８、１２１、及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１５７】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８８または１８６＿１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０１５８】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４、１８６、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５、１３９、及び１７７位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２、１２９、１３３、及び１７６位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４５、２２８、４５、１７７、１７９、及び３９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３５、４４、３８、１２１、１３１、１７８、及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１２５＿１８８、１３９＿１８８、１８８、または１７７＿１８８にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または１２９＿１７６＿１７８、１２９＿１７８、１２２＿１２９＿１７６＿１７８、１７６＿１７８、または１３３＿１７６＿１７８にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４５＿１８６、１４５＿１８６＿２２８、１４５＿１７７＿１８８、１２４、１２４＿１４５＿１７９、１２４＿１４５＿１７９＿１８６＿１８８、１２４＿１４５＿１７９＿１８８、１２４＿１８６＿１８８、１２４＿１８８、４５＿１２４＿１４５＿１７９、３９＿１２４＿１４５＿１７９、または１８６＿１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、４４＿１３１＿１３３＿１７６、３８＿１３１＿１３３＿１７６、１２１＿１３１＿１７６、１３１＿１３５＿１７６、１３１＿１７６、１３１＿１３３＿１７６、１３１＿１３３＿１７６＿１７８、１７６、１７６＿１７８、１３３＿１７６、または１３３＿１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２５Ｒ、１３９Ｗ、１８８Ａ、１８８Ｋ、及び１７７Ｉ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１に

おけるアミノ酸置換は、１２９Ｔ、１２２Ｄ、１７６Ａ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１３３Ｉ、１３３Ｌ、１７８Ｄ、１７８Ｅ、１７８Ｔ、及び１７８Ｗ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１４５Ｔ、１７７Ｄ、１７９Ｅ、１８６Ｅ、１８６Ｉ、１８６Ｌ、１８８Ｄ、１８８Ｗ、２２８Ｄ、３９Ｅ、及び４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２１Ｋ、１３１Ｋ、１３１Ｒ、１３３Ａ、１３３Ｇ、１３５Ｗ、１７６Ａ、１７６Ｋ、１７６Ｒ、１７６Ｖ、１７８Ａ、１７８Ｋ、１７８Ｌ、１７８Ｒ、３８Ｒ、及び４４Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１６１】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
125R_188K	122D_129T_176D_178T
125R_188K	122D_129T_176E_178E
125R_188K	129T_176D_178T
125R_188K	129T_176E_178E
188K	129T_176D_178T
188K	129T_176E_178E
188K	129T_178D
188K	129T_178E
188K	176D_178E
188K	176E_178E
188K	133I_176D_Y178E
-	-
188A	176A_178W
177I_188K	133I_176D_178E
177I_188K	133I_176E_178E
177I_188K	133L_176D_178E

【０１６２】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
145T_186E	131K_135W_176K
145T_186E_228D	131K_176K
145T_186E_228D	121K_131K_176K
124E	133G_176R
124E	133A_176K
124E_186I_188W	133G_176R_178A
124E_188W	133A_176K_178A
124E_145T_179E	131K_133G_176R
124E_145T_179E	131R_133G_176R
124E_145T_179E_186I_188W	131R_133G_176R_178A
124E_145T_179E_188W	131K_133G_176R_178A
45P_L124E_145T_179E	44F_131R_133G_176R
39E_L124E_145T_179E	38R_131R_133G_176R

【０１６３】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下の１つである：

H1	L1	H2	L2
188K	176E_178E	124E_145T_179E	131R_133G_176R
125R_188K	122D_129T_176E_178E	145T_186E_228D	121K_131K_176K
188K	129T_178D	145T_186E	131K_176K

【０１６４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、静電、ジスルフィドステアリング、立体３、可変ドメイン立体及び可変ドメイン静電ドライバーセットのうちの１つ以上を有する、Ｋ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０１６５】
一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター４のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０１６６】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ４の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０１６７】
Ｋ－Ｌクラスター５：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；及び
ａ）Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含み；または
ｂ）Ｈ２は、１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；または
Ｈ１は、１２４＿１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。
【０１６８】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４３及び／または１８８位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１３１及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３及び／または１４５位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３３及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０１６９】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１８６または１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３及び／または１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８８、１７７及び１２４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６及び／または１３１位にアミノ酸置換を含む。
【０１７０】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４３、１８８、及び１９０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１３１及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３及び／または１４５位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３３及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０１７１】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２４＿１９０、１４３＿１８６＿１８８、または１８６＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３１＿１３３＿１７８、１３３＿１３５、１３３＿１３５＿１７８、１３３＿１７８、または１３５＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４，１４３＿１８８、１４５＿１７７＿１８８、または１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１＿１７６＿１７８、１３１

＿１７８、１３３＿１７６、１３３＿１７６＿１７８、または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１４３Ｓ、１８６Ｋ、１８８Ｔ、１９０Ｄ、１９０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１３１Ｓ、１３３Ｄ、１３３Ｉ、１３５Ｋ、１３５Ｒ、１７８Ｆ、１７８Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１４３Ｔ、１４５Ｔ、１７７Ｄ、１７７Ｉ、１８８Ｄ、１８８Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１３１Ｋ、１３３Ｇ、１３３Ｌ、１７６Ａ、１７６Ｄ、１７６Ｋ、１７８Ｅ、１７８Ｋ、１７８Ｒ、１７８Ｓ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１７３】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
186K_188T	133D_178T
186K_188T	131S_133D_178T
143S_186K_188T	133D_178T
124E_190E/D	133I_135R_178F
124E_190E/D	133I_135K_178F
124E_190E/D	133I_135K
124E_190E/D	135K_178F

【０１７４】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
145T_177D_188D	176K_178K
145T_177D_188D	176K_178R
124R	133G_176D
143T_188D	131K_178S
143T_188D	131K_176A_178S
177I_188K	133L_176D_178E

【０１７５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が１８６Ｋ＿１８８Ｔを含み、Ｌ１が１３３Ｄ＿１７８Ｔを含み、Ｈ２が１４５Ｔ＿１７７Ｄ＿１８８Ｄを含み、Ｌ２が１７６Ｋ＿１７８Ｋを含むものである。

【０１７６】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター５のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０１７７】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ５の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１７８】

Ｋ－Ｌクラスター６：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ１は、１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；及び
ａ）Ｈ２は、１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８または１３１位にアミノ酸置換を含み；
ｂ）Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３３または１２４＿１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含み；
ｃ）Ｈ２は、１２４または１２４＿１７９または１２４＿１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１７６または１７６＿１７８または１７６＿１８０位にアミノ酸置換を含み；または
ｄ）Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１３３または１２４＿１３３位にアミノ酸置換を含む。
【０１７９】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４５及び／または１４６位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＨ２は、１４３及び／または１７７位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０１８０】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ１は、１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４、１４３、１７９、１８６、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３、１７６、及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含む。
【０１８１】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４５及び／または１４６位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１７７位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２４、１３１、１６０、及び１８０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０１８２】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４５＿１７７＿１８８、または１４６＿１７７＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４、１２４＿１７９、１２４＿１８６、１４３、１４３＿１８６＿１８８、１７７＿１８８、１７９、１８６、１８６＿１８８、または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１３３、１２４＿１６０＿１７６＿１７８＿１８０、１２４＿１６０＿１８０、１３１＿１３３＿１７８、１３３、１３３＿１７６、１３３＿１７６＿１７８、１３３＿１７６＿１８０、または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含む。
【０１８３】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１４５Ｔ、１４６Ｔ、１７７Ｄ、１８８Ｄ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１７６Ｋ、１７８Ｋ、１７８Ｌ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１４３Ｋ、１４３Ｒ、１４３Ｓ、１７７Ｉ、１７９Ｋ、１８６Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、１８８Ｔ、１８８Ｗ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１３１Ｄ、１３１Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｇ、１３３Ｉ、１３３Ｌ、１６０Ｅ、１７６Ａ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１７８Ａ、１７８Ｄ、１７８Ｅ、１７８Ｆ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択される。
【０１８４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に

従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
146T_177D_188D	176K_178K
145T_177D_188D	176K_178L
145T_177D_188D	176K_178R

【０１８５】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
124R	133G_176D
124R	133G_176D_178D
124R_179K	133G_176D_180E
124R_186R	133G_176D_180E
143K	124E_133D
143K	133D
179K or 186R	124E_160E_180E
186R_188W	124E_160E_176A_178A_180E
143S_186K_188T	133D
186K_188T	133D
188K	131D_133G_178F
188K	131E_133G_178F
188K	176D_178E
188K	176E_178E
177I_188K	133I_176E_178E
177I_188K	133L_176D_178E

【０１８６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
145T_177D_188D	176K_178K	124R	133G_176D
145T_177D_188D	176K_178K	143K	124E_133D

【０１８７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、立体ドライバーセットを有する、Ｋ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１８８】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター６のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０１８９】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ６における設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０１９０】

Ｋ－Ｌクラスター７：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、

Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６＿１７８または１７

６＿１８０または１７６位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５、１３９、１４５、及び１７７位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３、１７７、１７９、１８６、２２８、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１、１２４、１３３、１３５、１６０、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１９１】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４５＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４、１３３、及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換を含む。

【０１９２】

いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５、１３９、及び１７７位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３、１７７、１７９、１８６、２２８、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１、１３５、１６０、１７６、１８０、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０１９３】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５＿１４５＿１８８、１３９＿１４５＿１８８、１４５＿１７７＿１８８、または１４５＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１７８、または１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４，１２４＿１４３、１２４＿１７９、１２４＿１８６、１２４＿１８６＿２２８、１２４＿１８８、１２４＿２２８、１４３＿１８８、１７７＿１８８、１７９＿１８８、１８６＿１８８、１８８、１８８＿２２８、３９＿１２４＿１７９、または４５＿１２４＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１３３＿１７６、１２１＿１３３＿１７６＿１８０、１２１＿１７６＿１７８、１２４＿１３３＿１７６、１２４＿１３３＿１７６＿１７８、１２４＿１３３＿１７６＿１７８＿１８０、１２４＿１３３＿１７６＿１８０、１２４＿１３３＿１７８、１２４＿１６０＿１７６＿１７８、１２４＿１６０＿１７６＿１７８＿１８０、１２４＿１７６＿１７８＿１８０、１２４＿１７６＿１８０、１３３＿１３５＿１７６、１３３＿１３５＿１７６＿１８０、１３３＿１７６、１３３＿１７６＿１７８、１３３＿１７６＿１８０、１３５＿１７６＿１７８、１７６＿１７８、３８＿１３３＿１７６＿１８０、または４４＿１３３＿１７６＿１８０位にアミノ酸置換を含む。

【０１９４】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２５Ｒ、１３９Ｗ、１４５Ｔ、１７７Ｔ、１８８Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２２Ｄ、１７８Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１２４Ｒ、１４３Ｋ、１４３Ｒ、１７７Ｉ、１７９Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、２２８Ｄ、３９Ｅ、４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２１Ｋ、１２４Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｇ、１３３Ｌ、１３５Ｗ、１６０Ｅ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１７８Ｄ、１７８Ｅ、１８０Ｅ、３８Ｒ、４４Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０１９５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
125R_145T_188E	122D_178K
139W_145T_188E	178K
145T_188E	178K
145T_177T_188E	178K

【０１９６】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
124R	133G_176D
124R	133G_135W_176D
124R	133G_135W_176D_180E
124R	133G_176D_180E
124R_228D	121K_133G_176D
124R_186R_228D	121K_133G_176D_180E
188K_228D	121K_176E_178E
124R_143K	124E_133G_176D_180E
124R_143K	124E_133G_176D
124R_143K	124E_133G_176D_178E_180E
124R_179K	133G_176D_180E
124R_186R	133G_135W_176D_180E
45P_124R_179K	44F_133G_176D_180E
39E_124R_179K	38R_133G_176D_180E
124K_188K	124E_133G_176D_178D
124R_188K	124E_133D_176E_178E_180E
143K_188K	124E_133D_176E_180E
143K_188K	124E_133D_176D_178E
143K_188K	124E_133D_178E
179K_188K	124E_176E_180E
179K_188K	124E_176E_178D_180E
179K_188K	124E_176E_178E_180E
186R_188K	124E_160E_176D_178D_180E
186R_188K	124E_160E_176D_178D
188K	135W_176E_178E
188K	176D_178E
188K	176E_178E
177I_188K	133L_176D_T178E

【０１９７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
145T_188E	178K	143R_188K	124E_133D_178E
125R_145T_188E	122D_178K	188K_228D	121K_176E_178E
145T_188E	178K	124R	133G_176D

【０１９８】

いくつかの実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター７の抗原結合ポリペプチド構築物は、ジスルフィドステアリングドライバーセット、立体２ドライバーセット、及び可変ドメインドライバーセットから選択された１つ以上のドライバーセットを有するアミノ酸置換の

組み合わせを含む。
【０１９９】
一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター７のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０２００】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ７に記載の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２０１】
Ｋ－Ｌクラスター８：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み；及び
ａ）Ｈ１は、１８６または１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；
ｂ）Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；
ｃ）Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；または
ｄ）Ｈ１は、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換を含む。
【０２０２】
いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２４、１３９、１７７、及び１９０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２９、１３１、１３５、及び１７６位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１２２、１２４、１４５、１７９、１８６、１８８、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２９、１３３、１３５、１６０、１７６、１７８、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２０３】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３、１８６、１７９及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２９及び／または１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２４、１３９、１７７、及び１９０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１３１、１３３、１３５、１７６、及び１８０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１２２、１２４、１４５、１７９、１８６、１８８、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２９、１３３、１３５、１６０、１７６、１７８、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２０４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２４＿１４３、１３９＿１４３、１３９＿１４３＿１８６、１３９＿１８６、１３９＿１８８、１４３、１４３＿１７９、１４３＿１８６、１４３＿１８６＿１８８、１４３＿１９０、１７７＿１８８、１７９、１７９＿１９０、１８６、または１８６＿１８８、１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２９＿１３１＿１３３、１２９＿１３３、１２９＿１３３＿１３５、１２９＿１３３＿１３５＿１８０、１２９＿１３３＿１７８、１２９＿１３３＿１８０、１２９＿１７６＿１７８、１２９＿１７６＿１７８＿１８０、１２９＿１７８、１２９＿１７８＿１８０、１２９＿１８０、１３３＿１７６＿１７８、１３３＿１７８、または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２２＿１４３＿１４５、１２２＿１４３＿１４５＿１７９、１２４＿１４３＿１４５、１２４＿１４３＿１４５＿１７９、１４３＿１４５、１

４３＿１４５＿１７９、１４３＿１４５＿１７９＿１８６＿１８８、１４３＿１４５＿１７９＿１８８、１４３＿１４５＿１８８、３９＿１４３＿１４５＿１７９、または４５＿１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１２９＿１６０＿１７８、１２４＿１２９＿１７８、１２４＿１３３＿１７８、１２４＿１３５＿１６０＿１７８、１２４＿１３５＿１７８、１２４＿１６０＿１７６＿１７８、１２４＿１６０＿１７８、１２４＿１７６＿１７８、１２４＿１７８、３８＿１２４＿１７８、または４４＿１２４＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０２０５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１３９Ｗ、１４３Ａ、１４３Ｉ、１４３Ｋ、１４３Ｓ、１７７Ｉ、１７９Ｋ、１８６Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、１８８Ｔ、１９０Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２９Ｔ、１３１Ｄ、１３１Ｅ、１３３Ｄ、１３３Ｌ、１３３Ｗ、１３５Ｓ、１７６Ａ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１７８Ｄ、１７８Ｅ、１７８Ｔ、１７８Ｗ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２２Ｃ、１２４Ｗ、１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、１８６Ｉ、１８８Ｌ、１８８Ｗ、３９Ｅ、４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｃ、１２４Ｋ、１２４Ｒ、１２９Ｋ、１３３Ａ、１３５Ｗ、１６０Ｋ、１６０Ｒ、１７６Ａ、１７８Ｒ、３８Ｒ、４４Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２０６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
143A_179K	129T_133W_180E
179K	129T_180E
179K	129T_178E_180E
179K_190K	129T_133D_135S_180E
143K_190K	129T_133D_135S
124K_143K	129T_131E_133D
124K_143K	129T_131D_133D
139W_143K	129T_133D
143K	129T_131E/D_133D
143A_186R	129T_133W_180E
186R	129T_176A_178W_180E
186R	129T_180E
186K	129T_133D_178T
139W_186K	129T_133D_178T
139W_143I_186K	129T_133D_178T
186K_188T	133D_178T
143S_186K_188T	133D_178T
188K	129T_176D_178T
139W_188K	129T_176E_178E
188K	129T_178D
188K	129T_178E
188K	176E_178E
177I_188K	133L_176D_178E

【０２０７】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
122C_143E_145T	124C_160K_178R
122C_143E_145T_179E	124C_160K_178R
124W_143E_145T	124K_133A_178R
124W_143E_145T_179E	124K_133A_178R
143E_145T	124K_178R
143E_145T	124R_160K_178R
143E_145T	124R_129K_160K_178R
143E_145T_179E	124R_135W_160K_178R
143E_145T_179E	124R_135W_178R
143E_145T_179E	124R_160K_178R
143E_145T_179E	124R_160R_178R
143E_145T_179E	124R_129K_160K_178R
143E_145T_179E	124R_129K_178R
143E_145T_179E	124R_178R
45P_143E_145T_179E	44F_124K_178R
45P_143E_145T_179E	44F_124R_178R
39E_143E_145T_179E	38R_124K_178R
39E_143E_145T_179E	38R_124R_178R
143E_145T_179E_186I_188W	124R_176A_178R
143E_145T_179E_186I_188W	124R_160R_176A_178R
143E_145T_179E_188L	124K_178R
143E_145T_179E_188L	124R_160K_178R
143E_145T_179E_188L	124R_178R
143E_145T_179E_188W	124R_176A_178R
143E_145T_188W	124R_160R_176A_178R
143E_145T_188L	124R_178R
143E_145T_188L	124R_160K_178R

【０２０８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
143K	129T_133D	124W_143E_145T_179E	124K_133A_178R
179K	129T_180E	143E_145T_188L	124R_160K_178R
186R	129T_180E	45P_143E_145T_179E	44F_124K_178R
139W_143K	129T_133D	143E_145T_179E	124R_135W_178R
179K	129T_178E_180E	143E_145T_179E	124R_178R

【０２０９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、立体２、立体３、立体４、及び可変ドメインドライバーセットのうちの１つ以上を有する、Ｋ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、天然に生じないジスルフィド結合を導入するＫ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２１０】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター８のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２１１】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ８の設計のうちの１

つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２１２】
Ｋ－Ｌクラスター９：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、
Ｈ１は、１７９、１８６、１４３及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０、１３３及び／または１７６＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１及び／または１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２または１２９位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４５、１７９及び２２８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１、１２９、１３５、１６０、及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２１３】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２９位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１及び／または１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４３、１７９、１８６、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１３３、１７６、１７８、及び１８０位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３、１７９、及び２２８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２９、１３１、１３５、１６０、及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２１４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５＿１４３、１２５＿１７９、１２５＿１８６、または１２５＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２９＿１３３、１２２＿１２９＿１７６＿１７８、または１２２＿１２９＿１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３＿１４５、１４３＿１４５＿１７９、１４３＿１４５＿１７９＿２２８、１４３＿１４５＿２２８、または１４５＿１７９＿２２８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１２４＿１６０＿１７８、１２１＿１２４＿１７８、１２１＿１２９＿１３１、１２１＿１３１、１２４＿１３５＿１６０＿１７８、または１２４＿１３５＿１７８位にアミノ酸置換を含む。
【０２１５】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２５Ｒ、１４３Ｋ、１７９Ｋ、１８６Ｒ、１８８Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２２Ｄ、１２９Ｔ、１３３Ｄ、１７６Ｄ、１７６Ｅ、１７８Ｅ、１７８Ｔ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、２２８Ｄ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１３５Ｗ、１２４Ｒ、１６０Ｋ、１２１Ｋ、１３１Ｋ、１２９Ｋ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。
【０２１６】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
125R_143K	122D_129T_133D
125R_179K	122D_129T_180E
125R_186R	122D_129T_180E
125R_188K	122D_129T_176D_178T
125R_188K	122D_129T_176E_178E

【０２１７】
さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
143E_145T	124R_135W_160K_178R
143E_145T	124R_135W_178R
143E_145T_228D	121K_124R_160K_178R
143E_145T_228D	121K_124R_178R
145T_179E_228D	121K_129K_131K
145T_179E_228D	121K_131K
143E_145T_179E	124R_135W_160K_178R
143E_145T_179E	124R_135W_160K_178R
143E_145T_179E_228D	121K_124R_178R
143E_145T_179E_228D	121K_124R_160K_178R

【０２１８】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
125R_179K	122D_129T_180E	143E_145T_228D	121K_124R_178R
125R_188K	122D_129T_176E_178E	143E_145T_179E_228D	121K_124R_178R

【０２１９】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ジスルフィドステアリングドライバーセットを有する、Ｋ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２２０】
一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター９のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０２２１】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ９の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２２２】
Ｋ－Ｌクラスター１０：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１７４、１７９または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６または１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３または１９０位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１、１３５または１２４位にアミノ酸置換を含み；またはＨ１は、１７４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ２は、優先的対合を促進するアミ

ノ酸置換を含まない、または１３５位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６、１２９及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４５、１７９、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１３３、１６０及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２２３】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１７４及び／または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６及び／または１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４５、１９０及び／または１８８位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３５、１３１、１７８、または１３３位にアミノ酸置換を含む、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４３及び／または１７９位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１１６、１２９、及び１３３位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３及び／または１７９位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２４及び／または１６０位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２２４】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１７４、１７４、１７４＿１７９、１７４＿１８６、または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１１６＿１２９＿１３３＿１７６、１１６＿１２９＿１７６＿１８０、１１６＿１７６、１２９＿１８０、または１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３＿１４５＿１７９＿１８８＿１９０、１４３＿１４５＿１７９＿１９０、１４３＿１４５＿１９０、１４３＿１９０、１４５＿１７９、１４５＿１７９＿１８８＿１９０、１８８、または１９０位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１３５＿１６０＿１７８、１２４＿１３５＿１７８、１３１、１３１＿１３５、１３３、１３５、１３５＿１７８、１７８位にアミノ酸置換を含む、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない。

【０２２５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１４３Ｋ、１７４Ｇ、１７９Ｋ、１８６Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１１６Ｆ、１２９Ｔ、１３３Ｄ、１７６Ｆ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４３Ｉ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、１８８Ｆ、１９０Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１２４Ｒ、１３１Ｋ、１３３Ａ、１３５Ａ、１６０Ｋ、１７８Ｆ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２２６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
143K_174G	116F_129T_133D_176F
186R	129T_180E
174G_179K	116F_129T_176F_180E
174G_186R	116F_129T_176F_180E
174G	176F
174G	116F_176F

【０２２７】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１０に

従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
145T_179E	131K
145T_179E_188F_190F	131K_135A
143I_190F	135A
143I_190F	-
143I_190F	178F
188F	133A
190F	-
190F	135A
190F	135A_178F
190F	178F
143E_145T_179E_188F_190F	124K_135A_178R
143E_145T_179E_190F	124R_135A_178R
143E_145T_179E_190F	124K_135A_178R
143E_145T_179E_190F	124R_135A_160K_178R
143E_145T_190F	124R_135A_160K_178R

【０２２８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
143K_174G	116F_129T_133D_176F	143E_145T_179E_190F	124R_135A_178R
174G_179K	116F_129T_176F_180E	143E_145T_179E_190F	124K_135A_178R

【０２２９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、立体１ドライバーセットを有する、Ｋ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２３０】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター１０のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２３１】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ１０の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２３２】

Ｋ－Ｌクラスター１１：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１＿１３５位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２、１２９及び１３５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１３９、１４５、１９０、及び２２８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２３３】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、

Ｈ１は、１４３＿１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２９＿１３３＿１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３

１＿１３５位にアミノ酸置換を含む。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２５位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１３９、１９０及び２２８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２３５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２５＿１４３＿１９０、または１４３＿１９０位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２９＿１３３＿１３５、または１２９＿１３３＿１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１３９＿１４５＿１９０、１２４＿１３９＿１４５＿１９０＿２２８、または１２４＿１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１３１＿１３５、または１３１＿１３５位にアミノ酸置換を含む。

【０２３６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２５Ｒ、１４３Ｋ、１９０Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２２Ｄ、１２９Ｔ、１３３Ｄ、１３５Ｓ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１３９Ｉ、１４５Ｔ、１９０Ｉ、２２８Ｄ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２１Ｋ、１３１Ｋ、１３５Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２３７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
143K_190K	129T_133D_135S
125R_143K_190K	122D_129T_133D_135S

【０２３８】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
124E_139I_145T_190I	131K_135K
124E_139I_145T_190I	131K_135K
124E_139I_145T_190I_228D	121K_131K_135K

【０２３９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が１４３Ｋ＿１９０Ｋを含み、Ｌ１が１２９Ｔ＿１３３Ｄ＿１３５Ｓを含み、Ｈ２が１２４Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ２が１３１Ｋ＿１３５Ｋを含むものである。

【０２４０】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ジスルフィドステアリングドライバーセットを有する、Ｋ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２４１】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター１１のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２４２】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ１１の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター１１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２４３】

Ｋ－Ｌクラスター１２：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３及び／または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１２４、１２５、１３９、及び１８８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｌ１は、１２２、１２９、１３１、及び１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３、１４５、１７９、１８６、１８８、２２８、３９、及び４５位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１２１、１３３、１３５、１７６、１７８、３８、及び４４位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２４４】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２４＿１４３、１２５＿１４３、１２５＿１４３＿１８６、１２５＿１８６、１２５＿１８６＿１８８、１３９＿１４３、１３９＿１４３＿１８６、１３９＿１８６、１３９＿１８６＿１８８、１４３、または１８６＿１８８位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２２＿１２９＿１３３、１２２＿１２９＿１３３＿１７８、１２２＿１３３＿１７８、１２９＿１３１＿１３３、１２９＿１３３、１２９＿１３３＿１７８、または１３３＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４＿１４３＿１４５、１２４＿１４５＿１７９、１２４＿１４５＿１７９＿１８６＿１８８、１２４＿１４５＿１７９＿１８８、１２４＿１４５＿１７９＿２２８、１２４＿１４５＿１８６、３９＿１２４＿１４５＿１７９、または４５＿１２４＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２１＿１３１＿１３３＿１７６、１３１＿１３３＿１３５、１３１＿１３３＿１３５＿１７６、１３１＿１３３＿１３５＿１７８、１３１＿１３３＿１７６、１３１＿１３３＿１７６＿１７８、３８＿１３１＿１３３＿１７６、または４４＿１３１＿１３３＿１７６位にアミノ酸置換を含む。

【０２４５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１２５Ｒ、１３９Ｗ、１４３Ｉ、１４３Ｋ、１８６Ｋ、１８８Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２２Ｄ、１２９Ｔ、１３１Ｄ、１３１Ｅ、１３３Ｄ、１７８Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、１８６Ｅ、１８６Ｉ、１８８Ｗ、２２８Ｄ、３９Ｅ、４５Ｐ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２１Ｋ、１３１Ｋ、１３１Ｒ、１３３Ｇ、１３３Ｓ、１３３Ｔ、１３５Ｋ、１３５Ｗ、１７６Ｒ、１７８Ａ、１７８Ｓ、３８Ｒ、４４Ｆ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２４６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
143K	129T_133D
143K	129T_131D_133D
143K	129T_131E_133D
124K_143K	129T_131D_133D
124K_143K	129T_131E_133D
139W_143K	129T_133D
125R_143K	122D_129T_133D
125R_143I_186K	122D_129T_133D_178T
125R_186K	122D_129T_133D_178T
125R_186K_188T	122D_133D_178T
139W_143I_186K	129T_133D_178T
139W_186K	129T_133D_178T
139W_186K_188T	133D_178T
186K_188T	133D_178T

【０２４７】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
124E_145T_179E	121K_131R_133G_176R
124E_145T_179E	131K_133G_176R
124E_145T_179E	131K_133G_176R_178A
124E_145T_179E	131R_133G_135W_176R
124E_145T_179E	131R_133G_176R
124E_145T_179E	131R_133G_176R_178A
124E_145T_186E	131R_133S_135K
124E_143E_145T	131R_133T_135K_178S
45P_124E_145T_179E	44F_131R_133G_176R
39E_124E_145T_179E	38R_131R_133G_176R

【０２４８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、以下のうちの１つである：

H1	L1	H2	L2
143K	129T_133D	124E_145T_179E	131R_133G_176R
186K_188T	133D_178T	124E_145T_179E	131R_133G_176R
139W_143K	129T_133D	124E_145T_179E	131R_133G_135W_176R

【０２４９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、ジスルフィドステアリング、立体２、立体３、可変ドメイン静電及び可変ドメイン立体ドライバーセットのうちの１つ以上を有する、Ｋ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２５０】

一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター１２のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２５１】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ａ１２の設計のうちの

１つ以上に記載されるＫ－Ｌクラスター１２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２５２】
Ｋ－Ｋクラスター１：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７８＿１８０または１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４５位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２５３】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１８０位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｌ２は、１６０及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２５４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４＿１７８位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７８＿１８０または１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含む。
【０２５５】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１８６Ｒ、またはその保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１６０Ｅ、１７８Ｅ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択される。
【０２５６】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１４３Ｅ＿１４５Ｔ＿１７９Ｅを含み、Ｌ１は、１２４Ｋ＿１７８Ｒを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、１２４Ｋ＿１７８Ｒを含み、Ｌ２は、１７８Ｅ＿１８０Ｅまたは１６０Ｅ＿１８０Ｅを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、これらのＨ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせを含む。
【０２５７】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ１に記載されるＫ－Ｋクラスター１に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２５８】
Ｋ－Ｋクラスター２：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１７９または１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４５位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＨ２は、１４６位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２５９】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１

は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１７９または１８６位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ２は、１４６位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２６０】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１８６、１７９、または１４６＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１６０＿１８０位にアミノ酸置換を含む。

【０２６１】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４５Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒまたはその保存的置換であり；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１８６Ｒ、１７９Ｋ、１４６Ｇ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅ、１６０Ｅ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２６２】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１４３Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ１は、１２４Ｒを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、１８６Ｒ、１７９Ｋまたは１４６Ｇ＿１７９Ｋを含み、Ｌ２は、１２４Ｅ＿１６０Ｅ＿１８０Ｅを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が１４３Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ１が１２４Ｒを含み、Ｈ２が１７９Ｋを含み、Ｌ２が１２４Ｅ＿１６０Ｅ＿１８０Ｅを含むものである。

【０２６３】

一実施形態において、Ｋ－Ｋクラスター２のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２６４】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ２の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター２に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２６５】

Ｋ－Ｋクラスター３：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、

Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０または１７８＿１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３及び／または１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４＿１７８または１３１位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ２は、１４５位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２６６】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４または１３１位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｌ１は、１７８位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４３及び／または１７９位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２６７】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０または１７８＿１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３＿１４５、１４３＿１４５＿１７９、または１４５＿１７９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３１または１２４＿１７８位にアミノ酸置換を含む。
【０２６８】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１８６Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１７８Ｅ、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４５Ｔ、１７９Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｋ、１３１Ｋ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。
【０２６９】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１８６Ｒを含み、Ｌ１は、１７８Ｅ＿１８０Ｅまたは１８０Ｅを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
143E_145T_179E	124K_178R
143E_145T	-
145T_179E	131K

【０２７０】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が１８６Ｒを含み、Ｌ１が１８０Ｅを含み、Ｈ２が１４３Ｅ＿１４５Ｔ＿１７９Ｅを含み、Ｌ２が１２４Ｋ＿１７８Ｒを含むものである。
【０２７１】
一実施形態において、Ｋ－Ｋクラスター３のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０２７２】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ３の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター３に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０２７３】
Ｋ－Ｋクラスター４：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４６位にアミノ酸置換をさらに含み、Ｈ２は、１４５位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１６０及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２７４】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８

０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｈ１は、１４６位にアミノ酸置換をさらに含み、及び／またはＬ２は、１６０及び／または１７８位にアミノ酸置換をさらに含む。

【０２７５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４６＿１７９または１７９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４または１２４＿１６０＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０２７６】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１４６Ｇ、１７９Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１８０Ｅまたはその保存的置換であり；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１４３Ｅ、１４５Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１６０Ｋ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２７７】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１７９Ｋまたは１４６Ｇ＿１７９Ｋを含み、Ｌ１は、１８０Ｅを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、１４３Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ２は、Ｑ１２４Ｒ＿Ｑ１６０Ｋ＿Ｔ１７８ＲまたはＱ１２４Ｒを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が１７９Ｋを含み、Ｌ１が１８０Ｅを含み、Ｈ２が１４３Ｅ＿１４５Ｔを含み、Ｌ２が１２４Ｒ＿１６０Ｋ＿１７８Ｒを含むものである。

【０２７８】

一実施形態において、Ｋ－Ｋクラスター４のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２７９】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ４の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター４に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２８０】

Ｋ－Ｋクラスター５：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１４３または１８６位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１８０位にアミノ酸置換を含む、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない；Ｈ２は、１４３＿１４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１２４位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｌ２は、１６０及び／または１７８位のうちの１つ以上にアミノ酸置換をさらに含む。さらなる実施形態において、Ｌ２は、１２４、１２４＿１７８または１２４＿１６０＿１７８位にアミノ酸置換を含む。

【０２８１】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１８６Ｒ、１４３Ｒ、１４３Ｋ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１８０Ｅ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１４３

Ｅ、１４５Ｔ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒ、１６０Ｋ、１７８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２８２】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
186R	180E
186R	-
143R/K	-

【０２８３】

さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
143E_145T	124R_160K_178R
143E_145T	124R
143E_145T	124K_178R

【０２８４】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。

【０２８５】

一実施形態において、Ｋ－Ｋクラスター５のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。

【０２８６】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ５の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター５に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２８７】

Ｋ－Ｋクラスター６：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、３９位にアミノ酸置換を含む、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない；Ｌ１は、３８位にアミノ酸置換を含む、または優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない；Ｈ２は、３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、３８位にアミノ酸置換を含む。

【０２８８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、３９Ｄ、３９Ｅ、３９Ｋ、３９Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、３８Ｄ、３８Ｅ、３８Ｋ、３８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、３９Ｄ、３９Ｅ、３９Ｋ、３９Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択され；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、３８Ｄ、３８Ｅ、３８Ｋ、３８Ｒ、及びそれらの保存的置換から選択される。

【０２８９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H1	L1
-	-
39R	38D/E
39K	38E/D
39E	38R/K
39D	38R

【０２９０】
さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：

H2	L2
39D	38R/K
39R	38E/D
39K	38E
39E	38R/K

【０２９１】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体とＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせは、Ｈ１が３９Ｒを含み、Ｌ１が３８Ｅを含み、Ｈ２が３９Ｄを含み、Ｌ２が３８Ｒを含むものである。
【０２９２】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ６の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター６に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。一実施形態において、Ｋ－Ｋクラスター６設計は、ＬＣＣＡ固有の識別子１０６７４－１０７４９または１０６７９－１０７４４に対応する設計ではない。
【０２９３】
Ｋ－Ｋクラスター７：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない；Ｌ１は、１３５位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１１６位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｌ２は、１３５位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０２９４】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１３５Ｗまたはその保存的置換であり；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１３９Ｗまたはその保存的置換であり；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１１６Ａ、１３５Ｖ、及びそれらの保存的置換から選択される。
【０２９５】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、Ｌ１は、１３５Ｗを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、１３９Ｗを含み、Ｌ２は、１１６Ａまたは１１６Ａ＿１３３５Ｖを含む。いくつかの実施形

態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つのＨ２Ｌ２ヘテロ二量体と１つのＨ１Ｌ１ヘテロ二量体の組み合わせを含む。

【０２９６】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ７における設計のどれか一方に記載されるＫ－Ｋクラスター７に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０２９７】

Ｋ－Ｋクラスター８：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または４５位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない；Ｈ２は、４５位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、４４位にアミノ酸置換を含む。

【０２９８】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、４５Ｆまたはその保存的置換であり；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、４５Ｐ、４５Ａまたはその保存的置換であり；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、４４Ｆまたはその保存的置換である。

【０２９９】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットのうちの１つを含む：Ｈ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない、または４５Ｆを含み、及びＬ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まない。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、４５Ａまたは４５Ｐを含み、Ｌ２は、４４Ｆを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせを含み、Ｈ１及びＬ１は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、Ｈ２は、４５Ａを含み、Ｌ２は、４４Ｆを含む。

【０３００】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ８の設計のうちの１つ以上に記載されるＫ－Ｋクラスター８に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。

【０３０１】

Ｋ－Ｋクラスター９：

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１３９位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１１６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、Ｌ２は、１３５位にアミノ酸置換を含む。

【０３０２】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１３９Ｗまたはその保存的置換であり；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１１６Ａまたはその保存的置換であり；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１３５Ｗまたはその保存的置換である。

【０３０３】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１３９Ｗを含み、Ｌ１は、１１６Ａを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まず、Ｌ２は、１３５Ｗを含む。

【０３０４】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ９に記載されるＫ－Ｋクラスター９に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０３０５】
Ｋ－Ｋクラスター１０：
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１７６位にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、Ｌ１及び／またはＬ２は、１３３位にアミノ酸置換をさらに含む。
【０３０６】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１は、１２４位にアミノ酸置換を含み；Ｌ１は、１３３＿１７６位にアミノ酸置換を含み；Ｈ２は、１２４位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２は、１３３＿１７６位にアミノ酸置換を含む。
【０３０７】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含み、Ｈ１におけるアミノ酸置換は、１２４Ｅまたはその保存的置換であり；Ｌ１におけるアミノ酸置換は、１３３Ｇ、１７６Ｒまたはその保存的置換であり；Ｈ２におけるアミノ酸置換は、１２４Ｒまたはその保存的置換であり；Ｌ２におけるアミノ酸置換は、１３３Ｇ、１７６Ｄまたはその保存的置換である。
【０３０８】
いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ１Ｌ１ヘテロ二量体を有し、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ１は、１２４Ｅを含み、Ｌ１は、１３３Ｇ＿１７６Ｒを含む。さらなる実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含むＨ２Ｌ２ヘテロ二量体を有し、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体は、以下のアミノ酸置換セットを含み：Ｈ２は、１２４Ｒを含み、Ｌ２は、１３３Ｇ＿１７６Ｄを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、これらのＨ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の組み合わせを含む。
【０３０９】
一実施形態において、Ｋ－Ｌクラスター９のアミノ酸組み合わせは、表Ｆから選択された１つ以上の二次置換を含む。
【０３１０】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、表１０－Ｂ１０に記載されるＫ－Ｋクラスター１０に従ったアミノ酸置換の組み合わせを含む。
【０３１１】
ＬＣＣＡ設計セットにおける優先的対合
Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。一般に、アミノ酸修飾及び任意の天然に生じるバイアスの不在下で、野生型の免疫グロブリン重鎖配列（Ｈ１）は、２つの異なる野生型の免疫グロブリン軽鎖配列（Ｌ１及び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、おおよそ５０：５０の、Ｌ１と対合したＨ１（Ｈ１Ｌ１、正しく対合された）及びＬ２と対合したＨ１（Ｈ１Ｌ２、誤対合）の混合物をもたらす。同様に、野生型Ｈ２が、野生型Ｌ１及びＬ２と同時発現される場合、重鎖は、両方の軽鎖と等しく統計的に対合し、おおよそ５０：５０の、Ｌ１と対合したＨ２（Ｈ２Ｌ１、誤対合）及びＬ２と対合したＨ２（Ｈ２Ｌ２、正しく対合された）の混合物をもたらす。「優先的対合」という用語は、別の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列と比較して、１つの免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列と免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列の対合特異性または対合優先性を説明するために本明細書で使用さ

れる。この文脈において、例えば、Ｈ１をＬ１及びＬ２の両方と同時発現させる場合に、Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体の量がＨ１Ｌ２ヘテロ二量体の量よりも多い場合、優先的対合は、Ｈ１とＬ１との間で生じる。同様に、例えば、Ｈ２をＬ１及びＬ２の両方と同時発現させる場合に、Ｈ２Ｌ２ヘテロ二量体の量がＨ２Ｌ１ヘテロ二量体の量よりも多い場合、優先的対合は、Ｈ１とＬ１との間で生じる。

【０３１２】

しかしながら、場合によっては、親抗体から得られる野生型の重鎖及び軽鎖ポリペプチド配列で観察された固有の対合バイアスが存在する。この固有の対合バイアスは、野生型親Ｈ１またはＨ２を野生型親Ｌ１及びＬ２と同時発現させ、軽鎖のうちの１つが両方の親抗体の重鎖と優先的に対合するＬＣＣＡ設計セットの文脈において観察することができる。一実施形態において、優先的対合は、優先的対合を促進するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾が、対応する野生型システムで生じる優先的対合よりも多い場合に生じる。

【０３１３】

優先的対合または設計強度の程度は、アミノ酸修飾が優先的対合を促進する能力の尺度である。優先的対合の程度は、本明細書の他の箇所及び実施例に記載されるように評価することができ、誤対合ヘテロ二量体（すなわち、Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１）と比較して正しく対合されたヘテロ二量体（すなわち、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２）の測定に基づいている。優先的対合の程度は、１つの重鎖が２つの固有の軽鎖と同時発現されるＬＣＣＡ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｌ２、またはＨ２Ｌ１Ｌ２）、または親抗体の重鎖及び軽鎖が同時発現されるＭａｂ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）の文脈において評価することができる。

【０３１４】

以下の実施形態は、ＬＣＣＡ設計セットの文脈に関連する。このセクションにおける実施形態の全てでは、「約」という用語は、指定された比の±５％を意味し、特に示されない限り、優先的対合は、野生型に対して比較される。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約６０：４０である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約６０：４０である。

【０３１５】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約６５：３５である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約６５：３５である。

【０３１６】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約７０：３０である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ

以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約７０：３０である。

【０３１７】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約７５：２５である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約７５：２５である。

【０３１８】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約８０：２０である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約８０：２０である。

【０３１９】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約８５：１５である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約８５：１５である。

【０３２０】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約９０：１０である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約９０：１０である。

【０３２１】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約９５：５である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以

上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約９５：５である。

【０３２２】

一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約９９：１である。一実施形態において、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含み、ここで、Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比は、少なくとも約４０：６０であり、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比は、少なくとも約９９：１である。

【０３２３】

他の実施形態において、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２の量が約４０、４５、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％以上であるように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含む。

【０３２４】

一実施形態において、優先的対合は、実施例に記載されるようにＬＣＣＡによって測定される。ＬＣＣＡ結果は、一般に、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２が同時発現されるＭａｂ設計セット（以下に記載される）における優先的対合の文脈において結果を予測する。

【０３２５】

一実施形態において、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２のうちの少なくとも１つの相対的対合が野生型に対して少なくとも約１０％より大きく、かつ、他方の相対的対合が野生型の約１０％以内または野生型に対して少なくとも約１０％より大きくなるように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含む。

【０３２６】

一実施形態において、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２のうちの少なくとも１つの相対的対合が野生型に対して少なくとも約２０％より大きく、かつ、他方の相対的対合が野生型の約１０％以内または野生型に対して少なくとも約１０％より大きくなるように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含む。

【０３２７】

一実施形態において、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２のうちの少なくとも１つの相対的対合が野生型に対して少なくとも約３０％より大きく、かつ、他方の相対的対合が野生型の約１０％以内または野生型に対して少なくとも約１０％より大きくなるように、Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進して、Ｈ１Ｌ１を形成し、またはＬ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、Ｈ２Ｌ２を形成するアミノ酸修飾を含む。

【０３２８】

Ｍａｂ設計セットにおける優先的対合

優先的対合は、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２を同時発現させ、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上が、Ｌ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ２とＨ２の優先的対合を促進し、正しく対合された第１のヘテロ二量体（Ｈ１Ｌ１）と正しく対合された第２のヘテロ二量体（Ｈ２Ｌ２）を含む二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を形成するアミノ酸修飾を含むＭａｂ設計セットの文脈において評価することもできる。この種の実施形態において、図８に示すように、２つの異なる免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列を２つの異なる免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列と同時発現させる場合、多くの可能性のある産物を得ることができ、そのうちの１４個を図８に示し、そのうちのただ１つが、所望の、または正しく対合された二重特異性抗体Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２（図８の抗体種Ａ）である。しかしながら、Ｍａｂ設計セットに基づいて重鎖と軽鎖の間の正しい対合を評価する文脈において、追加産物のいくつかは、Ｆａｂレベルで正しく対合されたヘテロ二量体を含むため（例えば、図８の抗体種Ｅ、Ｈ、Ｋ、及びＭを参照）、Ｆａｂ領域の文脈において正しい対合を示すとも考えられ得る。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物のＦｃ部分は、ヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する非対称アミノ酸修飾を含む。これらの実施形態において、種Ｅ～Ｊの数及び量は減少すると予想される。

【０３２９】

ＬＣＣＡ設計セットについて、４つ全ての免疫グロブリンポリペプチド配列、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２を同時発現させるＭａｂ設計セットの文脈において、場合によっては、Ｈ１及びＨ２の両方と優先的に対合する軽鎖のうちの１つ（Ｌ１またはＬ２のいずれか）がもたらす対合に固有のバイアスが存在する場合がある。従って、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の文脈においてＭａｂ設計の強度を決定する場合、対応する野生型親系（Ｍａｂ設計のアミノ酸修飾を有さないＨ１、Ｌ１、Ｈ２、Ｌ２ポリペプチド配列）で観察された正しい対合の量と比較して、Ｍａｂ設計のアミノ酸修飾との対合の程度を評価することが必要な場合もある。従って、一実施形態において、正しく対合された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量が、対応する野生型親系で観察された正しく対合された二重特異性抗体の量よりも大きい場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を示すと考えられる。あるいは、総発現産物における正しく対合された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物のパーセンテージが、対応する野生型親系における総発現産物で得られた正しく対合された二重特異性抗体の量よりも大きい場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を示すと考えられる。一実施形態において、総発現産物は、図８の抗体種Ａ～Ｎを含み得る。一実施形態において、総発現産物は、２つの重鎖と２つの軽鎖を有する抗体種（図８の抗体種Ａ～Ｊ）だけであってもよい。後者の実施形態において、優先的対合は、図８の種Ｋ～Ｎなどのハーフ抗体を除外する総二重特異性抗体のパーセンテージとして測定される。

【０３３０】

別の実施形態において、正しい対合の量が、対応する野生型親系において高度の誤対合を示す二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物のヘテロ二量体で増加する場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を示すと考えられる。別の実施形態において、Ｈ１とＬ１及びＨ２とＬ２の間の正しい対合の総量が、対応する野生型親系で観察されたものよりも大きい場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を示すと考えられる。例えば、図８を参照すると、種Ａ、Ｂ、Ｈ、Ｉ、及びＭは、Ｈ１Ｌ１に対して正しく対合されたと考えられ、種Ａ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、及びＫは、Ｈ２Ｌ２に対して正しく対合されたと考えられる。この実施形態において、優先的対合は、総対合のパーセンテージとして測定される。

【０３３１】

一実施形態において、優先的対合は、本明細書に記載されるようにＳＭＣＡによって測定される。

【０３３２】

いくつかの実施形態において、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２対合の合計によって測定された場合の正しい対合の総量の変化が、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない、対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、または４５％よりも大き

い場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を促進すると考えられる。
【０３３３】
いくつかの実施形態において、生成されたハーフ抗体以外の種のパーセンテージとして生成された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化が、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない、対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きい場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を促進すると考えられる。
【０３３４】
一実施形態において、生成された全ての種のパーセンテージとして生成された二重特異性抗体の量によって測定された場合の正しい対合の総量の変化が、優先的対合を促進するＦａｂ領域中にアミノ酸置換を有さない、対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド鎖の対合と比較して、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、または８０％よりも大きい場合、Ｍａｂ設計は、優先的対合を促進すると考えられる。
【０３３５】
Ｆａｂ領域の熱安定性
Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド配列のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体の熱安定性への影響を最小限にする。各ヘテロ二量体に対するアミノ酸修飾の効果は、Ｈ１及びＬ１によって形成されたＦａｂ領域またはＨ２及びＬ２によって形成されたＦａｂ領域の熱安定性を測定し、それを、対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域（野生型の第１のＦａｂ領域）または対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列によって形成されたＦａｂ領域（野生型の第２のＦａｂ領域）の熱安定性と比較することによって決定される。「対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列」及び「対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列」という用語は、本明細書に記載される優先的対合を促進するアミノ酸修飾を有しない、対応するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド配列を記載することを意味する。
【０３３６】
熱安定性は、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）または示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）を含む、当該技術分野で公知かつ本明細書に記載される様々な方法によって測定することができる。後者の方法は、「融解温度」またはＴｍの点で熱安定性の尺度を提供する。
【０３３７】
以下の実施形態の文脈では、「約」という用語は、記載された温度の±１０％を意味する。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約２０℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約１５℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約１０℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約９℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約８℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約７℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約６℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約５℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴ

ｍの約４℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約３℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約２℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍの約１℃以内のＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域のＴｍとほぼ同じＴｍを有する第１のＦａｂ領域を含む。

【０３３８】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約２０℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約１５℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約１０℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約９℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約８℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約７℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約６℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約５℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約４℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約３℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約２℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍの約１℃以内のＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、対応する野生型の第２のＦａｂ領域のＴｍとほぼ同じＴｍを有する第２のＦａｂ領域を含む。

【０３３９】

一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体を含み、第１のＦａｂ領域の融解温度（Ｔｍ）は、第１の抗原に対して対応する野生型のＨ１及びＬ１ポリペプチド配列（野生型の第１のＦａｂ領域）によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０℃以内であり、及び／または第２のＦａｂ領域の融解温度（Ｔｍ）は、第２の抗原に対して対応する野生型のＨ２及びＬ２ポリペプチド配列（野生型の第２のＦａｂ領域）によって形成されたＦａｂ領域のＴｍの約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または２０℃以内である。

【０３４０】

さらに、いくつかの実施形態において、第１または第２のＦａｂ領域のＴｍは、対応する野生型の第１のＦａｂまたは対応する第２の野生型の第２のＦａｂのＴｍより大きい。従って、一実施形態において、第１または第２のＦａｂ領域のＴｍは、対応する野生型の第１のＦａｂ領域または対応する野生型の第２のＦａｂ領域と比較して、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．５、５．０℃以上まで上昇する。

【０３４１】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌ設計番号２９７９、３０１８、３０４１、３１０２、３８９８、及び／または３９４７に対応するアミノ酸置換を含む。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｋ－Ｌ設計番号３０２５、３１０９、３１１３、３８７８、３８９０、３９１０、３９３１、３９５４、３９６７、４０１０、及び／または４０４０に対応するアミノ酸置換を含む。
【０３４２】
Ｆａｂ領域が抗原と結合する能力
Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２ポリペプチド配列のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進して、抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体がその抗原と結合する能力への影響を最小限にする。各ヘテロ二量体に対するアミノ酸修飾の効果は、Ｈ１及びＬ１によって形成されたＦａｂ領域またはＨ２及びＬ２によって形成されたＦａｂ領域がそれぞれの抗原と結合する能力を測定し、それを、対応する野生型の第１のＦａｂ領域または対応する野生型の第２のＦａｂ領域がそれぞれの抗原と結合する能力と比較することによって決定される。
【０３４３】
Ｆａｂ領域がそれぞれの抗原と結合する能力は、当該技術分野で公知の多くの方法によって測定することができ、そのうちのいくつかは、本明細書の他の箇所に記載される。例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）または全細胞結合アッセイを用いて、第１のＦａｂ領域が第１の抗原と結合する能力、及び第２のＦａｂ領域が第２の抗原と結合する能力を評価してもよい。後者の２つの方法は、その抗原に対するＦａｂ領域の親和性を決定することによって、Ｆａｂ領域がそれぞれの抗原と結合する能力を測定する。
【０３４４】
一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約１００倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約５０倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約４０倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約３０倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約２０倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約１０倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約９倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約８倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約７倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約６倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約５倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の４倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約３倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性の約２倍以内である。一実施形態において、第１の抗原に対する第１のＦａｂ領域の親和性は、第１の抗原に対する野生型の第１のＦａｂ領域の親和性とほぼ同じである。

【０３４５】
一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約１００倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約５０倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約４０倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約３０倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約２０倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約１０倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約９倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約８倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約７倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約６倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約５倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の４倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約３倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性の約２倍以内である。一実施形態において、第２の抗原に対する第２のＦａｂ領域の親和性は、第２の抗原に対する野生型の第２のＦａｂ領域の親和性とほぼ同じである。

【０３４６】
アミノ酸修飾または設計セットの移動可能性
本明細書に記載されるアミノ酸修飾または設計セットを使用して、各ヘテロ二量体の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドが、少なくとも１つの親抗体がカッパ軽鎖を含み、少なくとも１つの他の親抗体がラムダ軽鎖を含む１つ以上の親抗体から得ることができる二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を調製することができる。以下の議論に基づいて、大多数のこのような二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物にＭａｂ設計セットを適用することができる。

【０３４７】
免疫グロブリン重鎖と軽鎖間の接続部分におけるＶＨ：ＶＬ及び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可能性を増大させる。この配列保存の結果として、本明細書に記載されるＭａｂ設計セットを、優先的対合をもたらすＤ３Ｈ４４カッパＦａｂ及びＣＡＴ－２２００ラムダＦａｂの構造のモデリングに基づいて、優先的対合をもたらすための他の親抗体のカッパＦａｂ及びラムダに移動させることができる。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及びＣＬドメインに関する場合である。ある実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、カッパＦａｂが、優先的対合を促進するＣＬ及び／またはＣＨ１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。ある実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、ラムダＦａｂが、優先的対合を促進するＣＬ及び／また

はＣＨ１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。
【０３４８】
しかしながら、ＣＤＲ（相補性決定領域）ループ残基（及び長さ）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。従って、一実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、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、カッパＦａｂが、ＣＤＲループに対して遠位にあるＶＨ及び／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、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、抗原結合部位のアミノ酸配列がＣＡＴ－２２００抗体のものとは著しく異なる場合に、ラムダＦａｂが、優先的対合を促進し、かつ、ＣＤＲループに対して遠位にあるＶＨ及び／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、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、抗原結合部位のアミノ酸配列がＤ３Ｈ４４抗体のものと実質的に類似である場合に、カッパＦａｂが、優先的対合を促進し、かつ、ＣＤＲループに対して近位または遠位にあるＶＨ及び／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、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、抗原結合部位のアミノ酸配列がＣＡＴ－２２００抗体のものと実質的に類似である場合に、ラムダＦａｂが、優先的対合を促進し、かつ、ＣＤＲループに対して近位または遠位にあるＶＨ及び／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。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、カッパＦａｂが、ＣＬ及び／またはＣＨ１ドメインにおける１つ以上のアミノ酸修飾、並びに優先的対合を促進するＶＨ及び／またはＶＬドメインにおける修飾を含むヘテロ二量体を含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、ラムダＦａｂが、ＣＬ及び／またはＣＨ１ドメインにおける１つ以上のアミノ酸修飾、並びに優先的対合を促進するＶＨ及び／またはＶＬドメインにおける修飾を含むヘテロ二量体を含む。
【０３４９】
一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物のＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾は、１つの親抗体のカッパＦａｂがヒトまたはヒト化ＩｇＧ１／κである抗原結合ポリペプチド構築物において優先的対合を促進することができる。そのような親抗体の非限定的な例としては、オファツムマブ（ヒト）またはトラスツズマブ、またはベバシズマブ（ヒト化）が挙げられる。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物のＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上におけるアミノ酸修飾は、１つの親抗体のラムダＦａｂがヒトまたはヒト化ＩｇＧ１／ラムダである抗原結合ポリペプチド構築物において優先的対合を促進することができる。そのようなヒト抗体の非限定的な例としては、ブリアキヌマブまたはシファリムマブが挙げられるが、ヒト化抗体の一例は、ブロンチクツズマブである。
【０３５０】
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及び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及び軽鎖に移動可能である。
【０３５１】
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及び軽鎖に移動可能である。そのような抗体の例としては、オビヌツズマブが挙げられる。
【０３５２】
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、重鎖及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抗体の免疫グロブリン重鎖及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及びＣＨ１ドメインを有する抗体の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖に移動可

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。

【０３５３】

実施例、図、及び表は、優先的対合を促進することができるアミノ酸修飾（例えば、可変領域及び定常領域を含む１つ以上のＦａｂ断片内の）が、他の免疫グロブリン重鎖及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。

【０３５４】

足場

抗原結合ポリペプチド構築物のヘテロ二量体は、足場に連結することができる。足場は、ペプチド、ポリペプチド、ポリマー、ナノ粒子、または他の化学物質であってもよい。抗原結合ポリペプチド構築物のヘテロ二量体は、ポリペプチドである足場のＮ末端またはＣ末端にいずれかに連結させてもよい。一実施形態において、足場は、アルブミンポリペプチドである。

【０３５５】

別の実施形態において、足場は、免疫グロブリンＦｃ（Ｆｃ）、またはその部分である。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、少なくとも１つまたは２つのＣＨ３ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、少なくとも１つまたは２つのＣＨ２ドメイン配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、１つ以上のリンカーを有してまたは有さずに、第１のヘテロ二量体及び／または第２のヘテロ二量体に連結するＦｃを含む。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ヒトＦｃである。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ヒトＩｇＧまたはＩｇＧ１　Ｆｃである。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ヘテロ二量体Ｆｃである。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、単鎖ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、複数のペプチド、例えば、２つのポリペプチドである。

【０３５６】

いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ＣＨ３ドメイン配列のうちの少なくとも１つにおいて、１つ以上のアミノ酸修飾を含む。アミノ酸修飾は、ホモ二量体ＣＨ３ドメイン配列に対してヘテロ二量体ＣＨ３ドメイン配列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に行われ得る。こ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。ホモ二量体ＣＨ３配列に対してヘテロ二量体ＣＨ３ドメイン配列間の優先的対合をもたらすための代替的戦略には、例えば、「ノブ・イントゥ・ホール」が含まれ、イオン相互作用による荷電残基、及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　ｅｔ　ａｌ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。

【０３５７】

いくつかの態様において、Ｆｃは、そのそれぞれの開示全体が、あらゆる目的についてその全体において参照によって本明細書に組み込まれる２０１１年１１月４日出願の特許出願ＰＣＴ／ＣＡ２０１１／００１２３８、または２０１２年１１月２日出願のＰＣＴ／ＣＡ２０１２／０５０７８０において記載されているＦｃである。

【０３５８】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、非対称に修飾されている修飾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、すなわち、第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドを含むことができ、これらは、Ｆｃが１つの第１の重鎖ポリペプチド及び１つの第２の重鎖ポリペプチドを含むという条件で、互換的に使用され得る。一般に、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。

【０３５９】

非対称に導入された１つ以上のアミノ酸修飾を含む２つのＣＨ３配列は一般に、その２つのＣＨ３配列が二量化すると、ホモ二量体ではなく、ヘテロ二量体Ｆｃをもたらす。本明細書で使用される場合、「非対称アミノ酸修飾」は、第１のＣＨ３配列上の特定の位置にあるアミノ酸が、同じ位置にある第２のＣＨ３配列上のアミノ酸と異なり、かつその第１及び第２のＣＨ３配列が優先的に対合し、ホモ二量体ではなくヘテロ二量体を形成している任意の修飾を指す。このヘテロ二量化は、それぞれの配列上の同じ個々のアミノ酸位置にある２個のアミノ酸の一方のみの修飾；または第１及び第２のＣＨ３配列のそれぞれの上の同じ個々の位置にある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及び第２のＣＨ３配列は、１つまたは１つ以上の非対称アミノ酸修飾を含み得る。

【０３６０】

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

【０３６１】

典型的には、Ｆｃは、二量化し得る２つの連続重鎖配列（Ａ及びＢ）を含み得る。いくつかの態様において、Ｆｃの一方または両方の配列は、ＥＵ番号付けを使用すると、次の位置：Ｌ３５１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｔ３６６、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｔ３５０、Ｓ４００、及び／またはＮ３９０に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に示されている変異配列を含む。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。

【０３６２】

表 X

ヒト IgGl Fc 配列 231-447 (EU 番号付け),配列番号 11	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

変異体 IgGl 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

【０３６３】

いくつかの実施形態において、Ｆｃは、ＣＨ２ドメイン配列のうちの少なくとも１つにおいて１つ以上のアミノ酸修飾を含み得る。異なるＦｃγ受容体に対する抗体Ｆｃの親和性を選択的に変更する、Ｆｃの重鎖配列における多数の突然変異が、当該技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、Ｆｃは、Ｆｃ－γ受容体の抗原結合ポリペプチド構築物への結合を変更するための１つ以上の修飾を含む。

【０３６４】
ＣＨ２ドメインは、表Ｘに示す配列のアミノ酸２３１～３４０に対応する。抗原結合ポリペプチド構築物のＦｃがＦｃ－γ受容体と結合する能力を変更する例示的な非限定のアミノ酸修飾を、下記に列挙する：
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）；
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ、Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｌ２３５Ｖ／Ｐ３９６Ｌ（ＳｔａｖｅｎｈａｇｅｎＪＢ，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）；Ｆ２４３Ｌ（Ｓｔｅｗａｒｔ Ｒ，Ｔｈｏｍ Ｇ，ＬｅｖｅｎｓＭ，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）；
Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ａ３３０Ｌ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ（Ｌａｚａｒ ＧＡ，Ｄａｎｇ Ｗ，Ｋａｒｋｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００６ Ｍａｒ １４；１０３（１１）：４００５－１０）；Ｓ２３９Ｄ／Ｓ２６７Ｅ、Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ（Ｃｈｕ ＳＹ，Ｖｏｓｔｉａｒ Ｉ，Ｋａｒｋｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８ Ｓｅｐ；４５（１５）：３９２６－３３）；
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、並びに参照によって本明細書に組み込まれるＷＯ２０１１／１２０１３４及びＷＯ２０１１／１２０１３５に列挙されている他の突然変異。Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．Ｓｔｒｏｈｌ ａｎｄ Ｌｉｌａ Ｍ．Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ｓｅｒｉｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｎｏ １１，ＩＳＢＮ １ ９０７５６８ ３７ ９，Ｏｃｔ ２０１２）は、ＦｃのＦｃ－γ受容体への結合に影響を及ぼすＦｃへの追加の修飾について２８３頁に記載されている。
【０３６５】
エフェクター機能を改善するための追加の修飾
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物のＦｃは、エフェクター機能を改善するための修飾であり得る。このような修飾は、当該技術分野で公知であり、それらには、無フコシル化、またはＡＤＣＣのための受容体、主にＦＣＧＲ３ａの活性化及びＣＤＣのためのＣ１ｑに向けてのＦｃ部分の親和性の操作が含まれる。次の表Ｙに、エフェクター機能を操作するために文献において報告された様々な設計をまとめる。
【０３６６】

表Y		
参照文献	突然変異	効果
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	無フコシル化	ADCC増加
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	ADCC増加
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	ADCC増加
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	ADCC増加
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	ADCC増加
Stewart, 2011	F243L	ADCC増加
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	ADCC増加
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	ADCC増加
Lazar, 2006	S239D/I332E	ADCC増加
Bowles, 2006	AME-D,非特定の突然変異	ADCC増加
Heider, 2011	37.1,開示されていない突然変異	ADCC増加
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	CDC増加

【０３６７】
従って、一実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、エフェクター機能の改善をもたらす、上記の表において記載したとおりの１つ以上のアミノ酸修飾を含む二量体Ｆｃを含み得る。別の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、エフェクター機能を改善するために無フコシル化されていてもよい。
【０３６８】
ＦｃＲｎ結合及びＰＫパラメーター
当該技術分野で公知のとおり、ＦｃＲｎへの結合は、細胞内取り込みされた抗体をエンドソームから血流へと戻して再循環させる（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、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結びついて、１～３週間の範囲の好ましい抗体血清半減期をもたらす。ＦｃＲｎへのＦｃの結合も、抗体輸送において重要な役割を果たす。従って、一実施形態において、Ｆｃは、ＦｃＲｎと結合するＦｃの能力を変更または促進する１つ以上のアミノ酸修飾を含む。
【０３６９】
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に機能的にカップリングされている本明細書に記載される１つ以上のヘテロ二量体を含み得る。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のリンカーを有してまたは有さずに、１つ以上のヘテロ二量体にカップリングされている。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のヘテロ二量体に直接カップリングされている。いくつかの態様において、Ｆｃは、１つ以上のリンカーで１つ以上のヘテロ二量体にカップリングされている。いくつかの態様において、Ｆｃは、リンカーによって、各ヘテロ二量体の重鎖にカップリングされている。
【０３７０】
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。
【０３７１】
さらなる任意の修飾

一実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、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）。このような修飾としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ＰＥＧ化、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、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などが挙げられるが、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などを含むが、これらに限定されない、公知の技術により行われ得る。

【０３７２】

別の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、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）コンジュゲートされ得る。ある特定の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、薬物、例えば、毒素、化学療法剤、免疫調節剤、または放射性同位体にコンジュゲートされる。ＡＤＣ（抗体－薬物複合体または抗原結合ポリペプチド構築物－薬物複合体）を調製するいくつかの方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第８，６２４，００３号（ポット法）、同第８，１６３，８８８号（一段階）及び同第５，２０８，０２０号（二段階法）に記載されている。いくつかの実施形態において、薬物は、メイタンシン、アウリスタチン、カリケアマイシン、またはそれらの誘導体から選択される。他の実施形態において、薬物は、ＤＭ１及びＤＭ４から選択されたメイタンシンである。

【０３７３】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、細胞毒性剤にコンジュゲートしている。「細胞毒性剤」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害または阻止し、及び／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、Ａｔ２１１、Ｉ１３１、Ｉ１２５、Ｙ９０、Ｒｅ１８６、Ｒｅ１８８、Ｓｍ１５３、Ｂｉ２１２、Ｐ３２、及びＬｕ１７７）、化学療法剤、及び小分子毒素などの毒素、または細菌、真菌、植物または動物由来の酵素活性毒素（それらの断片及び／またはその変異体を含む）を含むことを意図する。

【０３７４】

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。こ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などの毒素；腫瘍壊死因子、アルファ－インターフェロン、ベータ－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などのタンパク質、アポトーシス剤、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＡＩＭＩ（国際公開ＷＯ９７／３３８９９を参照されたい）、ＡＩＭ　ＩＩ（国際公開ＷＯ９７／３４９１１を参照されたい）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６：１５６７）、及びＶＥＧＩ（国際公開ＷＯ９９／２３１０５を参照されたい）；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」）、及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」））などの生物学的反応調節薬を含み得る。さらに、代替的な実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、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などの治療部分とコンジュゲートされ得る（放射性物質の例については上記を参照されたい）。ある特定の実施形態において、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。こ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、及びＺｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２６：９４３に記載されている。

【０３７５】

いくつかの実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、精製及び／または試験など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、タンパク質の同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。適当なタグとしては、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）、及びマルトース結合タンパク質などの、精製及び／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。このようなタグ付きタンパク質はまた、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切断部位などの切断部位を含むように遺伝子操作され得る。

【０３７６】

抗原結合ポリペプチド構築物の調製方法

上述のように、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、第１のヘテロ二量体及び第２のヘテロ二量体を含み得る。第１のヘテロ二量体は、少なくともＶＨ及びＣＨ１ドメインを有する免疫グロブリン重鎖またはその断片、及びＶＬドメイン及びＣＬドメインを有する免疫グロブリンラムダ軽鎖を含み、第２のヘテロ二量体は、少なくともＶＨ及びＣＨ１ドメインを有する免疫グロブリン重鎖またはその断片、及びＶＬドメイン及びＣＬドメインを有する免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む。免疫グロブリンポリペプチド配列は、本明細書に記載される優先的対合を促進するアミノ酸修飾を組み込むように遺伝子操作される。従って、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の場合には、典型的には、抗原結合ポリペプチド構築物を構成する２つの免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列またはそれらの断片、及び２つの免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列の４つの異なるポリペプチド配列が存在する。抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド配列及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド配列は、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）、及びＧｌｉｃｋ ａｎｄ Ｐａｓｔｅｒｎａｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ（ＡＳＭＰｒｅｓｓ，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、及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。

【０３７７】

抗原結合ポリペプチド構築物を構成する親抗体の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のポリヌクレオチド及びアミノ酸配列は、当該技術分野で公知であるか、または核酸及び／またはタンパク質配列決定法を用いて容易に決定することができるのいずれかである。

【０３７８】
従って、抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖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セットも提供される。このようなポリヌクレオチドには、一本鎖及び二本鎖の両方の形態におけるＤＮＡ及びＲＮＡ、並びに対応する相補配列が含まれる。ＤＮＡには、例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、化学的に合成されたＤＮＡ、ＰＣＲにより増幅されたＤＮＡ、及びそれらの組み合わせが含まれる。ポリヌクレオチドには、全長遺伝子またはｃＤＮＡ分子、並びにそれらの断片の組み合わせが含まれる。
【０３７９】
本明細書に記載される遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、カセット変異導入もしくはＰＣＲ変異導入または当該技術分野において周知の他の技術を用いて、ポリペプチドをコードするＤＮＡ内のヌクレオチドを部位特異的に変異させて、遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードするＤＮＡを生成し、その後、本明細書で概説されるようにその組換えＤＮＡを細胞培養液中で発現させることによって調製することができる。しかしながら、遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、確立された技術を用いて、インビトロ遺伝子合成によって調製されてもよい。
【０３８０】
当業者には明らかであるが、遺伝暗号の縮重のために、極めて多数のポリヌクレオチドが作製され得、それらは全て、本明細書に記載される遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする。従って、特定のアミノ酸配列を特定した後、当業者は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させないように１つ以上のコドンの配列を単に修飾することによって、異なるポリヌクレオチドをいくつも作製することができる。
【０３８１】
さらに提供されるのは、上記の少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態にある、発現系及び構築物である。さらに提供されるのは、このような発現系または構築物を含む宿主細胞である。
【０３８２】
典型的には、宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド保持のための配列、並びに外来性ヌクレオチド配列のクローニング及び発現のための配列を含有している。このような配列は、ある特定の実施形態において集合的に「フランキング配列」と称されているが、典型的には、以下のヌクレオチド配列：プロモーター、１つ以上のエンハンサー配列、複製開始点、転写終結配列、ドナー及びアクセプタースプライス部位を含有する完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入するためのポリリンカー領域、並びに選択マーカーエレメントのうちの１つ以上を含む。ベクターは、マルチシストロン性、すなわち、抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドのうちの２つ以上を発現することができ、または抗原結合ポリペプチド構築物は、ベクターセットによって発現することができ、各ベクターは、ポリヌクレオチドのうちの１つ以上を発現する。抗原結合ポリペプチド構築物は、マルチシストロン性ベクターと、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の１つをコードする単一ポリヌクレオチドを含むベクターの組み合わせを含むベクターセットを用いて発現することもできる。
【０３８３】
いくつかの実施形態において、ベクターは、「タグ」コード配列、すなわち、ポリペプチドコード配列の５’または３’末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含有してもよく；オリゴヌクレオチド配列は、市販の抗体が存在する、ポリＨｉｓ（例えば、ヘキサＨｉｓ）、またはＦＬＡＧ、ＨＡ（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）、もしくはｍｙｃなどの別の「タグ」をコードしている。このタグは、典型的には、ポリペプチドの発現時にポリペプチドに融合され、宿主細胞からポリペプチドを親和性精製または検出するため

の手段として機能し得る。親和性精製は、例えば、タグに対する抗体を親和性マトリックスとして使用するカラムクロマトグラフィによって達成することができる。必要に応じて、タグは、その後、ペプチダーゼ切断などの様々な手段によって精製したポリペプチドから除去することができる。

【０３８４】

ベクターは、典型的には、宿主生物によって認識され、かつ、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーターを含有している。プロモーターは、構造遺伝子（一般には、約１００～１０００ｂｐ）の開始コドンの上流（すなわち、５’側）に位置する、構造遺伝子の転写を制御する非転写配列である。プロモーターは、従来は、２つのクラス：誘導性プロモーター及び構成的プロモーターのうちの１つに分類される。誘導性プロモーターは、栄養分の有無または温度変化などの培養条件におけるいくつかの変化に応答して、その支配下にあるＤＮＡからの転写のレベルを増加させて開始する。一方、構成的プロモーターは、それが機能的に連結した遺伝子を一律に転写する、すなわち、遺伝子発現に対する制御はほとんどない。種々の有望な宿主細胞によって認識される多くのプロモーターがよく知られている。

【０３８５】

酵母宿主、細菌宿主、及び昆虫宿主との使用に適したプロモーターも、当該技術分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳類宿主細胞との使用に適したプロモーターは周知であり、限定されないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、最も好ましくはシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）などのウイルスのゲノムから得られるプロモーターが含まれる。他の適切な哺乳類プロモーターには、異種哺乳類プロモーター、例えば、熱ショックプロモーター及びアクチンプロモーターが含まれる。

【０３８６】

ベクターは、ベクターが宿主細胞ゲノムに組み込まれた際に発現を促進する１つ以上の要素を含有していてもよい。例としては、ＥＡＳＥ要素（Ａｌｄｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．２００３ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｐｒｏｇ．１９：１４３３－３８）及びマトリックス結合領域（ＭＡＲ）が挙げられる。ＭＡＲは、クロマチンの構造構築を媒介し、組み込まれたベクターを「位置」効果から防護し得る。従って、安定な形質移入体を作製するためにベクターが使用される場合に、ＭＡＲは特に有用である。多くの天然及び合成ＭＡＲ含有核酸が、当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第６，２３９，３２８号；同第７，３２６，５６７号；同第６，１７７，６１２号；同第６，３８８，０６６号；同第６，２４５，９７４号；同第７，２５９，０１０号；同第６，０３７，５２５号；同第７，４２２，８７４号；同第７，１２９，０６２号である。

【０３８７】

ベクターが構築され、ポリヌクレオチドがベクターの適切な部位に挿入された後、完成したベクターを、増幅及び／またはポリペプチド発現に適した宿主細胞に挿入してもよい。選択された宿主細胞への発現ベクターの形質転換は、周知の方法、例えば、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在性トランスフェクション、または他の公知の技術により達成することができる。選択される方法は、部分的には、使用される宿主細胞の型の機能である。宿主細胞は、一過性にトランスフェクトすることができ、または宿主細胞は、安定的にトランスフェクトすることができる。これらの方法及び他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、上記Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１に記載されている。

【０３８８】

組換えタンパク質の長期的な高収量の産生のために、安定的な発現が好ましいことが多い。例えば、抗原結合ポリペプチド構築物の遺伝子操作された重鎖及び軽鎖を安定的に発現する細胞株が、作製され得る。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用する

のではなく、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリアデニル化部位など）、及び選択可能マーカーによって制御されるＤＮＡで形質転換され得る。外来性ＤＮＡまたはポリヌクレオチドの導入の後、遺伝子操作された細胞は、富化培地中で１～２日間成長させられ得、次いで、選択培地に移される。組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞の染色体中にプラスミドを安定的に組み込ませ、増殖して病巣を形成し、この病巣が、次にクローニングされ、細胞株に拡張され得る。

【０３８９】

多くの選択系が使用され得、これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：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）、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２：８１７）が、ｔｋ－細胞、ｈｇｐｒｔ－細胞もしくはａｐｒｔ－細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗剤耐性が、以下の遺伝子についての選択の基礎として使用され得る：ｄｈｆｒ（メトトレキサートに対する耐性を与える（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５７；Ｏ’Ｈａｒｅ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：１５２７））；ｇｐｔ（ミコフェノール酸に対する耐性を与える（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ＆ Ｂｅｒｇ，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：２０７２））；ｎｅｏ（アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与える（Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１））；及びｈｙｇｒｏ（ハイグロマイシンに対する耐性を与える（Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｇｅｎｅ ３０：１４７）。

【０３９０】

宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、後に、培地から（宿主細胞が抗原結合ポリペプチド構築物を培地中に分泌する場合）、または抗原結合ポリペプチド構築物を産生する宿主細胞から直接（抗原結合ポリペプチド構築物が分泌されない場合）回収することができる、抗原結合ポリペプチド構築物を産生する。適切な宿主細胞の選択は、種々の要因、例えば、所望の発現レベル、活性に望ましいまたは必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、及び生物学的に活性な分子への折り畳みのし易さに依存する。宿主細胞は、真核生物であっても原核生物であってもよい。例えば、細菌系における発現は、非グリコシル化産物を産生し、酵母における発現は、グリコシル化産物を産生する。遺伝子産物の一次転写産物（例えば、グリコシル化またはリン酸化）を適切に処理するための細胞機構をもつ真核宿主細胞を使用することができる。

【０３９１】

発現用の宿主として利用できる哺乳類細胞株は、当該技術分野において周知であり、例えば、限定はされないが、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ）から入手できる不死化細胞株が挙げられ、当該技術分野において公知の発現系において使用されるいかなる細胞株も、本明細書に記載される組換えポリペプチドを作製するために使用することができる。一般に、宿主細胞は、抗原結合ポリペプチド構築物をコードするＤＮＡを含む組換え発現ベクターで形質転換される。使用することができる宿主細胞としては、原核生物、酵母またはより高等真核細胞が挙げられる。原核生物には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物（例えば、大腸菌または桿菌）が含まれる。高等真核細胞には、昆虫細胞、哺乳類起源の株化細胞系が含まれる。適切な哺乳類宿主細胞株の例としては、サル腎細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）（Ｇｌｕｚｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｃｅｌｌ ２３：１７５）、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞もしくはその誘導体（例えば、Ｖｅｇｇｉｅ ＣＨＯ）及び無血清培地中で増殖する関連細胞株（Ｒａｓｍｕｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２８：３１）、ＨｅＬａ細胞、ＢＨ

Ｋ（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １０）細胞株、及びＭｃＭａｈａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：２８２１に記載のアフリカミドリザル腎細胞株ＣＶＩ（ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）に由来するＣＶ１／ＥＢＮＡ細胞株、ヒト胚腎臓細胞（例えば２９３、２９３ＥＢＮＡまたはＭＳＲ２９３）、ヒト上皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から得られる細胞株、初代移植物、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫまたはＪｕｒｋａｔ細胞が挙げられる。あるいは、下等真核生物（例えば、酵母）または原核生物（例えば、細菌）でポリペプチドを産生することが可能である。適切な酵母としては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｔｒａｉｎ、Ｃａｎｄｉｄａ、または異種ポリペプチドを発現可能なあらゆる酵母菌株が挙げられる。適切な菌種としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、または異種ポリペプチドを発現可能なあらゆる菌種が挙げられる。

【０３９２】

抗原結合ポリペプチドが酵母または細菌内でつくられる場合、機能的産物を得るために、それらの中で産生される産物を、例えば、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化により、修飾することが望ましい場合がある。このような共有結合は、公知の化学的手法または酵素法を用いて達成することができる。抗原結合ポリペプチド構築物は、ポリヌクレオチドセットを１つ以上の昆虫発現ベクター内の適切な制御配列に機能的に連結して、昆虫発現系を使用することによっても、生成することができる。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系のための材料及び方法は、例えば、インビトロジェン社（米国カリフォルニア州サンディエゴ）（ＭａｘＢａｃ（登録商標）キット）からキットの状態で販売されており、このような方法は、当該技術分野において周知であり、Ｓｕｍｍｅｒｓ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｔｅｘａｓ Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ Ｓｔａｔｉｏｎ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ Ｎｏ．１５５５（１９８７）、及びＬｕｃｋｏｗ ａｎｄ Ｓｕｍｍｅｒｓ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：４７（１９８８）に記載されている。細菌宿主、真菌宿主、酵母宿主、及び哺乳類細胞宿主と使用するのに適したクローニングベクター及び発現ベクターは、Ｐｏｕｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ．（Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８５）に記載されている。

【０３９３】

ある特定の実施形態において、無細胞タンパク質発現系を利用して、生細胞を用いずに、ポリヌクレオチドセットからポリペプチド（例えば、重鎖及び軽鎖ポリペプチド）を同時発現することができる。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全ての成分（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。ある特定の実施形態において、インビトロ発現は、（１）重鎖及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）、並びに（２）必須の転写及び翻訳の分子機構を含む反応溶液を必要とする。ある特定の実施形態において、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、及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、哺乳類細胞、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、翻訳に必要な酵素及び構成要素の正しい組成物及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、細胞の細胞質及び細胞小器官成分のみを残す。

【０３９４】

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としては、Ｅ．ｃｏｌｉ由来のものが挙げられる。真核無細胞タンパク質発現系は、例えば、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽、及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及び真核生物の無細胞タンパク質発現系は、Ｒｏｃｈｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｑｉａｇｅｎ、及びＮｏｖａｇｅｎなど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、重鎖及び軽鎖ポリペプチド）を生成し得る適切な無細胞タンパク質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）及びイソメラーゼ（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。

【０３９５】

重鎖及び軽鎖の同時発現

本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物の遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、上述のように、哺乳類細胞中で同時発現することができる。一実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物の免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖は、宿主細胞中で同時発現される。従って、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の場合には、２つの免疫グロブリン重鎖及び２つの免疫グロブリン軽鎖は、宿主細胞中で同時発現される。しかし、４つの鎖全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原結合ポリペプチド構築物の別の生成方法が、当該技術分野でも知られている（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及び重鎖の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、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体は、２つの異なる細胞株において発現されて、２つのヘテロ二量体を独立して生成することができる。続いて、２つのヘテロ二量体を選択酸化還元条件下で混合し、２つの固有の重鎖Ｈ１及びＨ２の再会合を達成し、Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２を含む二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を形成する。

【０３９６】

優先的対合は、Ｍａｂ設計セットアミノ酸修飾を免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドに組み込むことによって主に駆動されるが、正しく対合されたヘテロ二量体の量は、実施例に示されるように、各ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの比を互いに変化させることによってさらに最適化してもよい。

【０３９７】

抗原結合ポリペプチド構築物の試験

上述のように、抗原結合ポリペプチド構築物は、Ｈ１及びＬ１を含む第１のヘテロ二量体、並びにＨ２及びＬ２を含む第２のヘテロ二量体を含み、Ｌ１は、ラムダ軽鎖であり、Ｌ２は、カッパ軽鎖であり、Ｈ１及びＨ２は、互いに異なる。Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、Ｌ２と比較してＬ１とＨ１の優先的対合を促進し、Ｌ１と比較してＬ２とＨ２の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を含む。Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体の第１のＦａｂ領域、及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の第２のＦａｂ領域は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域または野生型の第２のＦａｂ領域と類似の親和性を有する抗原と結合することができる。Ｈ１Ｌ１ヘテロ二量体の第１のＦａｂ領域、及びＨ２Ｌ２ヘテロ二量体の第２のＦａｂ領域は、対応する野生型の第１のＦａｂ領域または野生型の第２のＦａｂ領域のものに匹敵する熱安定性も示す。

【０３９８】

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。

【０３９９】

一実施形態において、１つの重鎖は、上述のような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、ここで、重鎖は、２つの軽鎖のうちの１つと優先的に対合す

る。別の実施形態において、２つの固有の重鎖は、２つの固有の軽鎖と同時発現され、ここで、各重鎖は、軽鎖のうちの１つと優先的に対合する。

【０４００】

優先的対合を測定する方法

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、及び実施例において評価することができる。優先的対合は、ＬＣＣＡ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｌ２、またはＨ２Ｌ１Ｌ２）またはＭａｂ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）の文脈において評価することができる。

【０４０１】

一実施形態において、軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）は、ＬＣＣＡ設計セットの文脈において優先的対合を評価するために使用することができる。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、全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、重鎖及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つの重鎖及び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る。重鎖及び軽鎖は、検出を容易にするためにタグ付けされてもよい。分泌タンパク質は、細胞から分離されてもよく、重鎖に結合する免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドは、他の分泌タンパク質から分離し、単離された重鎖と対合した画分を生成する。その後、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し、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、重鎖が軽鎖のうちの１つと選択的に対合する能力を判定する。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。

【０４０２】

別の実施形態において、優先的対合は、Ｍａｂ設計セットの文脈において評価され、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２は、同時発現される。この実施形態において、Ｈ１、Ｌ２、Ｈ２、及びＬ２のうちの１つ以上は、検出及び分析を容易にするためにタグ付けされてもよい。得られた種の対合重鎖及び軽鎖は、各々の種の分子量の差に基づいて、ＬＣＭＳ（液体クロマトグラフィー－質量分析）を用いて評価される。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。

【０４０３】

熱安定性

ヘテロ二量体の熱安定性は、当該技術分野で公知の方法に従って決定することができる。各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、示差走査熱量測定のような技術を用いて測定することができる（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ（２００３）Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ ２０：１９５２－６０；Ｇｈｉｒｌａｎｄｏ ｅｔ ａｌ（１９９９）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ６８：４７－５２）。あるいは、ヘテロ二量体の熱安定性は、円二色性を用いて測定することもできる（Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｓｃｉ ４０：３４３－９）。

【０４０４】

抗原に対する親和性

ヘテロ二量体のそれぞれの抗原への結合親和性、及び、相互作用のオフ・レート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）は、当該技術分野で周知の方法に従って競合的結合アッセイによって決定することができる。競合的結合アッセイの一例は、増大量の非標識抗体の存在下における標識抗原（本明細書に記載されるヘテロ二量体（例えば、３Ｈまたは１２５Ｉ）と対象となる分子）とのインキュベーション、及び標識リガンドと結合した分子の検出を含む、放

射性イムノアッセイである。抗原に対するヘテロ二量体の親和性及び結合オフ・レートは、スキャッチャードプロット解析による飽和データから決定することができる。

【０４０５】

また、当該技術分野で公知の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）ベースアッセイを用いて、本明細書に記載されるヘテロ二量体の速度論的パラメーターを決定することができる（ＢＩＡｃｏｒｅ速度分析）。ＳＰＲベース技術の概説については、Ｍｕｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｍｅｔｈｏｄｓ２２：７７－９１；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を参照されたい。さらに、米国特許第６，３７３，５７７号；第６，２８９，２８６号；第５，３２２，７９８号；第５，３４１，２１５号；第６，２６８，１２５号に記載のタンパク質－タンパク質相互作用を測定するためのＳＰＲ装置及びＳＰＲに基づく方法のいずれも本発明の方法において考えられる。当該技術分野で公知のように、ＦＡＣＳを使用して、親和性を測定することもできる。

【０４０６】

薬学的組成物

また、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物を含む薬学的組成物である。このような組成物は、治療的に有効量の抗原結合ポリペプチド構築物、及び薬学的に許容される担体を含む。特定の実施態様において、「薬学的に許容される」という用語は、連邦または州政府の監督官庁による承認、または米国薬局方、もしくは動物、さらに詳しくはヒトに用いるための一般に認識された他の薬局方に記載された承認を意味する。「担体」という用語は、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指し、これらと一緒に治療剤は投与され得る。そのような薬学的キャリアは、無菌性液体（例えば、水及び油）であり得、これらとしては、石油からなる油、動物油、植物油または合成由来の油（例えば、落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油など）が挙げられるが、これらに限定されない。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に好ましい担体である。さらに、生理食塩水溶液及び水性デキストロース溶液及びグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に、注射用溶液のために用いられ得る。適切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、麦芽、イネ、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望される場合、組成物はまた、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはｐＨ緩衝剤を含有し得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳化剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態を取り得る。この組成物は、坐剤として、伝統的な結合剤及び担体（例えば、トリグリセリド）とともに処方され得る。経口製剤は、標準的な担体（例えば、薬学的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、炭酸マグネシウムなど）を含み得る。適切な薬学的担体の例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載されている。このような組成物は、治療的に有効量の化合物を、好ましくは精製された形態において、患者に対して適切な投与のための形態を提供するために適切な量の担体と共に含有する。この製剤は、投与の様式に適合されるべきである。

【０４０７】

ある特定の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物を含む組成物は、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、及び注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬も含み得る。一般に、これら成分は、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。

【０４０８】

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、酒石酸など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、及びナトリウム、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、プロカインなど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。

【０４０９】

治療用タンパク質の異常な発現及び／または活性と関連する疾患または障害の治療、阻害、及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、標準的な臨床技術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、及び疾患または障害の重症度に依存し、施術者の判断及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。

【０４１０】

抗原結合ポリペプチド構築物の使用

上述のように、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、親抗体から得られ、ここで、抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体は、親抗体の１つに対応し、ヘテロ二量体を構成する免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の優先的対合を促進するアミノ酸修飾を組み込むように遺伝子操作されている。従って、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、親抗体または親抗体の組み合わせを使用する同じ疾患、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。

【０４１１】

別の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物はまた、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利用され得る。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物は、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、及びＩＬ－７など）と組み合わせて使用され得る。本明細書に記載される抗原結合ポリペプチド構築物はまた、例えば、抗癌剤、抗炎症剤、または抗ウイルス剤などの疾患、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利用され得る。

【０４１２】

Ｍａｂ設計セットライブラリーを用いた、二重特異性抗体の生成

一実施形態において、本明細書に記載されるＭａｂ設計セットは、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を産生するために使用することができる。本明細書に記載されるＭａｂ設計セットは、Ｍａｂ設計セットライブラリーの形態で利用することができ、Ｍａｂ設計セットライブラリーは、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を形成するために優先的対合を促進する上で有用性を示すＭａｂ設計セットを含む。一実施形態において、Ｍａｂ設計セットライブラリーは、表４Ａ及び表４Ｂに含まれるＭａｂ設計セットによって表される。一実施形態において、Ｍａｂ設計セットライブラリーは、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２及び１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０のうちの１つ以上におけるＭａｂ設計セットによって表される。別の実施形態において、Ｍａｂ設計セットライブラリーは、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２のうちの１つ以上によって表される。一実施形態において、Ｍａｂ設計セッ

トライブラリーは、表１０－Ｂ１、１０－Ｂ２、１０－Ｂ３、１０－Ｂ４、１０－Ｂ６、１０－Ｂ８、及び１０－Ｂ１０のうちの１つ以上によって表される。Ｍａｂ設計セットライブラリーは、以下のように２つの親抗体（すなわち、Ｍａｂ１及びＭａｂ２）から出発する抗原結合ポリペプチド構築物を産生するために使用することができる。説明のために、Ｍａｂ１は、ラムダＦａｂを含み、かつ、免疫グロブリン重鎖ポリペプチドＨ１及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドＬ１を含む一方、Ｍａｂ２は、カッパＦａｂを含み、かつ、免疫グロブリン重鎖ポリペプチドＨ２及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドＬ２を含む。

【０４１３】

Ｍａｂ設計セットライブラリーのＭａｂ設計セットアミノ酸修飾（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）は、Ｍａｂ１の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖（Ｈ１及びＬ２）及びＭａｂ２の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖（Ｈ２及びＬ２）に導入される。その後、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２が同時発現され、正しく対合された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量が決定される。Ｍａｂ設計セットライブラリーの１つ以上のＭａｂ設計セットは、どれが所望量の二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を提供するかを決定するために個別に試験またはスクリーニングしてもよい。二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の各ヘテロ二量体は、各ヘテロ二量体が抗原と結合する能力を評価する、または本明細書に記載されるようにその熱安定性を評価するためにさらに試験することができる。評価することができるさらなる特性には、親抗体または親抗体のＦａｂ領域と比較して、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の溶解性、凝集、ｋｏｎ及びｋｏｆｆ速度、酸、塩基、酸化、凍結／解凍サイクル、振とう、圧力などへの暴露に耐える能力が含まれる。後者の特性は、対象となる抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）によって影響を受けることができるため、生成された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物ごとに試験してもよい。

【０４１４】

いくつかの実施形態において、正しく対合された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量は、ＬＣＭＳによって評価される。いくつかの実施形態において、正しく対合された二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物の量は、キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）技術またはクロマトグラフ技術などの電荷に基づいた分離技術によって評価される。Ｍａｂ設計セットのライブラリーを用いてＭａｂ１及びＭａｂ２から二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を調製するための手順を図９に概略的に示す。

【０４１５】

一実施形態において、Ｍａｂ設計セットライブラリーは、二重特異性抗原結合ポリペプチド構築物を設計するためにＭａｂ設計セットライブラリーの使用を容易にするように、コンピューター読み取り可能な記憶媒体に保存される。

【０４１６】

コンピューター実装

一実施形態において、コンピューターは、チップセットに連結された少なくとも１つのプロセッサーを含む。また、チップセットには、メモリー、記憶装置、キーボード、グラフィックアダプター、ポインティングデバイス、及びネットワークアダプターが連結されている。ディスプレイは、グラフィックアダプターに連結されている。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ーハブ及びＩ／Ｏコントローラーハブにより提供される。別の実施形態において、メモリーは、チップセットではなくプロセッサーに直接連結されている。

【０４１７】

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ー（ＣＤ－ＲＯＭ）、ＤＶＤ、またはソリッドステート記憶装置である。メモリーは、プロセッサーにより使用される命令及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ー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。グラフィックアダプターは、画像及び他の情報をディスプレイ上に表示する。ネットワークアダプターは、コンピューター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。
【０４１８】
当該技術分野で知られているように、コンピューターは、前述のものとは異なる及び／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、コンピューターは、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、コンピューターからローカル及び／またはリモートであることもできる（例えば、記憶エリアネットワーク（ＳＡＮ）内に具現化されるなど）。
【０４１９】
当該技術分野で知られているように、コンピューターは、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ー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場合、「モジュール」との用語は、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ープラグラム論理を指す。従って、モジュールは、ハードウェア、ファームウェア、及び／またはソフトウェアに実装され得る。プログラムモジュールは、記憶装置上に記録され、メモリーにロードされ、プロセッサーにより実行される。
【０４２０】
本明細書に記載される実施例及び実施形態は、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、本出願の主旨及び範囲並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】
【０４２１】
下記は、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチド構築物を作製し、使用するための具体的な実施形態の実施例である。実施例は、例証となる目的のためにのみ提供され、本開示の範囲を限定するようには決して意図されない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関しては正確性を確実にするための努力がなされているが、ある程度の実験的誤差及び偏差は、当然ながら許容されるべきである。
【０４２２】
本明細書に記載の構築物及び方法は、特に指示がない限り、当該技術分野の技能内の、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術、及び薬理学の従来の方法を使用することによって調製し、実施することができる。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）を参照されたい。
実施例
【０４２３】
実施例１：Ｆａｂ接続部分の分子モデリング及びコンピューターガイド付き遺伝子操作
構造－及びコンピューター分子モデリング－ガイド付きのアプローチを使用して、一方のＦａｂがカッパ軽鎖を有し、他方のＦａｂがラムダ軽鎖を有する二重特異性抗体（すなわち、カッパ－ラムダ系、またはＫ－Ｌ系）を調製するためのカッパ－ラムダ（Ｋ－Ｌ）設計ライブラリーを生成した。Ｋ－Ｌ設計ライブラリーは、これらの重鎖及び軽鎖を同時発現させる場合に所望の二重特異性抗体の優先的形成を促進するＦａｂの重鎖及び軽鎖に

おいてアミノ酸修飾を有する設計を含む。Ｋ－Ｌ設計ライブラリーは、二重特異性抗体におけるカッパ及びラムダ軽鎖の間の固有の差を利用するため、カッパ－ラムダ系に対して最適化される。Ｋ－Ｌ設計ライブラリーは、代表的なＦａｂの構造、カッパ軽鎖を含有する代表的なＦａｂ（カッパＦａｂ）としてＤ３Ｈ４４（抗組織因子抗体）、及びラムダ軽鎖を含有する代表的なＦａｂ（ラムダＦａｂ）としてＣＡＴ－２２００（抗ＩＬ－１７Ａ抗体）の構造を研究することによって生成したが、ライブラリーは、対象となる抗体において所望の対合特異性を示す設計を同定するために、他の二重特異性Ｋ－Ｌ系抗体またはその断片の文脈において使用することができる。

【０４２４】

代表的なＦａｂは、表１に示した基準に基づいて選択された。これらの基準には、ヒトまたはヒト化であるＦａｂは、ＶＨ及びＶＬサブグループで一般に使用されており、最小のフレームワーク領域突然変異を含有することが含まれた。また、利用可能な非冗長（配列同一性閾値が９０％）カッパ及びラムダ構造によるペアワイズ３Ｄ重ね合わせを行った（ＲＳＣＢ　ＰＤＢから得られた構造、ラトガース大学（カムデン、ＮＪ）及び米国カリフォルニア大学サンディエゴ校（サンディエゴ、ＣＡ）によって維持されたデータベース、インターネット：ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇを参照されたい）。表１に記載した他のパラメーターと一緒に、ＶＨ－ＶＬまたはＣＨ１－ＣＬに対する低Ｈ－Ｌクロスドメイン ＲＭＳＤ（二乗平均平方根偏差）を使用して、カッパ及びラムダ系のそれぞれの代表的な構造を選択した。代表的なＦａｂとしてＤ３Ｈ４４（ＰＤＢ　ＩＤ　１ＪＰＴ）及びＣＡＴ－２２００（ＰＤＢ　ＩＤ　２ＶＸＳ）を選択後、２方向アプローチを用いた重鎖と軽鎖の間の相互作用に重要な残基を同定し、理解するために、これらのＦａｂ接続部分のインシリコ構造分析を実施した。

【０４２５】

最初に、Ｆａｂ可変及び定常接続部分にわたる配列保存のグローバル分析を、公知の抗体の配列及び構造アライメントを介して実施した。Ｄ３Ｈ４４及び抗ＨＥＲ２抗体ペルツズマブ（両方ともカッパ軽鎖を含有する）及びＣＡＴ－２２００（ラムダ軽鎖を含有する）の配列と比較した、種々の抗体サブグループからの定常及び可変ドメイン配列のアライメントを図１に示す。図１Ａ及び図１Ｅは、それぞれ、代表的なヒトＶＨ生殖細胞系列サブグループをＤ３Ｈ４４／ペルツズマブ及びＣＡＴ－２２００のものと比較したアライメントを示す。図１Ｂは、代表的なヒトカッパＶＬ生殖細胞系列サブグループをＤ３Ｈ４４／ペルツズマブと比較したアライメントを示す。図１Ｃ及び図１Ｇは、それぞれ、ヒトＣＨ１対立遺伝子配列をＤ３Ｈ４４／ペルツズマブ及びＣＡＴ－２２００のものと比較したアライメントを示す。図１Ｄは、Ｄ３Ｈ４４／ペルツズマブをヒトカッパ対立遺伝子配列と比較したアライメントを示す。図１Ｆは、ＣＡＴ－２２００を代表的なヒトラムダＶＬ生殖細胞系列サブグループと比較したアライメントを示す。図１Ｈは、ＣＡＴ－２２００をヒトラムダ対立遺伝子配列と比較したアライメントを示す。ペルツズマブ及びＤ３Ｈ４４は、カッパ定常及び可変ドメイン生殖細胞系列による高度の配列保存を示す一方、ＣＡＴ－２２００は、ラムダ定常及び可変ドメイン生殖細胞系列による高度の配列保存を示すことが、この分析により明らかになった。また、これらのアライメントは、重鎖及び軽鎖の両方の定常ドメインにおける高度の保存を例示しており、定常ドメイン接続部分における設計により、他の抗体に移動可能にする可能性を高くさせる。

【０４２６】

第２のアプローチは、図２に示すように、多くの分子モデリングツールを用いたＤ３Ｈ４４及びＣＡＴ－２２００結晶構造接続部分の分析を伴った（例えば、ＲｅｓｉｄｕｅＣｏｎｔａｃｔｓ（商標）及びＡｆｆｉｎｉｔｙＤｅｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ（商標））。他の抗体または断片への移動可能性を改善するため、分析は、配列保存がより高い定常ドメインに焦点を当てた（図１を参照）。これらの分析を使用して、表２に示すように、代表的なカッパＦａｂ（Ｄ３Ｈ４４）構造とラムダＦａｂ（ＣＡＴ－２２００）構造の間のホットスポット位置（重要な接続部分残基）における差を同定した。ＣＨ１－ＣＬ（カッパ）構造とＣＨ１－ＣＬ（ラムダ）構造の間の定常ドメインにおいて顕著な立体配座の差

が存在する。ＣＨ１ドメイン上に利用可能なＦａｂ構造を重ね合わせることで、ＣＬ（カッパ）構造が非常に類似の立体配座を採用し、タイトなクラスターを形成することが示された。しかしながら、ＣＬ（ラムダ）立体配座は、２つの異なるクラスターに存在する傾向があり：１つは、カッパ配向（カッパ様クラスター）に近く、１つは、より矛盾した配向（ラムダクラスター）である。この分析によって、Ｄ３Ｈ４４は、一般的なカッパ構造を表し、ＣＡＴ－２２００は、一般的なラムダ構造（ラムダクラスター）を表す。図３は、代表的な構造として、Ｄ３Ｈ４４及びＣＡＴ－２２００を用いた一般的な定常ドメインカッパ－ラムダ立体配座の差を例示する。これらの差は、ＣＨ１ドメインに対する軽鎖定常ドメインの剛体運動から主に由来すると思われ、ラムダ系と比較した場合にカッパの定常ドメインにおけるＨ－Ｌ接続部分の性質を変える。同定されたホットスポット不一致（表２）並びに上述の立体配座の差（図３）は、カッパＦａｂ及びラムダＦａｂを含有する二重特異性系に対するＨ－Ｌ対設計の遺伝子操作の出発点として機能した。Ｋａｂａｔに従った親Ｄ３Ｈ４４及びＣＡＴ－２２００配列におけるアミノ酸の番号付けを表３Ａ及び表３Ｂに提供する。

【０４２７】

次に、３Ｄ結晶構造におけるホットスポット位置、並びに対象となるホットスポットに隣接する位置での可能性のある突然変異を、インシリコ突然変異誘発及びＺｙｍｅｐａｃｋ（商標）によるパッキング／モデリングを介してシミュレートされ、同定した。Ｚｙｍｅｐａｃｋ（商標）は、入力構造及び一連の突然変異が与えられた状態で、供給された突然変異に従って入力構造における残基タイプを変更して、突然変異タンパク質の物理的構造に近似している新しい構造を生成するソフトウェアスイートである。加えて、Ｚｙｍｅｐａｃｋ（商標）は、様々な定量的メトリックを計算することによって、突然変異タンパク質の特性を評価する。これらのメトリックには、突然変異タンパク質の安定性、結合親和性、またはヘテロ二量体特異性と相関し得る立体及び静電気的相補性の測定が含まれる。

【０４２８】

接続部分の不一致を利用することによって、突然変異を導入して、所望または好ましいポリペプチド鎖またはヘテロ二量体の選択的対合を促進しながら、誤って対合されたまたは誤対合のポリペプチド鎖またはヘテロ二量体の形成を嫌った。例えば、１つのカッパＦａｂ及び１つのラムダＦａｂを有する二重特異性抗体を調製するために、４つのポリペプチド鎖を必要とする。カッパＦａｂは、重鎖１（Ｈ１）及びカッパ軽鎖１（Ｌ１）を含むが、ラムダＦａｂは、重鎖２（Ｈ２）及びラムダ軽鎖２（Ｌ２）を含む。この場合、所望のＨ－Ｌ対合は、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２であるが、誤対合は、Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１である。ここで、ポリペプチド鎖の指定／番号付けは任意である点に留意されたい。従って、誤対合されたＣＨ１－ＣＬ（ラムダ）接続部分（Ｈ１Ｌ２）よりも対合されたＣＨ１－ＣＬ（カッパ）接続部分（Ｈ１Ｌ１）を好む突然変異、及び誤対合されたＣＨ１－ＣＬ（カッパ）接続部分（Ｈ２Ｌ１）よりも対合されたＣＨ１－ＣＬ（ラムダ）接続部分（Ｈ２Ｌ２）を好む突然変異を同定し、定常ドメインにおけるカッパＦａｂ－ラムダＦａｂ調整された設計を生成した。Ｚｙｍｅｐａｃｋ（商標）を含む計算法を用いて、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、及び疎水性基の密接な接触など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、及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。好ましい重鎖及び軽鎖対モデル（Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２）並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誤対合モデル（Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１）の両方をシミュレートして、相対的な立体的及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、不適切な対と比較して、好ましい重鎖－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。計算された立体的及び静電気的エネルギーは、軽鎖及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、より大きな立体的及び静電気的相補性は、不適切な対の対合と比較して、所望な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。より大きな立体的及び静電気的相補性は、不適切な対の立

体的ペナルティ及び／または静電気的反発と比較して、所望の重鎖及び軽鎖の優先的（選択的）対合をもたらす。

【０４２９】

実施例２：設計の選択及び説明

実施例１に記載のアプローチを使用して、Ｈ－Ｌヘテロ二量体対の一方がカッパ軽鎖を含有し、他方がラムダ軽鎖を含有する場合に選択的または優先的対合を示す重鎖－軽鎖ヘテロ二量体対（すなわち、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２）を設計する。ヘテロ二量体は、「Ｍａｂ設計」または「Ｍａｂ設計セット」と呼ばれる対で設計され、優先的対合を促進するＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２鎖上に一連のアミノ酸置換を含む。Ｍａｂ設計セットは、相対的対合を評価するために、Ｍａｂ設計セットの１つの重鎖を、Ｍａｂ設計セットの２つの軽鎖、１つのカッパ及び１つのラムダと同時発現させる「ＬＣＣＡ設計」として最初に試験した。実施例を通じて記載されたアミノ酸置換は、特に指示されない限り、Ｋａｂａｔ and Ｗｕ，１９９１；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ－ＵＳ Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｎｏ．９１－３２４２，ｐ６４７（１９９１）に記載されるようなＫａｂａｔ番号付けシステムを用いて、（ペルツズマブ及びＣＡＴ－２２００　Ｆａｂに対する）表３Ａ及び表３Ｂを参照しながら同定した。しかしながら、参考のため、表２２Ａ、２２Ｂ、及び２２Ｃは、該当するＩＭＧＴ、１ＪＰＴ、及びＥＵ番号付けシステムを用いて、重鎖、カッパ軽鎖、及びラムダ軽鎖中の選択されたアミノ酸位置の同定を提供する。

【０４３０】

Ｍａｂ設計を、Ｄ３Ｈ４４及びＣＡＴ－２２００の分子モデル上に載せ、メトリックを実施例１に記載されるように計算した。その後、（安定性並びに免疫原性に対する影響を最小にする）リスク、及び（ドライブ対合特異性の提案力を考慮する）影響に基づいて、トップの設計を選択した。次に、トップの設計を軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）によって試験し、それらの対合特異性を実験的に決定した（実施例４を参照）。代表的なＦａｂとしてＤ３Ｈ４４及びＣＡＴ－２２００を用いてＭａｂ設計を同定したが、カッパＦａｂとしてペルツズマブ、及びラムダＦａｂとしてＣＡＴ－２２００を用いて、Ｍａｂ設計をＫ－Ｌ系において試験した（ペルツズマブ－ＣＡＴ－２２００　Ｋ－Ｌ系）。図１Ｃ及び図１Ｄに示すように、Ｄ３Ｈ４４及びペルツズマブは、定常ドメインに同一配列を有し、２つの系でシームレスに相互変換することができる。これらのＭａｂ設計は、Ｋ－Ｌ設計と呼ばれる。

【０４３１】

第２の設計セットは、ペルツズマブ／ＣＡＴ－２２００　Ｋ－Ｌ系でも試験した。これらの設計は、出発点として国際特許出願第ＰＣＴ／ＣＡ２０１３／０５０９１４号（国際特許公開第ＷＯ２０１４／０８２１７９号）の表３０に記載のカッパ－カッパ（Ｋ－Ｋ）設計ライブラリーからの設計の多様性を反映した代表的な設計を用いて提案された。これらの代表的なＫ－Ｋ由来設計には、可能であれば、Ｋ－Ｌ系に修飾せずに移植された、またはカッパ及びラムダ軽鎖の配列及び構造の差を考慮して必要に応じてアミノ酸残基を修飾することでカッパ－ラムダ－系に適合されたかのいずれかである設計サブセットが含まれた。両方のタイプの代表的なＫ－Ｋ由来設計は、Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計と呼ばれる。

【０４３２】

Ｋ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の対合特異性は、実施例４に記載されるように、カッパ－ラムダ系におけるＬＣＣＡによってＬＣＣＡ設計として実験的に評価した。

【０４３３】

実施例３：ペルツズマブＩｇＧ重鎖、ペルツズマブＩｇＧ軽鎖、ＣＡＴ－２２００　ＩｇＧ重鎖、及びＣＡＴ－２２００　ＩｇＧ軽鎖をコードするＦａｂ構築物の調製

抗ＨＥＲ２抗体ペルツズマブ及び抗ＩＬ１７抗体ＣＡＴ－２２００の野生型Ｆａｂ重鎖及び軽鎖を、以下のように調製した。ペルツズマブＦａｂ軽鎖（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号

ＨＣ３５９０２５．１、配列番号２）及び重鎖（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＨＣ３５９０２４．１、配列番号１）のタンパク質配列をＤＮＡに逆翻訳し、哺乳動物発現のためにコドン最適化し、遺伝子を合成した（それぞれ、配列番号８及び７）。ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ軽鎖（２ＶＸＳ鎖Ｌ、配列番号４）及び重鎖（２ＶＸＳ鎖Ｈ、配列番号３）のタンパク質配列をＰＤＢエントリー２ＶＸＳから採取し、ＤＮＡに逆翻訳し、哺乳動物発現のためにコドン最適化し、遺伝子を合成した（それぞれ、配列番号１０及び９）。これらの抗体重鎖及び軽鎖のポリペプチド及びＤＮＡ配列を表３Ｃに示す。

【０４３４】

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またはＴＡＡストップ」－ＢａｍＨ１切断部位－３’からなる軽鎖ベクターの挿入を、ｐＴＴ５ベクター（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ　Ｙｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００２；３０，Ｎｏ．２　ｅ９）にライゲートし、軽鎖発現ベクターを産生した。得られた軽鎖発現ベクターは、コードＤＮＡの正しいリーディングフレーム及び配列を確認するために配列決定された。同様に、５’－ＥｃｏＲ1制限部位－ＨＬＡ－Ａシグナルペプチド－重鎖クローン（Ｔ２３８で終結する、表３Ａを参照）－ＡＢＤ$_2$－Ｈｉｓ６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を、ｐＴＴ５ベクター（ＡＢＤ$_2$＝タンデムに連結したアルブミン結合ドメインタンパク質の２つのコピー）にライゲートし、重鎖発現ベクターを産生した。得られた重鎖発現ベクターはまた、コードＤＮＡの正しいリーディングフレーム及び配列を確認するために配列決定された。Ｍａｂ設計セットのアミノ酸置換を含有する種々のペルツズマブまたはＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ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）。

【０４３５】

重鎖及び軽鎖は、それぞれ、競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニング（ＬＣＣＡ）により優先的対合の評価を促進するために、Ｃ及びＮ末端でタグ付けした。ＡＢＤ$_2$－Ｈｉｓ$_6$重鎖タグは、Ｈ－Ｌ複合体を抗ＨｉｓタグＳＰＲチップ表面上に捕捉させ、一方、ＦＬＡＧ及びＨＡ軽鎖タグは、相対的なＬ１及びＬ２集団を定量化した。

【０４３６】

実施例４：軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）による、設計されたＦａｂヘテロ二量体の優先的対合の評価

アミノ酸修飾を含むＦａｂ形式におけるＣＡＴ－２２００及びペルツズマブＩｇＧ重鎖及び軽鎖をコードする構築物は、実施例３に記載されたように調製された。ＬＣＣＡ設計セット（Ｈ１、Ｌ１、Ｌ２またはＨ２、Ｌ２、Ｌ１）の文脈において、構築物が優先的に対合して、所望のＨ－Ｌヘテロ二量体を形成する能力は、軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）を用いて決定された。

【０４３７】

ＬＣＣＡは、少なくとも２つの固有の軽鎖、１つのカッパ及び１つのラムダに対する１つの重鎖の相対的対合を定量化し、以下のようにまとめることができる。ラムダＦａｂの対合特異性を決定するため、１つのＣＡＴ－２２００重鎖Ｆａｂ構築物を、（対合されたＦａｂ産物Ｈ１Ｌ１の）１つのＣＡＴ－２２００軽鎖Ｆａｂ構築物及び（誤対合されたＦａｂ産物Ｈ１Ｌ２の）１つのペルツズマブ軽鎖Ｆａｂ構築物と同時発現させて、相対的軽鎖対合特異性（Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２）を競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニングから決定し、２回重複して行った。逆に、カッパＦａｂの対合特異性を決定するため、１つのペルツズマブ重鎖Ｆａｂ構築物を、（対合されたＦａｂ産物Ｈ２Ｌ２の）１つのペルツズマブ軽鎖Ｆａｂ構築物及び（誤対合されたＦａｂ産物Ｈ２Ｌ１の）１つのＣＡＴ－２２００軽鎖Ｆａｂ構築物と同時発現させて、相対軽鎖対合特異性（Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１）を競合アッセイ－ＳＰＲスクリーニングから決定し、２回重複して行った。

【０４３８】

ＬＣＣＡアッセイは、重鎖の量を制限して、Ｈ１：Ｌ１：Ｌ２またはＨ２：Ｌ２：Ｌ１

が１：１：１（重量）の比で重鎖及び軽鎖の付随発現によって行った。形成された各ヘテロ二量体（すなわち、Ｈ１Ｌ１及びＨ１Ｌ２またはＨ２Ｌ２及びＨ２Ｌ１）の量を、Ｈｉｓ－タグ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って決定した後、これらのタグに特異的な抗体を用いて、各軽鎖タグ（ＨＡまたはＦＬＡＧ）の量を検出した。その後、選択されたヘテロ二量体ヒットは、軽鎖競合アッセイ検証を介して検証することにより、Ｌ１：Ｌ２　ＤＮＡ比を１：１比で再度チェックしながら、重鎖の量を制限し続けた。これらの特定のカッパ－ラムダ系の組み合わせでは、軽鎖タグは、野生型ＬＣＣＡ対合に影響を与えることができ、期待された中立５０％：５０％比からの偏差をもたらす。そのため、中立からの偏差の最小量による配置は、ペルツズマブ軽鎖をＨＡタグと融合し、ＣＡＴ－２２００軽鎖をＦＬＡＧタグと融合することによって選択した。アッセイの設計を表す概略図を図４に示す。図５は、重鎖及び軽鎖がどのようにタグ付けされ、優先的対合をどのように評価するかを示す。ＬＣＣＡの実験的詳細を以下に提供する。

【０４３９】

トランスフェクション方法

実施例３に記載されたように調製された１つの重鎖構築物及び２つの軽鎖構築物を含むＬＣＣＡ設計を、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のグルタミン及び０．１％ＫｏｌｉｐｈｏｒＰ１８８（Ｓｉｇｍａ　＃Ｋ４８９４）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の総体積に対し、１：２．５のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｐｒｏ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓトランスフェクション番号１１５－３７５）を用いて合計２μｇのＤＮＡをトランスフェクトした。全てのトランスフェクションは、３３３ｎｇの各重鎖及び各軽鎖（すなわち、Ｈ１：Ｌ１：Ｌ２またはＨ２：Ｌ２：Ｌ１＝１：１：１比）、３００ｎｇのＡＫＴｄｄ　ｐＴＴ２２（構成的に活性なプロテインキナーゼＢ突然変異体を含有するベクター）、及び７００ｎｇのｓｓＤＮＡ（サケ精子ＤＮＡ）を用いて行った。ＤＮＡ－ＰＥＩ混合物を添加してから２４時間後に、０．５ｍＭのバルプロ酸（最終濃度）及び１％ｗ／ｖトリプトン（最終濃度）を細胞に添加した後、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。

【０４４０】

競合アッセイＳＰＲ方法

ＬＣＣＡ設計における２つの軽鎖の各々への優先的な重鎖対合の程度は、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。ＣＡＴ－２２００　ＬＣ構築物は、ＦＬＡＧタグを含有し、ペルツズマブＬＣ構築物は、ＨＡタグを含有する。

【０４４１】

表面プラズモン共鳴（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（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）、及びエタノールアミン）、及び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。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）、及びＮａＣｌは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｏａｋｖｉｌｌｅ，ＯＮ）から購入した。１０％Ｔｗｅｅｎ２０溶液は、Ｔｅｋｎｏｖａ（Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）から購入した。

【０４４２】

ＳＰＲバイオセンサーアッセイ。

全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（Ｃａｎａｄ

ａ）Ｌｔｄ．（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ））を用いて実行した。抗ペンタＨｉｓ（商標）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のＮａＯＡｃ　ｐＨ４．５中の抗ペンタＨｉｓ（商標）抗体（Ｑｉａｇｅｎ　Ｉｎｃ．）の２５μｇ／ｍＬの溶液を、おおよそ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、残りの活性基を急冷し、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。

【０４４３】

抗ＦＬＡＧ（Ｓｉｇｍａ　Ｉｎｃ．）及び抗ＨＡ（Ｒｏｃｈｅ　Ｉｎｃ．）のモノクローナル抗体と結合するための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（商標）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及び抗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１００μＬ／分で３０秒間の緩衝液の１回のＰＢＳＴ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場合、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の抗ＦＬＡＧ及び５ｎＭの抗ＨＡをそれぞれ、１８０秒の解離相をおいて、５０μＬ／分で１２０秒間二重に注入し、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。ヘテロ二量体を、０．８５％リン酸の１８秒間のパルスで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（商標）表面を調製した。緩衝液ブランクの注入及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。

【０４４４】

ＬＣＣＡメトリックのデータ分析及び説明

Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２形式で存在する、設計ごとの優先的対合の評価は、１つはＨ１Ｌ１Ｌ２組み合わせに対し、他方はＨ２Ｌ１Ｌ２組み合わせに対する２つの相補的なＬＣＣＡ設計セットによって評価した。各ＬＣＣＡ設計セットは、「固有の識別子」（例えば、１０６２９または１０６９５）で示される。その結果、各Ｍａｂ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）は、２つの構成ＬＣＣＡのＬＣＣＡ設計セット数（例えば、１０６２９－１０６９５）によって同定される。

【０４４５】

各Ｍａｂ設計セットのＬＣＣＡ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｌ２またはＨ２Ｌ１Ｌ２）をＬＣＣＡで試験し、対象となる設計セットは、以下の選択基準に基づいて同定した。対象となる設計を考慮するために、設計は、中立ゾーン（正しい対合：誤対合の比が、＞６０：４０）を上回る少なくとも１つの陽性ＬＣＣＡ結果を含有しなければならないが、他の相補的ＬＣＣＡは、図６に示すように、中立ゾーンの下限（正しい対合：誤対合の比が、４０：６０）を上回る必要があった。中立ゾーンは、Ｈ１－Ｌ１：Ｈ１－Ｌ２及びＨ２－Ｌ２：Ｈ２－Ｌ１の正規化された中央値を用いて、正しい対合：誤対合の比が４０％：６０％～６０％及び４０％の領域として定義した。例えば、図６のシナリオＡ及びＢは、選択基準を通過する設計を表す。Ｈ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１　ＬＣＣＡが中立ゾーンを上回り、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２　ＬＣＣＡが中立ゾーン内である（それを下回らない）ため、シナリオＢは含まれる。シナリオＣは、両方のＬＣＣＡ結果が陽性であるが、どちらも中立ゾーンを上回らない設計を表すため、含まれない。他のＬＣＣＡが中立ゾーンを下回っても、ＬＣＣ

Ａ結果のうちの少なくとも１つが中立ゾーンを下回るため、シナリオＤ及びＥは、除外される設計を表す（シナリオＤを参照）。表４Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び４Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）は、これらの基準を満たすＭａｂ設計セットを列挙しているが、表５Ａ及び５Ｂは、これらの設計のＬＣＣＡの結果を示す。ＬＣＣＡ設計セットまたはＭａｂ設計セットのアミノ酸置換を列挙する表４Ａ及び４Ｂ、並びにその後の全ての表では、表中の置換の不在、すなわち、「－」は、ポリペプチド鎖が、優先的対合を促進するアミノ酸置換を含まないことを示す。

【０４４６】

各ＬＣＣＡ設計セットの性能は、２つのスカラー値、ｌｎ（ｒ１／ｆ１）またはｌｎ（ｒ２／ｆ２）によって記載され、ｒ１及びｒ２は、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比のそれぞれの中央値に対応し、ｆ１及びｆ２は、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比のそれぞれの中央値に対応する。正規化されたスカラー値は、ＷＴ（野生型）系の寄与を設計から引くことによって生成される；$\ln(r1/f1)_{設計} - \ln(r1/f1)_{WT}$または$\ln(r2/f2)_{設計} - \ln(r2/f2)_{WT}$。ＣＡＴ－２２００（ＬＣ－ＦＬＡＧ）＋ペルツズマブ（ＬＣ－ＨＡ）に対して競合した野生型ＣＡＴ－２２００（ＨＣ）の場合、$\ln(r1/f1)_{WT} = -0.48$である。ペルツズマブ（ＬＣ－ＨＡ）＋ＣＡＴ－２２００（ＬＣ－ＦＬＡＧ）に対して競合した野生型ペルツズマブ（ＨＣ）の場合、$\ln(r2/f2)_{WT} = 0.66$である。この手順は、任意の既存の野生型対合バイアスを効率的に除去し、中立の５０％：５０％であるＬ１：Ｌ２野生型系と比較して特異性を正規化する。これらの値は、表５Ａ及び５Ｂの２及び５列目に報告される。

【０４４７】

加えて、正規化されたスカラー値は、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の正規化された純粋な中央値の比にも逆変換された。この変換は、Ｈ１Ｌ１及びＨ１Ｌ２またはＨ２Ｌ２及びＨ２Ｌ１の総量が１００％から著しく異なったいくつかの設計されたＦａｂで観察されたように、ＬＣＣＡ比を１００％に効率的に正規化した。軽鎖総パーセンテージの不一致は、一部は、ＳＰＲチップ上の最初のヘテロ二量体捕捉中に可変の非特異的結合の発生によると考えられる。これらの値は、表５Ａ及び５Ｂの４及び７列目に報告される。

【０４４８】

さらに、設計（Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１実験）の正規化されたＬＣＣＡごとのスカラー範囲、並びに正しく対合されたＦａｂヘテロ二量体対誤対合されたＦａｂヘテロ二量体の正規化された比の範囲（範囲は、正規化された比におけるＬ１のパーセンテージ及びＬ２のパーセンテージと同じである）を示す。単一測定から報告された結果では、範囲値は、ＮＡ（不適当）とマークする。これらの値は、表５Ａ及び５Ｂの３及び６列目に報告される。

【０４４９】

参照のため、表２３は、対合：誤対合されたヘテロ二量体と対応するＬＣＣＡスカラー値の％間の対応を提示する。

【０４５０】

結果

ＬＣＣＡ結果は、Ｍａｂ設計セットの文脈において表５Ａ及び５Ｂに示す。表５Ａは、実施例２に記載されるＫ－Ｌ設計に関するＬＣＣＡデータを提供する一方、表５Ｂは、実施例２にも記載されるＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計に関するＬＣＣＡデータを提供する。全てのＬＣＣＡ実験は、定常ドメイン（Ｈ／Ｃ２３３－Ｌ／Ｃ２１４、Ｋａｂａｔ番号付け）に位置する鎖間Ｆａｂジスルフィド結合を含有する構築物で行われたことに留意されたい。

【０４５１】

表４Ａは、選択基準を満たした２３１個のＫ－Ｌ設計を列挙する。これらの設計に関するＬＣＣＡデータを表５Ａに示す。表４Ｂは、選択基準を満たした４４個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計を列挙し、表５Ｂは、これらの設計に関するＬＣＣＡデータを示す。上述のＰＣ

Ｔ出願第ＰＣＴ／ＣＡ２０１３／０５０９１４号における表３０からの元のＫ－Ｋ設計ライブラリーと新しい（すなわち、修飾せずにポートされた）カッパ－ラムダ系の間の１００％同一性を維持する設計は、表４Ｂ中で、アスタリスク（＊）で同定した。表４Ｂ中の設計のほとんどは、定常領域中にのみアミノ酸修飾を有し、いくつかの設計は、可変領域中にもアミノ酸修飾を組み込んでいる。これらの設計は、対合特異性をさらにドライブすることを提案しながら、他の抗体系への移動可能性も好む。

【０４５２】

設計強度は、特定の設計のための２つのＬＣＣＡスカラー値の合計として定義することができる。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の設計強度をＫ－Ｌ設計のものと比較することによって、Ｋ－Ｌ系に特異的に調整された設計は、図７に要約されるように、Ｋ－Ｌ系に移されたＫ－Ｋ設計よりも良い対合特異性を示す傾向にあったことが明らかであった。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の中央値設計強度は、１．８６であり、最大設計強度は、３．５３であった。Ｋ－Ｌ設計の中央値設計強度は、２．６９であり、最大設計強度は、５．２３であった。

【０４５３】

実施例５：生物物理学的特徴付けのための、設計されたＦａｂヘテロ二量体のスケールアップ

正しく対合されたヘテロ二量体Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２は、固有の識別子セット（表４Ａ及び４Ｂ）で示されるように、熱安定性及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、２０ｍｌまで）、以下のように精製された。これらの実験では、Ｆａｂの重鎖をＡＢＤ$_2$タグ無しで発現させた一方、軽鎖をＬＣＣＡで使用した同じＨＡまたはＦＬＡＧタグで発現させた。各ヘテロ二量体の重鎖及び軽鎖をＣＨＯ－３Ｅ７細胞の２０ｍｌ培養中で発現させた。ＣＨＯ－３Ｅ７細胞は、１．７～２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で、４ｍＭのグルタミン及び０．１％ＫｏｌｉｐｈｏｒＰ１８８（Ｓｉｇｍａ＃Ｋ４８９４）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の総体積に対し、１：２．５のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｐｒｏ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓカタログ番号１１５－３７５）を用いて合計２０μｇ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、０．５ｍＭのバルプロ酸（最終濃度）及び１％ｗ／ｖトリプトン（最終濃度）を細胞に添加した後、細胞を３２℃に移した。

【０４５４】

トランスフェクションの７日後に細胞を遠心分離し、ヘテロ二量体を、以下のように４℃でＩｇＧ－ＣＨ１　ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ（商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（商標）、カタログ番号１９４－３２０－００５）を用いた親和性捕捉によって、上清から精製した。上清を、平衡緩衝液（カルシウム、マグネシウム、及びフェノールレッド（ＨｙＣｌｏｎｅ（商標）＃ＳＨ３００２８．０２）を有さないダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ））中の２０～２５％細胞培養上清に希釈した後、平衡緩衝液で予め平衡化したＩｇＧ－ＣＨ１　ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ（商標）と１６時間混合することでインキュベートした。その後、樹脂を遠心分離により回収し、９６ウェルフリットプレートに移し、平衡緩衝液で３回洗浄した。結合した試料を、１～４ベッドボリュームの溶出緩衝液：１００ｍＭグリシンｐＨ２．６で溶出した。溶出試料を遠心分離によって９６ウェルＵＶ透過レシーバープレートに回収し、各ウェルは、溶出体積の１０％で中和緩衝液：１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ９．０を含有した。

【０４５５】

精製後、Ｃａｌｉｐｅｒ　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃７６０４９９）を用いた非還元ハイスループットタンパク質発現アッセイによって、ヘテロ二量体発現を評価した。以下の改変によるＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＬａｂＣｈｉｐのユーザーガイドバージョン２　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩユーザーマニュアルに従って、手順を実施した。ヘテロ二量体試料を、２μｌまたは５μｌ（５～２０００ｎｇ／μｌの濃度範囲）のいずれかで、７μｌのＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｓａｍｐｌｅ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃７６０３２８）と一緒に９６ウェ

ルプレート（ＢｉｏＲａｄ　＃ＨＳＰ９６０１）中の別々のウェルに添加した。その後、ヘテロ二量体試料を１５分間７０℃で変性させた。ＬａｂＣｈｉｐ装置は、ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｃｈｉｐ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃７６０４９９）及びＡｂ－２００アッセイセッティングを用いて作動させた。使用後、チップをＭｉｌｌｉＱ水で洗浄し、４℃で保存した。

【０４５６】

Ｍａｂ設計セット修飾の混入は、タンパク質発現に著しい影響を及ぼさなかった。設計修飾を含有するＣＡＴ－２２００　Ｆａｂで得られた発現レベルは、野生型Ｆａｂの０．６４ｍｇ／２０ｍＬ発現（０．１ｍｇのＳＤ）と比較して、０．４５ｍｇ／２０ｍＬ発現（０．１６ｍｇのＳＤ）である。設計修飾を担持するペルツズマブＦａｂは、野生型Ｆａｂの０．４ｍｇ／２０ｍＬ発現（０．０３ｍｇのＳＤ）と比較して、０．３９ｍｇ／２０ｍＬ発現（０．１４ｍｇのＳＤ）で発現する。キャリパー分析は、野生型Ｆａｂに匹敵する純度レベルを示した。

【０４５７】

実施例６：設計されたＦａｂヘテロ二量体の抗原親和性測定。

ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体がＩＬ－１７Ａと結合し、ペルツズマブＦａｂがＨＥＲ２－ＥＣＤと結合する能力は、アミノ酸置換が、ヘテロ二量体が抗原と結合する能力に任意の効果を有したかどうかを判断するために評価した。Ｆａｂヘテロ二量体は、実施例５に記載されたように調製された。その抗原に対する各Ｆａｂヘテロ二量体の親和性は、以下のようにＳＰＲによって決定した。

【０４５８】

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、及びエタノールアミン）、及び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。０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳ泳動緩衝液は、Ｔｅｋｎｏｃａ　Ｉｎｃ．（Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）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。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。組換えヒトＩＬ－１７Ａは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）から購入した。

【０４５９】

ＣＡＴ－２２００：ＩＬ－１７Ａ親和性決定。全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。ＩＬ－１７Ａ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ＩＬ－１７Ａの２μｇ／ｍＬの溶液を、おおよそ５０共鳴単位（ＲＵ）が固定されるまで、２５μＬ／分の流量でリガンド（垂直）方向に注入した。

【０４６０】

リガンド方向に１００μＬ／分で１Ｍのエタノールアミンの１４０秒間の注入により、残りの活性基を急冷した。

【０４６１】

ＩＬ－１７Ａと結合するための設計されたＦａｂのスクリーニングは、分析物（水平）方向に精製ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂの注入により行った。まず、分析物（水平）方向に１００μＬ／分で３０秒間の緩衝液の２回の注入を用いて、ベースラインを安定させた。緩衝液ブランク対照を用いた各ＣＡＴ－２２００設計されたＦａｂの３倍希釈系列の５つの濃度（６０ｎＭ、２０ｎＭ、６．７ｎＭ、２．２ｎＭ、０．７４ｎＭ）を、５０μＬ／

分で１２０秒間同時に注入し、１５分間の解離相をおいて、結果として、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ＣＡＴ－２２００：ＩＬ－１７Ａ複合体を解離し、ＩＬ－１７Ａ表面を、０．８５％リン酸の２回パルスで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及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を使用して分析した。二重参照されたセンサーグラムをラングミュア結合モデルにフィットさせた。

【０４６２】

ペルツズマブ：ＨＥＲ２親和性決定。全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。抗ペンタＨｉｓ（商標）抗体（Ｑｉａｇｅｎ）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ＢｉｏＲａｄｓＮＨＳ／ＥＤＣ溶液の１：１０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のＮａＯＡｃ　ｐＨ４．５中の抗ペンタＨｉｓ抗体の１０μｇ／ｍＬの溶液を、おおよそ３０００共鳴単位（ＲＵ）が固定されるまで、２５μＬ／分の流量でリガンド（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、残りの活性基を急冷し、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。

【０４６３】

Ｈｅｒ２と結合するための設計されたＦａｂのスクリーニングは、リガンド方向に抗ペンタＨｉｓ（商標）抗体表面上に設計されたＦａｂ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ＨＥＲ２抗原及び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。

【０４６４】

まず、リガンド方向に１００μＬ／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。各設計されたＦａｂの捕捉の場合、設計されたＦａｂを、ＰＢＳＴ中で２μｇ／ｍＬに希釈した。１～５つの設計されたＦａｂ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、１００ｎＭ、３３．３ｎＭ、１１．１ｎＭ、３．７ｎＭ及び０．４１ｎＭ　Ｈｅｒ２を、１２００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及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を用いて分析した。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。

【０４６５】

結果。設計されたＦａｂヘテロ二量体試料の抗原親和性（ＫＤ）値は、設計対の文脈において、表６Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び表６Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）に報告される。Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２　ＦａｂのＫＤ値は、２及び４列目（それぞれ、Ｈ１Ｌ１　ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体及びＨ２Ｌ２ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体のＫＤ）、並びに３及び５列目（そのそれぞれの野生型と比較して、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２　Ｆａｂヘテロ二量体のＫＤの変化）に含まれる。ＫＤ値は、少なくとも１００ＲＵのＦａｂヘテロ二量体捕捉を示したＦａｂヘテロ二量体試料についてのみ決定した。設計されたヘテロ二量体と比較のために使用した、ＩＬ－１７Ａと結合した野生型ＣＡＴ－２２００のＫＤ参照値は、０．２７３ｎＭであった。この値は、軽鎖がＦＬＡＧタグを含有する野生型ＣＡ

Ｔ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体の複数測定に基づいた中央値である。同様に、ＨＥＲ２と結合した野生型ペルツズマブのＫＤ参照値は、８．０５５ｎＭであった。この値は、軽鎖がＨＡタグを含有する野生型ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体の複数測定に基づいた中央値である。表６では、野生型の抗原結合親和性に対するＫＤの差は、（ｌｏｇ（ＫＤ＿設計）－ｌｏｇ（ＫＤ＿ｗｔ））の計算を用いて示し、その結果、正の値は、より低いＫＤ値を示す一方、負の値は、抗原に対する野生型の結合親和性と比較したＦａｂヘテロ二量体のＫＤ値の増加を示す。ＮＢは、結合が検出されなかったことを示す。いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＫＤ値の測定が不足しているため、未決定（ＮＤ）としてマークされることに留意されたい。これらの場合のいくつかでは、Ｆａｂヘテロ二量体を評価したが、技術的な困難（例えば、ＳＰＲ実験における低いＦａｂヘテロ二量体捕捉、すなわち、１００ＲＵ未満）のため、ＫＤ値の正確な決定が阻止された。

【０４６６】

試験した設計Ｆａｂヘテロ二量体の大部分では、アミノ酸置換は、ＫＤ値への影響がほとんどまたは全くなかった。Ｋ－Ｌ設計ライブラリー上の３つの設計（固有識別子１０８８１－１１４１２、１０８８３－１１２３６、及び１０８８８－１１４１５）は、ＣＡＴ－２２００　ＦａｂのＫＤに５倍超の減少を示した。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計ライブラリーで、ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体（固有識別子における１０７２４コードを含有する設計）の１つは、ペルツズマブ側のＫＤに５倍超の減少を示した。

【０４６７】

実施例７：ＤＳＦによる設計されたＦａｂヘテロ二量体の熱安定性測定。

示差走査型蛍光測定（ＤＳＦ）を使用して、野生型の非修飾の重鎖－軽鎖対のものと比較して、正しく対合されたヘテロ二量体の熱安定性を測定した。ＤＳＦは、融点を測定するにはあまり正確ではない方法であると知られているが、熱安定性を測定するためのハイスループット方法であることにより、熱安定性のいくつかの測定が、多数のＦａｂヘテロ二量体について得ることができるため、ここで使用した。Ｆａｂヘテロ二量体は、実施例５に記載されたように調製された。

【０４６８】

ＤＳＦによる熱安定性の測定

設計されたＦａｂヘテロ二量体対の熱安定性は、以下のようにＤＳＦを用いて測定した。各ヘテロ二量体は、実施例５に記載されるように精製し、ＤＰＢＳ（ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、ＨｙＣｌｏｎｅカタログ番号ＳＨ３００２８．０２）中で０．５ｍｇ／ｍＬに希釈した。試料の大部分では、シプロオレンジゲル染色（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｓ－６６５０）の作業原液は、４μＬのシプロオレンジゲル染色を２ｍｌのＤＰＢＳに希釈することによって調製された。１４μＬの０．５ｍｇ／ｍＬタンパク質を６０μＬの希釈されたシプロオレンジゲル染色作業原液に添加することによって、ＤＳＦ試料を調製した。しかしながら、０．５ｍｇ／ｍＬ未満であったタンパク質では、１４μＬの未希釈タンパク質を６０μＬのシプロオレンジ染料の作業原液（ＤＰＢＳ中で１：１５００に希釈した）に添加することによって、各ＤＳＦ試料を調製した。次に、ＤＳＦ分析を、Ｒｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　６０００　ｑＰＣＲ装置（ＱｉａＧｅｎ　Ｉｎｃ）を用いて、２０μｌのアリコート上で重複して行った。各試料は、各ステップ間に１０秒の平衡と開始時に３０秒の待ち時間を有した１℃間隔を用いて３０℃～９４℃で走査した。ゲイン９を有する４７０ｎＭの励起フィルターと６１０ｎＭの発光フィルターを使用した。変性曲線の一次導関数からの最大値をＴｍとして用いて、Ｒｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　６０００ソフトウェアでデータを分析した。残りのＤＳＦ試料を、測定されたＴｍ値を変更しない以下のプロトコル改変で同様に調製し、分析した：１）１μＬのシプロオレンジゲル染色を２ｍｌのＤＰＢＳに希釈することによって作業原液を調製した、２）３０μｌのアリコートを分析した、３）ゲイン１０を使用した。

【０４６９】

設計されたＦａｂヘテロ二量体試料のＤＳＦ結果は、Ｍａｂ設計セットの文脈において、表６Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び６Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）に報告される。Ｈ１Ｌ１及び

Ｈ２Ｌ２　Ｆａｂの熱安定性は、表６Ａ及び６Ｂの６及び８列目に含まれる（Ｈ１Ｌ１は、ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体を指し、Ｈ２Ｌ２は、ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体を指す）。反復を行ったＦａｂヘテロ二量体の場合、報告されたＴｍ値は、中央値である。野生型Ｆａｂヘテロ二量体のＴｍ値に対する設計されたＦａｂヘテロ二量体のＴｍ値の比較は、ＣＡＴ－２２００　Ｈ１Ｌ１では７列目、及びペルツズマブＨ２Ｌ２では９列目に報告される。ＦＬＡＧタグを含有する野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ構築物の中央値Ｔｍは、７６．９℃であると決定された。ＨＡタグを含有する野生型ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体の中央値Ｔｍは、８２．４℃であると決定された。Ｍａｂ設計セットにより生成された多数のＦａｂヘテロ二量体のスケールアップ手順におけるスループット制限を考えると、ＤＳＦ測定は、設計されたＦａｂヘテロ二量体のサブセットをサンプリングすることによって行った。そのため、いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＤＳＦによって測定されたＴｍ値が欠如しているため、未決定（ＮＤ）としてマークされる。試験した設計の大部分は、野生型Ｆａｂで一般的に観察されるＴｍ期待値の範囲内で良好な熱安定性を示した。ＨＣ中に突然変異Ｋ１４５Ｔ＿Ｖ１７７Ｄ＿Ｓ１８８Ｄ、ラムダＬＣ中に突然変異Ｓ１７６Ｋ＿Ｙ１７８Ｌ、またはカッパＬＣ中にＳ１７６Ｋ＿Ｔ１７８Ｌを含有する、設計されたＦａｂヘテロ二量体は、これらの突然変異を含有するＦａｂヘテロ二量体において、＞１０℃でＴｍ値に悪影響を及ぼした。

【０４７０】

実施例８：ＤＳＣによる設計されたＦａｂヘテロ二量体の熱安定性測定

ＤＳＦによって熱安定性の測定を補完するため、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）のより正確な方法を使用して、野生型の非修飾重鎖－軽鎖対のものと比較して、正しく対合された設計Ｆａｂヘテロ二量体の熱安定性も測定した。Ｆａｂヘテロ二量体は、実施例５に記載されたように調製された。

【０４７１】

ＤＳＣによる熱安定性の測定

設計されたＦａｂヘテロ二量体対の熱安定性を、以下のように、ＤＳＣを用いて測定した。ＰＢＳ中の０．２ｍｇ／ｍｌまたは０．４ｍｇ／ｍＬのいずれかの主濃度で精製した試料４００μＬを、ＶＰ－キャピラリーＤＳＣ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、ＤＳＣ分析のために使用した。各ＤＳＣ起動の開始時に、緩衝液ブランクの注入を５回行って、ベースラインを安定させ、参照用の各試料注入前には、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、及び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。

【０４７２】

Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２　Ｆａｂの熱安定性は、表６の１０及び１２列目に含まれる（Ｈ１Ｌ１は、ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体、Ｈ２Ｌ２は、ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体をそれぞれ指す）。反復を行った各Ｆａｂヘテロ二量体の場合、報告されたＴｍ値は、中央値である。野生型Ｆａｂヘテロ二量体のＴｍ値に対する設計されたＦａｂヘテロ二量体のＴｍ値の比較は、ＣＡＴ－２２００　Ｈ１Ｌ１では１１列目（７０．７℃の中央値Ｔｍを有する、ＦＬＡＧタグを含有する野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ構築物）、及びペルツズマブＨ２Ｌ２では１３列目（７８．７℃の中央値Ｔｍを有する、ＨＡタグを含有する野生型ペルツズマブＦａｂ構築物）に報告される。ＤＳＣの高いサンプル量の要件及び低スループット性質を考えると、測定は、設計のサブセットをサンプリングすることによって行った。そのため、いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＤＳＣによって測定されたＴｍ値が欠如しているため、未決定（ＮＤ）としてマークされる。ＤＳＣによって評価された全ての設計されたＦａｂヘテロ二量体は、良好な熱安定性を示した。ＤＳＣ由来Ｔｍ値は、ＤＳＦで観察されたものよりも一般的に低かった（実施例７）。

【０４７３】

実施例９：設計の最適化

ペルツズマブ／ＣＡＴ－２２００系におけるＫ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の性

能は、表５Ａ及び５Ｂにそれぞれ示すように、設計が選択的対合をドライブする能力についてさらなる理解を導くために調べた。この調査により、その後のサイクルの設計最適化が、可能であれば、対合特異性を改善し、及び／またはヘテロ二量体の安定性を増すことが可能になった。設計最適化には、特定の置換アミノ酸残基での別のアミノ酸置換の効果を評価するためにその残基でのＫ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の改変、追加のアミノ酸残基にアミノ酸置換を付加すること、及び／または特定の残基でアミノ酸置換を除去すること（すなわち、それを野生型残基に再変換すること）が含まれた。設計プロセス及び設計の選択は、実施例１及び２に記載されるように行い、得られた設計は、ペルツズマブ／ＣＡＴ－２２００　Ｋ－Ｌ系中で試験した。

【０４７４】

対合特異性が改善された設計の多様性を増加させる別の方法を用いて、追加のＫ－Ｌ設計セットを提案し、表４Ａ及び４Ｂからの選択された定常ドメイン設計、並びに上記パラグラフに記載の選択された定常ドメイン最適化設計候補を２つのＫ－Ｋ可変ドメイン設計と組み合わせた。２つのＫ－Ｋ可変ドメイン設計は、表４Ｂに含まれ、固有の識別子１０６２１－１０７３３及び１０６２３－１０７４５を有する。これらの設計は、それ自身で強い対合特異性を促進せず、抗原結合に影響を及ぼさなかったが、カッパ－カッパ抗体系におけるある特定のＦａｂ定常ドメイン設計と組み合わせた場合に対合特異性を改善することが示された。この追加のＫ－Ｌ設計セットは、定常ドメイン設計のみの組み合わせも含まれ、定常ドメイン設計は、表４Ａ、４Ｂ、及び上記パラグラフに記載の最適化設計候補から選択される。

【０４７５】

最終的に、さらに追加のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計セットは、出発点としてＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＩＢ２０１５／０５４１０７号の表５に記載のＫ－Ｋ設計ライブラリーからの代表的な設計を用いて提案され、ペルツズマブ／ＣＡＴ－２２００　Ｋ－Ｌ系において試験した。実施例２に記載されるように、代表的なＫ－Ｋ由来設計は、カッパ及びラムダ軽鎖の配列及び構造の差を考慮して必要に応じてアミノ酸残基を修飾することによってカッパ－ラムダ－系に適合された。

【０４７６】

この実施例に記載される追加のＫ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の対合特異性は、実施例１０に記載されるように、ペルツズマブ－ＣＡＴ－２２００　Ｋ－Ｌ系におけるＬＣＣＡによって実験的に評価した。

【０４７７】

実施例１０：ＬＣＣＡによる設計されたＦａｂヘテロ二量体の優先的対合の調製及び評価

Ｍａｂ設計セットに対応するアミノ酸置換を含むペルツズマブ及びＣＡＴ－２２００Ｆａｂ構築物は、実施例３に記載されたように調製された。実施例４に記載されるように、全てのＬＣＣＡ実験は、定常ドメイン（Ｈ／Ｃ２３３－Ｌ／Ｃ２１４、Ｋａｂａｔ番号付け）に位置する鎖間Ｆａｂジスルフィド結合を含有する構築物で行われた。Ｍａｂ設計セットによって示された優先的対合を評価するために、対応するＬＣＣＡ設計セットによって示された優先的対合は、以下の例外を除いて、実施例４に記載されるように測定された。

【０４７８】

ＬＣＣＡ設計セットにおける優先的対合の評価は、重鎖が限られた量で存在し、かつ、誤対合された軽鎖が過剰に存在する状態で、Ｈ１：Ｌ１：Ｌ２またはＨ２：Ｌ２：Ｌ１の比が１：１：１に代わりに１：１：３（重量）でトランスフェクションを重鎖及び軽鎖に行った以外は、実施例４に記載されるようにＬＣＣＡによって行った。実施例９に記載の設計は、表４Ａ及び４Ｂに記載のもの、すなわち、２つの設計の構成された組み合わせ（それらのいくつかはすでに比較的高い対合特異性を示す）の最適化バージョンであったため、そのような特異性におけるさらなる改善（達成した場合）は、アッセイの制限により１：１：１のＨ１：Ｌ１：Ｌ２またはＨ２：Ｌ２：Ｌ１で、ＬＣＣＡでは検出可能ではないかもしれない可能性があった。従って、特異性の改善を検出するために、１：１：１で

はなく、１：１：３のＤＮＡ比を使用した。全てのトランスフェクションは、３００ｎｇのＨ１、３００ｎｇのＬ１、及び９００ｎｇのＬ２（すなわち、Ｈ１：Ｌ１：Ｌ２またはＨ２：Ｌ２：Ｌ１＝１：１：３比）、１００ｎｇのＡＫＴｄｄ　ｐＴＴ２２（構成的に活性なプロテインキナーゼＢ突然変異体を含有するベクター）、及び４００ｎｇのｓｓＤＮＡ（サケ精子ＤＮＡ）を用いて行った。

【０４７９】

ＬＣＣＡメトリックのデータ分析及び説明

データ分析は、以下に記載されるように、実施例４に記載の分析の改変バージョンを用いて実行した。

【０４８０】

全てのＬＣＣＡ設計セットは、ＬＣＣＡで試験され、対象となる設計は、以下の選択基準に基づいて同定した。対象となる設計を考慮するために、設計は、野生型のスカラー信頼区間９５％の上限を上回る少なくとも１つの陽性ＬＣＣＡ結果を含有する必要があったが、他の相補的ＬＣＣＡは、野生型のスカラー信頼区間９５％の下限を上回る必要があった。上記基準を通過した全ての設計は、表７Ａで同定された第２のＫ－Ｌ設計ライブラリー、または表７Ｂで同定された第２のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計ライブラリーに含まれた。

【０４８１】

表８Ａ及び表８Ｂは、Ｍａｂ設計の文脈において、第２のＫ－Ｌ設計ライブラリー及び第２のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌライブラリーのそれぞれで得られたＬＣＣＡデータを記載する。この実施例における各ＬＣＣＡ設計セットの性能は、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２の比（中央値）及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の比（中央値）のそれぞれの自然対数に対応する２つのスカラー値で記述された。これらのスカラー値は、実施例４で計算されたスカラー値と僅かに異なるが、優先的対合を評価するために同様に使用される点に留意されたい。これらのスカラー値は、第２のＫ－Ｌ設計ライブラリーについて表８Ａ、第２のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌライブラリーについて表８Ｂの２及び５列目に報告される。ＣＡＴ－２２００（ＬＣ－ＦＬＡＧ）＋ペルツズマブ（ＬＣ－ＨＡ）に対して競合した野生型ＣＡＴ－２２００（ＨＣ）の場合、９５％スカラー信頼区間は、－３．２４（下限）～－２．９４（上限）であった。ペルツズマブ（ＬＣ－ＨＡ）＋ＣＡＴ－２２００（ＬＣ－ＦＬＡＧ）に対して競合した野生型ペルツズマブ（ＨＣ）の場合、９５％スカラー信頼区間は、－０．９（下限）～－０．６（上限）であった。

【０４８２】

設計のＬＣＣＡごとのスカラー範囲（Ｈ１Ｌ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１Ｌ２実験）は、結果の再現性の尺度として、表８Ａ及び８Ｂの３及び６列目に示し、設計用に測定されたスカラー最高値とスカラー最低値の間の差を表す。単一測定から報告された結果では、範囲値は、ＮＡ（不適当）とマークされる。加えて、スカラー値は、Ｈ１Ｌ１：Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１の純粋な中央値の比にも再変換された。この変換は、Ｈ１Ｌ１及びＨ１Ｌ２またはＨ２Ｌ２及びＨ２Ｌ１の総量が１００％から大幅に異なったいくつかの場合に観察されたように、ＬＣＣＡ比を１００％に効果的に正規化された。これらの値は、表８Ａ及び８Ｂの４及び７列目に報告される。

【０４８３】

結果

上述のように、ＬＣＣＡ結果は、Ｍａｂ設計セットの文脈において表８Ａ及び８Ｂに示す。表８Ａは、実施例９に記載のＫ－Ｌ設計に関するＬＣＣＡデータを提供する。選択基準を満たした１５１個のＫ－Ｌ設計、及び設計のほとんどは、定常領域中にのみアミノ酸修飾を有し、いくつかの設計は、可変領域中にもアミノ酸修飾を組み込んでいる（表７Ａを参照）。これらの設計は、対合特異性及び安定性をさらにドライブすることを提案しながら、他の抗体系への移動可能性も好む。

【０４８４】

表８Ｂは、実施例９にも記載されたＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計に関するＬＣＣＡデータを提供する。２１個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計が、選択基準を満たした。これらの設計は、定常

ドメイン設計のみを含む。

【０４８５】

実施例１１：生物物理学的特徴付けのための、設計されたＦａｂヘテロ二量体のスケールアップ

正しく対合されたヘテロ二量体の生物物理学的特徴を調べるために、表７Ａ及び７Ｂに示す固有の識別子セットで同定された、選択された正しく対合されたヘテロ二量体Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２（設計されたＦａｂ）の調製は、２０ｍｌではなく５０ｍｌスケールアップを行ったことを除いて、実施例５に記載されるようにスケールアップした。発現されたＦａｂは、熱安定性及び抗原結合について試験するために、実施例５に記載されるように精製された。精製プロトコルを改変して、平衡緩衝液中でいずれの初期希釈をせずにＩｇＧ－ＣＨ１　ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ（商標）で上清をインキュベートし、結合した試料の溶出を４ベッドボリュームの溶出緩衝液で行った。

【０４８６】

精製後、実施例５で前述されたように、Ｃａｌｉｐｅｒ　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩを用いた非還元及び還元ハイスループットタンパク質発現アッセイによって、ヘテロ二量体発現を評価した。

【０４８７】

精製後収率から判断すると、設計されたＦａｂ中のＭａｂ設計セット改変の混入は、タンパク質発現に著しい影響を及ぼさなかったことが、データにより実証された。設計されたＣＡＴ－２２００　Ｆａｂで得られた精製後収率は、野生型Ｆａｂの１．９ｍｇ／５０ｍｌ発現（０．５のＳＤ）と比較して、１．３ｍｇ／５０ｍｌ発現（０．６のＳＤ）であった。設計されたペルツズマブＦａｂは、野生型Ｆａｂの１．１ｍｇ／５０ｍｌ発現（０．２のＳＤ）と比較して、０．９ｍｇ／５０ｍｌ発現（０．４のＳＤ）の収率で調製した。キャリパー分析は、野生型Ｆａｂに匹敵する純度を示した（データ不図示）。多数の設計されたＦａｂは、精製後にそれらと関連する沈殿物を有した（表９Ａ及び９Ｂで「＊」と記載した）。上で提供された収率情報は、沈殿物の除去後に測定された。

【０４８８】

実施例１２：設計されたＦａｂヘテロ二量体の抗原親和性測定

ＣＡＴ－２２００設計されたＦａｂヘテロ二量体がＩＬ－１７Ａと結合し、ペルツズマブ設計されたＦａｂヘテロ二量体がＨＥＲ２－ＥＣＤと結合する能力は、アミノ酸置換が、ヘテロ二量体が抗原と結合する能力に任意の効果を有したかどうかを判断するために評価した。ＣＡＴ－２２００設計されたＦａｂを、９００秒の解離相ではなく６００～８００秒の解離相をおいて、５０μＬ／分で１２０秒間注入した以外は、抗原結合は、実施例６に記載されるように評価した。さらに、ＨＥＲ２と結合するための設計されたペルツズマブＦａｂのスクリーニングは、以下の改変：Ｆａｂ捕捉ごとに、Ｆａｂを２４０秒ではなく１２０秒の注入時間で２μｇ／ｍｌではなく２．５μｇ／ｍｌに希釈した以外は、実施例６に記載されるように行った。注入した最低のＨＥＲ２抗原濃度は、０．４１ｎＭではなく１．２３ｎＭであった。濃度系列の解離相は、１２００秒ではなく６００秒であった。

【０４８９】

結果。設計されたＦａｂヘテロ二量体試料の抗原親和性（ＫＤ）値は、Ｍａｂ設計対の文脈において、表９Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び表９Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）に報告される。Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２　ＦａｂのＫＤ値は、２及び４列目（それぞれ、Ｈ１Ｌ１　ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体及びＨ２Ｌ２ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体のＫＤ）、並びに３及び５列目（そのそれぞれの野生型と比較して、Ｈ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２　Ｆａｂヘテロ二量体のＫＤの変化）に含まれる。ＫＤ値は、少なくとも１００ＲＵのＦａｂヘテロ二量体捕捉を示したＦａｂヘテロ二量体試料についてのみ決定した。設計されたヘテロ二量体と比較のために使用した、ＩＬ－１７Ａと結合した野生型ＣＡＴ－２２００　ＦａｂのＫＤ参照値は、０．２０９ｎＭであった。この値は、軽鎖がＦＬＡＧタグを含有し、かつ、実施例６で報告された値から有意に異ならない野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａ

ｂヘテロ二量体の複数測定に基づいた中央値である。同様に、ＨＥＲ２と結合した野生型ペルツズマブのＫＤ参照値は、７．８ｎＭであった。この値は、軽鎖がＨＡタグを含有し、かつ、実施例６で報告された値から有意に異ならない野生型ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体の複数測定に基づいた中央値である。表９Ａ及び９Ｂでは、野生型の抗原結合親和性に対するＫＤの差は、（ｌｏｇ（ＫＤ＿設計）－ｌｏｇ（ＫＤ＿ｗｔ））の計算を用いて示し、その結果、正の値は、より低いＫＤ値を示す一方、負の値は、抗原に対する野生型の結合親和性と比較したＦａｂヘテロ二量体のＫＤ値の増加を示す。前述したように、Ｍａｂ設計セットにより生成された多数のＦａｂヘテロ二量体のスケールアップ手順におけるスループット制限により、ＳＰＲ測定は、設計されたＦａｂヘテロ二量体のサブセットをサンプリングすることによって行った。このため、いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＳＰＲによって測定されたＫＤ値が欠如しており、未決定（ＮＤ）としてマークされる。試験した設計Ｆａｂヘテロ二量体の場合、アミノ酸置換は、ＫＤ値に対する影響がほとんどまたは全くなかった（野生型の２倍以内）。

【０４９０】

実施例１３：ＤＳＦによる設計されたＦａｂヘテロ二量体の熱安定性測定。

示差走査型蛍光測定（ＤＳＦ）を使用して、野生型Ｆａｂのものと比較して、正しく対合された設計Ｆａｂヘテロ二量体の熱安定性を測定した。Ｆａｂヘテロ二量体は、実施例１１に記載されたように調製された。

【０４９１】

ＤＳＦによる熱安定性の測定

設計されたＦａｂヘテロ二量体の熱安定性は、以下のようにＤＳＦを用いて測定した。精製された各ヘテロ二量体を、ＤＰＢＳ（ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、ＨｙＣｌｏｎｅカタログ番号ＳＨ３００２８．０２）中で０．６７ｍｇ／ｍＬに希釈した。シプロオレンジゲル染色（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｓ－６６５０）の作業原液は、ＤＰＢＳ中で１：１０００希釈によって調製された。１５μＬの０．６７ｍｇ／ｍＬタンパク質を１５μＬのシプロオレンジゲル染色作業原液に添加することによって、ＤＳＦ試料を調製した。しかしながら、０．６７ｍｇ／ｍＬ未満の濃度であったタンパク質では、１５μＬの未希釈タンパク質を１５μＬのシプロオレンジ染料の作業原液に添加することによって、各ＤＳＦ試料を調製した。次に、ＤＳＦ分析を、Ｒｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　６０００　ｑＰＣＲ装置（ＱｉａＧｅｎ　Ｉｎｃ）を用いて、３０μｌのアリコート上で行った。各試料は、各ステップ間に１０秒の平衡と開始時に３０秒の待ち時間を有した１℃間隔を用いて３０℃～９４℃で走査した。ゲイン８を有する４７０ｎＭの励起フィルターと６１０ｎＭの発光フィルターを使用した。変性曲線の一次導関数からの最大値をＴｍとして用いて、Ｒｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　６０００ソフトウェアでデータを分析した。

【０４９２】

設計されたＦａｂヘテロ二量体試料のＤＳＦ結果は、Ｍａｂ設計セットの文脈において、表９Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び９Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）に報告される。Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２　Ｆａｂの熱安定性は、表９Ａ及び９Ｂの６及び８列目に含まれる（Ｈ１Ｌ１は、ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体を指し、Ｈ２Ｌ２は、ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体を指す）。反復を行ったＦａｂヘテロ二量体の場合、報告されたＴｍ値は、中央値である。野生型Ｆａｂヘテロ二量体のＴｍ値に対する設計されたＦａｂヘテロ二量体のＴｍ値の比較は、ＣＡＴ－２２００　Ｈ１Ｌ１では７列目、及びペルツズマブＨ２Ｌ２では９列目に報告される。ＦＬＡＧタグを含有する野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ構築物の中央値Ｔｍは、７７．０℃であると決定された。ＨＡタグを含有する野生型ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体の中央値Ｔｍは、８１．７℃であると決定された。先に述べたように、ＤＳＦ測定は、設計されたＦａｂヘテロ二量体のサブセットをサンプリングすることによって行ったため、いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＤＳＦによって測定されたＴｍ値が欠如しており、未決定（ＮＤ）としてマークされる。試験した設計の大部分は、以下の例外を除いて、野生型Ｆａｂで一般的に観察されるＴｍ期待値の範囲内で良好な熱安定性を示した（最大４～５℃の野生型と比較して、Ｔｍの減少を示した）。２つのＦａｂヘ

テロ二量体における、カッパ重鎖中のＬ１２４Ｅ＿Ｋ１４５Ｔ突然変異と組み合わせたカッパ軽鎖中のＳ１３１Ｋ＿Ｌ１３５Ｋ突然変異の存在は、＞１０℃でＴm値に悪影響を及ぼすと思われた。また、注目すべきは、ＣＡＴ－２２００設計されたＦａｂのいくつかでは、Ｆａｂメインピークのショルダーは、ＤＳＣスペクトルで観察された（これらのＦａｂは、表９Ａ及び９Ｂで「＃」とマークされる）。そのようなプロファイルは、野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂでも観察された。

【０４９３】

実施例１４：ＤＳＣによる設計されたＦａｂヘテロ二量体の熱安定性測定

ＤＳＦによって熱安定性の測定を補完するため、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）のより正確な方法を使用して、野生型の非修飾重鎖－軽鎖対のものと比較して、正しく対合された設計Ｆａｂヘテロ二量体の熱安定性も測定した。Ｆａｂヘテロ二量体は、実施例１１に記載されたように調製され、熱安定性は、実施例８に記載されるようにＤＳＣによって測定された。しかしながら、プロトコルで示されたものより低い試料濃度を有したＦａｂヘテロ二量体の場合、ＤＳＣは、利用可能な濃度で行った。

【０４９４】

Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２　Ｆａｂの熱安定性は、表９Ａ及び９Ｂの１０及び１２列目に含まれる（Ｈ１Ｌ１は、ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂヘテロ二量体、Ｈ２Ｌ２は、ペルツズマブＦａｂヘテロ二量体をそれぞれ指す）。反復を行った各Ｆａｂヘテロ二量体の場合、報告されたＴm値は、中央値である。野生型Ｆａｂヘテロ二量体のＴm値に対する設計されたＦａｂヘテロ二量体のＴm値の比較は、ＣＡＴ－２２００　Ｈ１Ｌ１では１１列目（７０．７℃の中央値Ｔmを有する、ＦＬＡＧタグを含有する野生型ＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ構築物）、及びペルツズマブＨ２Ｌ２では１３列目（７８．７℃の中央値Ｔmを有する、ＨＡタグを含有する野生型ペルツズマブＦａｂ構築物）に報告される。ＤＳＣの高いサンプル量の要件及び低スループット性質を考えると、測定は、ＤＳＦによって特徴付けられた設計のサブセットをサンプリングすることによって行った。そのため、いくつかのＦａｂヘテロ二量体は、ＤＳＣによって測定されたＴm値が欠如しているため、未決定（ＮＤ）としてマークされる。ＤＳＣによって評価された全ての設計されたＦａｂヘテロ二量体は、良好な熱安定性を示した（最大２～３℃の野生型と比較したＴm減少）。ＤＳＣ由来Ｔm値は、ＤＳＦで観察されたものよりも一般的に低かった（実施例１３）。野生型と比較した設計されたＦａｂのＴmの絶対差は、ＤＳＦまたはＤＳＣに関わらず、使用した方法に応じて観察されたが、野生型Ｆａｂに対する設計されたＦａｂの相対ランキングは、使用した方法とは無関係で同じであった。

【０４９５】

実施例１５：代表的な設計の設計クラスタリング及び選択

実施例２～１４は、Ｋ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の設計及び試験について記載した。これらの設計が対合を促進する能力は、各ＬＣＣＡ設計セットの１つの重鎖が適切な軽鎖と対合する能力を決定したＦａｂ形式において、ＬＣＣＡで試験した。結果として得られた正しく対合されたヘテロ二量体（１つの重鎖及び１つの軽鎖）の安定性及び抗原結合に対するアミノ酸置換の効果についても評価した。

【０４９６】

Ｍａｂ設計セットのポリペプチド鎖が同時発現された場合（すなわち、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２及びＬ２が同時発現された場合）に、Ｋ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計のＬＣＣＡ形式（Ｈ１、Ｌ１、及びＬ２、またはＨ２、Ｌ１、及びＬ２の同時発現）で得られたＭａｂ設計セット（Ｈ１Ｌ１Ｈ２Ｌ２）の優先的対合の結果も適用されたかどうかを試験するために、全ての設計をこのように試験するのは現実的ではなかったため、表４Ａ、４Ｂ、７Ａ、及び７Ｂに記載の４００を超える設計の代表的な数を選択した。代表的な設計を「ＳＭＣＡ」と呼ばれるアッセイで試験した（実施例１６に詳細を記載）。

【０４９７】

代表的な設計を選択するため、表４Ａ及び７Ａ（ｎ＝４０４）で同定されたＫ－Ｌ設計は、置換されたアミノ酸残基位置における同一性に従って組み合わせて、クラスター化し

た。表７ＢからのＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計が元のＫ－Ｋ設計から大幅に改変されているいくつかの場合では、クラスタリングのためにこのＫ－Ｌ設計グループにも含まれた。表１０－Ａ１～１０－Ａ１２は、Ｋ－Ｌ設計の結果として得られたクラスター１～１２を示す。同様に、表４Ｂ及び７Ｂ（ｎ＝４３）で報告されたＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計も、Ｋ－Ｌ設計グループに移したものを除いて、組み合わせて、クラスター化した。表１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０は、Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の結果として得られたクラスター１～１０を示す。その後、各クラスターから代表的な設計を後述するように選択した。選択された代表的な設計の最終セットも、ＳＭＣＡ設計ＩＤ指定を含む表１１Ａ（Ｋ－Ｌ設計）及び１１Ｂ（Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計）に含まれた。

【０４９８】

ＳＭＣＡの代表的な設計

代表的な設計は、対合特異性を示し、かつ、抗原結合にほとんどまたは全く影響を与えない、並びに設計安定性などの二次基準を考慮し、野生型の発現に匹敵する置換数を最小化する一次基準に基づいて選択された。最大の対合特異性は、一方のＦａｂ対合がヘテロ二量体対における他方のＦａｂよりも不十分であるが、野生型対合よりも良いことが実証された両方のＦａｂ並びに各Ｆａｂを個別に考慮して評価した（図６に示すようにシナリオＡ及びＢ）。加えて、クラスター内の多様性、及びクラスターにおける設計の数が、選択された代表的なクラスターのタイプ及び数をさらに導いた。

【０４９９】

合計で３３個の代表的なＫ－Ｌ設計をクラスター１～１２から選択し、ＳＭＣＡ形式で試験した。同様に、高～中の平均のＬＣＣＡ性能値を有する７個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計を、同定された１０個のクラスターのうちの７個のクラスターから選択した。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計クラスターのうちの３つは、ＬＣＣＡ性能基準または抗原結合に対する効果の欠如などの一次基準に対する代表の基準を満たした設計を含まなかった。

【０５００】

少なくとも１つの代表的な設計を各クラスターから選択した。ただ１つの代表的な設計によって表されたクラスターは、Ｋ－Ｌ設計クラスター５及び１１、及び７個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計クラスターの全てを含んだ。クラスターとして２つ以上の代表的な設計を有した残りのクラスターは、大きい（すなわち、クラスター２、３、４、６、７、８）及び／またはより多くの設計サブ多様性（副次的クラスター）（すなわち、クラスター１、９、１０、１２）を有したかのいずれかであった。各クラスター内の設計は配列類似性を共有したが、クラスター内の副次的クラスターは、少なくとも１つのドライバー（アミノ酸置換）で異なった。クラスターごとの代表的な設計を、表１０－Ａ１～１０－Ａ１２及び１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０で、太字で強調する。本明細書の他の箇所で述べたように、これらの表中の「－」は、優先的対合を促進するアミノ酸置換が、その特定のポリペプチド鎖で存在しないことを示す。

【０５０１】

ドライバー及び二次置換

ＬＣＣＡにより評価されたように、各クラスターにおいて所望の対合特異性を促進した「ドライバー」または「ドライバーセット」（アミノ酸位置及び／または置換）を同定することに重点を置いて、代表的なものを選択したクラスターをここに記載した。「ドライバーセット」という用語は、優先的対合を促進する一連のアミノ酸位置及び置換を指すが、「ドライバー」という用語は、ドライバーセット内の単一の位置／置換を指す。しかしながら、他の残基及び置換は、クラスターにおける設計または設計セットと時には関連していた。これらの残基及び置換は、「二次」置換と呼ばれ、Ｍａｂ設計セットに時々含まれ、使用したドライバーセットまたは複数のドライバーセットの性能を改善した。機構的に、これらの二次置換は、ｉ）ドライバーの立体適応を促進し、ｉｉ）重鎖と軽鎖の間の接続部分で、ドライバーセット位置での置換時に欠失した接点の数を増加させて、または接点を置換し、ｉｉｉ）ドライバーセットに基づいて、水素結合ネットワークを最適化し、及び／または、ｉｖ）ドライバーセットの性能改善を助長する環境を作るように作用し

得る。これらの機構のうちの１つ以上は、各クラスターにおけるドライバーの性能を改善するために使用することができ、または改善することを意図する。

【０５０２】

これらの二次置換のいくつかは、いくつかのクラスターにわたって共通であった。例えば、重鎖中のＫ１４５Ｔ置換をＨ１Ｌ１またはＨ２Ｌ２のいずれかで利用し、負に帯電したドライバーまたは複数のドライバーをその近傍に設計した場合に、正の電荷を除去した。多くのクラスターでは、ラムダ軽鎖中のＫ１２９Ｔ置換を時々利用し、負に帯電したドライバーまたは複数のドライバー（例えば、Ｋ－Ｌ設計クラスター４及びクラスター８～１２）をその近傍に設計した場合に、正の電荷を除去した。さらに、ラムダ軽鎖中のＥ１２４Ｑ置換をいくつかのクラスターで利用し、正に帯電したドライバーまたは複数のドライバー（例えば、Ｋ－Ｌ設計クラスター１～３）の近傍において、負の電荷を除去した。設計のいくつかにおけるカッパ軽鎖にＶ１３３Ｇ置換を主に適用し、（例えば、主に、Ｋ－Ｌ設計クラスター１、３、４、６、７、１０、１２、及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計クラスター１０における）特定のドライバーセットに立体的に適応させた。ラムダ軽鎖中のＹ１７８Ｔを設計に導入して、それぞれのＨ１Ｌ１における特定のドライバーセット（例えば、Ｋ－Ｌクラスター４、５、８及び１２）に立体適応させた。軽鎖中のＶ１３３Ｓは、水素結合ネットワークの改善を標的にするさらに別のドライバーセット（例えば、Ｋ－Ｌクラスター１、２、及び１２）に適用した。

【０５０３】

Ｋ－Ｌ設計クラスターの説明

クラスター１の場合、２つの設計（１３１７５－１３４８６及び１３１８０－１３５１５）を選択して、同様のスペースを占有する類似の静電ドライバー利用したこれらの設計としてクラスターを表した（表１０－Ａ１を参照）。このクラスターの全てのメンバーの場合、２つのドライバーセットの組み合わせを利用した。第１の静電ドライバーセットは、Ｈ１中の負に帯電した置換（主にＬ１４３Ｄ）が、Ｌ１中の正に帯電した置換（Ｔ１３１Ｋ／Ｒ）と塩橋を形成することができるように設計された一方、Ｈ２は、ａ）正に帯電した置換Ｓ１８８ＫまたはＬ１２４Ｒ＿Ｓ１８６Ｒが、Ｌ２中の負に帯電した置換（Ｓ１７６Ｄ＿Ｔ１７８ＥまたはＳ１７６Ｄ＿Ｔ１８０Ｅ）と塩橋を形成することができる、またはｂ）Ｈ２中のＬ１４３ＲまたはＳ１８６ＫとＬ２中のＱ１２４Ｅ＿Ｖ１３３Ｄの間に塩橋を形成することができるように設計された。「ジスルフィドステアリングドライバーセット」と言われる第２の静電ドライバーセットを添加して、Ｈ－Ｌ組立プロセスの初期段階における誤対合ヘテロ二量体中のＨ－Ｌまたはヘテロ二量体ジスルフィド結合の形成を嫌った。ジスルフィドステアリングドライバーセットは、Ｈ１中の正に帯電した置換（Ａ１２５Ｒ）、Ｌ１中の負に帯電した置換（Ｓ１２２Ｄ）、Ｈ２中の負に帯電した置換（Ｋ２２８Ｄ）、及びＬ２中の正に帯電した置換（Ｓ１２１Ｋ）を使用した。これらのアミノ酸置換は、Ｋ－Ｌ設計におけるアミノ酸置換の大部分が位置する埋められた（主）Ｈ－Ｌ接続部分から離れて、ジスルフィド結合の近傍に位置する。２つのドライバーセットは、優先的に対合されたヘテロ二量体において塩橋を形成するように設計された一方、ミスマッチ対は、主に静電反発により嫌われる。

【０５０４】

クラスター２の場合、４つの代表的な設計（１３２８２－１３４８４、１３２８７－１３４９４、１３２１８－１３４８２及び１０９４５－１１３７７）を選択して、このクラスターにおける多様性の度合いを反映させた（表１０－Ａ２を参照）。このクラスターの全てのメンバーは、第１の静電ドライバーセットであるクラスター１と同様に設計されたＨ１に基づいており、負に帯電した置換（Ｌ１４３ＤまたはＬ１４３Ｄ＿Ｑ１７９Ｅ）がＬ１中の正に帯電した置換（Ｔ１３１Ｋ／Ｒ）と塩橋を形成することができる一方、Ｈ２は、ａ）正に帯電した置換（Ｓ１８６Ｋ）がＬ２中の負に帯電した置換、主に、Ｖ１３３ＤまたはＶ１３３Ｄ＿Ｑ１６０Ｅと塩橋を形成する；ｂ）Ｓ１８８ＫがＬ２のＳ１３１Ｄ／Ｅと対合する；またはｃ）Ｌ１４３Ｒ／ＫがＬ２のＱ１２４Ｅ＿Ｖ１３３Ｄと対合することのいずれかが可能であるように設計された。クラスター２のいくつかのメンバーは、

静電ドライバーセットに加えて、立体ドライバーセットも含有した。「立体１」及び「立体２」と呼ばれる２つの立体ドライバーセットを使用した。立体１ドライバーセットは、Ｌ１のＳ１７６ＦまたはＴ１１６Ｆ＿Ｓ１７６Ｆと立体的に相補的になるように設計されたＨ１中のＦ１７４Ｇ、及びＬ２のＬ１３５Ａと立体的に相補的なＨ２のＶ１９０Ｆを含んだ。立体２ドライバーセットは、Ｌ１の野生型の残基と立体的に互換性があるＨ１中のＡ１３９Ｗ、及びＬ２のＬ１３５Ｗと立体的に互換性があるＨ２の野生型を含んだ。従って、このクラスターでは、Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１のミスマッチ対合は、主に、静電反発または立体的な非互換性と組み合わせた静電反発により嫌われる。また、静電ドライバーセットに加えて、その代表例は選択されなかったが、対合を改善すると期待されたＨ２鎖（Ｑ３９ＥまたはＬ４５Ｐ）及びＬ２鎖（それぞれ、Ｑ３８ＲまたはＰ４４Ｆ）において可変設計成分（「可変ドメインドライバーセット」）を含有する２つのクラスターメンバーが存在する。

【０５０５】

クラスター３の場合、５つの代表的な設計（１０９３１－１１２６３、１３２２１－１３４１１、１０９８７－１１２５７、１０９８３－１１３０６、及び１０９４７－１１３９２）を選択した（表１０－Ａ３を参照）。このクラスターのメンバーは、クラスター２と同様に、Ｈ１（Ｌ１４３ＤまたはＬ１４３Ｅ＿Ｑ１７９Ｅ）及びＬ１（Ｔ１３１Ｒ／Ｋ）中の類似の静電ドライバーセットを利用したが、Ｈ２Ｌ２の設計に対して異なっていた。Ｈ２Ｌ２の設計は、ａ）Ｌ２のＳ１７６Ｄ＿Ｔ１７８ＥまたはＳ１７６Ｄ＿Ｔ１８０Ｅと対合するＨ２のＬ１２４Ｒ＿Ｓ１８６Ｒ／ＫまたはＬ１２４Ｒ＿Ｑ１７９ＫまたはＳ１８８Ｋ；またはｂ）Ｌ２のＱ１２４Ｅ＿Ｖ１３３Ｄ＿Ｓ１７６Ｄ＿Ｔ１７８Ｄ／Ｅと対合するＨ２のＬ１４３Ｒ＿Ｓ１８８Ｋに主に基づいており、その結果、主に静電反発によりミスマッチ対を嫌った。クラスター２と同様に、クラスターのいくつかのメンバーは、静電ドライバーセットに加えて、立体１または立体２ドライバーセットも利用した。そのようなドライバーセット組み合わせの代表例は、１３２２１－１３４１１である。このクラスターは、静電ドライバーセットに加えて、「可変ドメインドライバーセット」を含有する２つの設計も含んだ。

【０５０６】

３つの代表的な設計（１３３３５－１３３６１、１３２０９－１３３６４、及び１１１００－１１２０５）を、クラスター４のために選択した（表１０－Ａ４を参照）。このクラスターのほとんどのメンバーは、Ｈ２Ｌ２対：ａ）Ｌ２のＳ１７６Ｋ＿Ｔ１７８Ｒ／Ｋと対合するＨ２のＶ１７７Ｄ＿Ｓ１８８Ｄ；またはｂ）Ｌ２のＳ１７６Ｋ／ＲまたはＳ１３１Ｋ／Ｒ　Ｓ１７６Ｒ／Ｋと対合するＨ２のＳ１８６ＥまたはＬ１２４ＥまたはＬ１２４Ｅ＿Ｑ１７９Ｅにいくつかの変化を有するＨ１（Ｓ１８８Ｋ）及びＬ１（Ｓ１７６Ｅ／Ｄ＿Ｙ１７８Ｅ）上の類似の静電ドライバーを利用したことで、優先的に対合されたヘテロ二量体において塩橋を形成することができる一方、ミスマッチ対は、主に静電反発により嫌われる。このクラスターのいくつかのメンバーは、静電ドライバーセットに加えて、立体ドライバーセットのみ、すなわち、立体３ドライバーセットまたは立体３ドライバーセットのいくつかの成分を利用した。立体３ドライバーセットは、Ｌ２中のＳ１７６ＶまたはＳ１７６Ａ＿Ｔ１７８Ａと立体的に相補的になるように設計された、Ｈ１Ｌ１中の野生型の残基、またはＨ１中のＳ１８８Ａ、及びＬ１中のＳ１７６Ａ＿Ｙ１７８Ｗ、及びＨ２中のＳ１８８WまたはＳ１８６Ｉ／Ｌ＿Ｓ１８８Ｗに基づいた。さらに、このクラスターのいくつかのメンバーは、静電ドライバーセットに加えて、ジスルフィドステアリングドライバーセットも含有した。加えて、いくつかのクラスターメンバーは、静電ドライバーに加えて、可変ドメインドライバーセット（複数可）を含有した。

【０５０７】

クラスター５は、固有の識別子１１０６６－１１１８１によって表された（表１０－Ａ５を参照）。このクラスターの全てのメンバーは、静電ドライバーセットを利用した。第１の静電ドライバーセットは、Ｌ１中のＶ１３３Ｄと対合するＨ１中のＳ１８６Ｋ、及びＬ２中のＳ１３１ＫまたはＳ１７６Ｋ＿Ｔ１７８Ｒ／Ｋとそれぞれ対合するＨ２のＳ１８

８ＤまたはＶ１７７Ｄ＿Ｓ１８８Ｄに基づいた。第２のドライバーセットは、逆電荷配向であり、主に、Ｌ１中のＬ１３５Ｋと対合するＨ１中のＬ１２４Ｅ＿Ｖ１９０Ｄ、及びＬ２のＳ１７６ＤまたはＳ１７６Ｄ＿Ｔ１７８Ｅと対合するＨ２のＬ１２４ＲまたはＳ１８８Ｋであった。

【０５０８】

クラスター６の場合、２つの代表的な設計（１０８０８－１１３０８及び１０８１４－１１２３３）を選択した（表１０－Ａ６を参照）。このクラスターの全てのメンバーは、Ｈ１Ｌ１対における類似の静電ドライバーセット：Ｌ１のＳ１７６Ｋ＿Ｙ１７８Ｋ／ＲとＨ１のＶ１７７Ｄ＿Ｓ１８８Ｄ、及びＨ２Ｌ２対におけるより多様なドライバーセット、すなわち、ａ）Ｌ２のＳ１７６Ｅ／Ｄ＿Ｔ１７８ＥまたはＳ１３１Ｄ／Ｅと対合するＨ２のＳ１８８Ｋ；ｂ）Ｌ２のＶ１３３ＤまたはＱ１２４Ｅ＿Ｑ１６０Ｅ＿Ｔ１８０Ｅと対合するＨ２のＳ１８６Ｋ／Ｒ；ｃ）Ｌ２のＳ１７６ＤまたはＳ１７６Ｄ＿Ｔ１７８ＤまたはＳ１７６Ｄ＿Ｔ１８０Ｅと対合するＨ２のＬ１２４ＲまたはＬ１２４Ｒ＿Ｑ１７９Ｋ；またはｄ）Ｌ２のＶ１３３ＤまたはＱ１２４Ｅ＿Ｖ１３３Ｄと対合するＨ２のＬ１４３Ｋ／Ｒを利用した。優先的に対合されたヘテロ二量体において塩橋を形成することができた一方、ミスマッチ対は、主に静電反発により嫌われる。

【０５０９】

クラスター７の場合、３つの設計（１３１６７－１３５１４、１３２６３－１３４９３及び１２８７８－１１２４０）を選択して、クラスターを表した（表１０－Ａ７を参照）。全てのクラスターメンバーは、Ｈ１Ｌ１における共通のドライバーセット：Ｈ１中のＳ１８８Ｅ及びＬ１中のＹ１７８Ｋ、及びＨ２Ｌ２対におけるいくつかのドライバーセット多様性：主に、Ｓ１７６Ｄ／Ｅ＿Ｔ１７８Ｄ／ＥまたはＳ１７６Ｄ／Ｅ＿Ｔ１８０Ｅと主に対合した、またはＬ２のＱ１２４Ｅと組み合わせたＨ２のＬ１２４ＲまたはＳ１８８Ｋ（Ｌ１４３ＫまたはＳ１８６ＲまたはＱ１７９Ｋとも組み合わせた）に基づいて、静電ドライバーセットを利用した。クラスターメンバーのいくつかは、静電ドライバーセットに加えて、ジスルフィドステアリングドライバーセット、立体２ドライバーセット、または可変ドメインドライバーセットも含有した。

【０５１０】

クラスター８の場合、５つの設計（１３３２０－１３３７０、１２９３８－１３４６９、１３２２６－１３４３４、１１０２６－１１２７０、及び１３３１６－１３４５１）を選択して、クラスターを表した（表１０－Ａ７を参照）。このクラスターのメンバーは、Ｈ１Ｌ１静電対においてより変動を有した一方、Ｈ２Ｌ２対は、Ｌ２中のＱ１２４Ｒ／Ｋ＿Ｔ１７８ＲまたはＱ１２４Ｒ＿Ｑ１６０Ｒ／Ｋ＿Ｔ１７８Ｒドライバーと主に対合したＨ２中のＬ１４３ＥまたはＬ１４３Ｅ＿Ｑ１７９Ｅドライバーに基づいた。Ｈ１Ｌ１ドライバー多様性は、以下の通りであった：ａ）Ｓ１８６ＲまたはＱ１７９Ｋは、Ｌ１のＳ１８０Ｅドライバー（Ｌ１中のＶ１３３Ｄドライバーと対合したＨ１中のＳ１８６Ｋバリエーション）と主に対合したＨ１中のドライバーとして利用した；ｂ）Ｌ１のＶ１３３ＤまたはＴ１３１Ｅ／Ｄ＿Ｖ１３３Ｄと対合したＨ１のＬ１４３Ｋドライバー；またはｃ）Ｌ１のＳ１７６Ｄ／Ｅ＿Ｙ１７８Ｅと主に対合したＨ１のＳ１８８Ｋ。クラスターメンバーのいくつかは、静電ドライバーセットに加えて、Ｌ２中のＶ１３３Ａ（後者の設計の一部としていくつかのクラスターメンバーは、Ｈ１中のＬ１４３Ａ置換及びＬ１中のＶ１３３Ｗも利用した）と立体的に相補的になるように遺伝子操作されたＨ２中のＬ１２４Ｗに基づいて、立体２または立体３ドライバーセットまたは立体４ドライバーセットを含有した。さらに、いくつかのクラスターメンバーは、その１つの代表例が選択された静電セットに加えて、可変ドメインドライバーセットを含有した、またはＨ２のＦ１２２ＣとＬ２のＱ１２４Ｃの間に遺伝子操作されたジスルフィド結合を含有した。

【０５１１】

クラスター９の場合、２つの代表的な設計（１３２０８－１３４５５及び１３１９４－１３４２７）を選択した（表１０－Ａ９を参照）。このクラスターのほとんど全てのメンバーは、２つの静電ドライバーセットの組み合わせを利用した。第１のドライバーセット

は、Ｈ２中のＬ１４３ＥまたはＬ１４３Ｅ＿Ｑ１７９Ｅ、及びＬ２中のＳ１３１ＫまたはＱ１２４Ｒ＿Ｔ１７８ＲまたはＱ１２４Ｒ＿Ｑ１６０Ｋ＿Ｔ１７８Ｒと共に、Ｈ１中のＱ１７９ＫまたはＳ１８６Ｒ及びＬ１中のＳ１８０Ｅから主になり、第２のドライバーセットは、ジスルフィドステアリングドライバーセットであった。

【０５１２】

クラスター１０の場合、２つの代表的な設計（１３２３８－１３４６３及び１３３０４－１３４６６）を選択した（表１０－Ａ１０を参照）。このクラスターのメンバーは、立体１ドライバーのみ、またはクラスター９で使用された静電ドライバーセットと組み合わせた立体１ドライバーに基づいた。

【０５１３】

クラスター１１の場合、１つの代表的な設計（１３３０６－１３３７５）を選択した（表１０－Ａ１１を参照）。このクラスターの全てのメンバーは、以下のドライバー：Ｈ１中のＬ１４３Ｋ＿Ｖ１９０Ｋ、Ｌ１中のＶ１３３Ｄ、Ｈ２中のＬ１２４Ｅ、及びＬ２中のＳ１３１Ｋ＿Ｌ１３５Ｋに基づいて、ヘテロ二量体の優先的対合をドライブするために静電置換を利用した。

【０５１４】

クラスター１２の場合、３つの代表的な設計（１３２２７－１３３８３、１１０６５－１１２０６、及び１１０３４－１１２０４）を選択した（表１０－Ａ１２を参照）。このクラスターのメンバーは、ヘテロ二量体の優先的対合をドライブするために静電置換を主に利用した。これらには、Ｈ１中のＬ１４３ＫまたはＳ１８６Ｋ、Ｌ１中のＶ１３３ＤまたはＴ１３１Ｄ／Ｅ＿Ｖ１３３Ｄ、主に、Ｈ２中のＬ１２４Ｅ＿Ｑ１７９Ｅ、及びＬ２中のＳ１３１Ｋ／Ｒ＿Ｓ１７６Ｒに含まれた。いくつかのクラスターメンバーは、ジスルフィドステアリング、立体２、立体３、または可変ドメインドライバーセットをさらに含んだ。

【０５１５】

Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計クラスターの説明

著しく少ないＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計セットを、Ｋ－Ｌ設計と比較して、ＬＣＣＡで試験した（ｎ＝４３）。従って、１０個のカッパ－カッパポートされたクラスターの各々は、単一設計によって表された。クラスターのほとんどは、立体ドライバーセットを利用した２つを除いて、静電ドライバーセットを利用した。さらに、２つのクラスターは、可変ドメインのみにおける設計からなった一方、残りのクラスターは、定常ドメイン設計からなった。

【０５１６】

クラスター１は、以下のドライバーセット：Ｈ１中のＬ１４３Ｅ＿Ｑ１７９Ｅ、Ｌ１中のＥ１２４Ｋ＿Ｙ１７８Ｒ、Ｈ２中のＳ１８６Ｒ、及びＬ２中のＴ１７８Ｅ＿Ｔ１８０ＥまたはＱ１６０Ｅ＿Ｔ１８０Ｅに基づいた静電設計を含み、設計１０６５７－１０７６０によって表される。

【０５１７】

クラスター２は、Ｈ１中のＬ１４３Ｅ、Ｌ１中のＥ１２４Ｒ、及びＨ２中のＳ１８６ＲまたはＱ１７９Ｋ、Ｌ２中のＱ１２４Ｅ＿Ｑ１６０Ｅ＿Ｔ１８０Ｅを特徴とする静電ドライバーセットを含んだ（代表的な設計１０６５２－１０７３４）。

【０５１８】

クラスター３は、負に帯電したドライバー：Ｌ１中のＳ１８０Ｅと相補的な正に帯電したドライバー：Ｈ１中のＳ１８６Ｒ、及び正に帯電したドライバー：Ｌ２中のＱ１２４Ｋ＿Ｔ１７８Ｒと主に相補的な負に帯電したドライバー：Ｈ２中のＬ１４３ＥまたはＱ１７９Ｅまたはそれらの組み合わせを含有した（代表的な設計１０６８５－１０７２６）。

【０５１９】

クラスター４は、以下のドライバー：Ｈ１中のＱ１７９Ｋ、Ｌ１中のＳ１８０Ｅ、及びＨ２中のＬ１４３Ｅ、Ｌ２中のＱ１２４ＲまたはＱ１２４Ｒ＿Ｑ１６０Ｋ＿Ｔ１７８Ｒを利用した（代表的な設計１０６６５－１０７２４）。

【０５２０】
クラスター６メンバーは、一方のアーム中のＱ３９Ｋ／Ｒ及びＱ３８Ｅ／Ｄと、他方のアーム中のびＱ３９Ｅ／Ｄ及びＱ３８Ｋ／Ｒの静電対に基づいて、可変ドメイン設計を含有した（両方の電荷対配向を、Ｈ１Ｌ１及びＨ２Ｌ２アームで利用した）（代表的な設計１０６８１－１０７４１）。
【０５２１】
クラスター８メンバーは、立体的な性質の第２の可変ドメインドライバーセット：Ｌ１中の野生型と相補的なＨ１中の野生型またはＬ４５Ｆ、及びＬ２のＰ４４Ｆと相補的なＨ２中のＬ４５Ａ／Ｐを含んだ（代表的な設計１０６２１－１０７３３）。
【０５２２】
クラスター１０は、Ｈ１中のＬ１２４Ｅ、Ｌ１中のＳ１７６Ｒ、Ｈ２中のＬ１２４Ｒ、及びＬ２中のＳ１７６Ｄに基づいた単一設計を含んだ（設計１０６４０－１０７１３）。
【０５２３】
クラスター５、７及び９の代表例は、親Ｆａｂに対する抗原結合に対する中程度から強いドライビングまたは影響の欠如など、性能基準を満たさなかったため選択されなかった。
【０５２４】
実施例１６：二重特異性抗体形式におけるＭａｂ設計セットで設計されたヘテロ二量体の優先的対合の評価
実施例２～４及び１０は、ＬＣＣＡ設計（すなわち、１つの重鎖を、Ｆａｂ形式における２つの軽鎖と同時発現させた、Ｈ１、Ｌ１、Ｌ２、またはＨ２、Ｌ１、Ｌ２）の文脈において、設計されたＦａｂが優先的に対合する能力を示した。この実施例では、Ｍａｂ設計セット（Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、Ｌ２）で設計されたヘテロ二量体を評価して、二重特異性抗体形式（すなわち、Ｈ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２を同時発現させる）において優先的対合を促進したかどうかを判定した。Ｍａｂ設計セットのアミノ酸置換に加えて、各ヘテロ二量体の完全長重鎖のＦｃ領域は、一方の重鎖がアミノ酸置換Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、及びＹ４０７Ｖ（鎖Ａ）を含み、他方の重鎖がアミノ酸置換Ｔ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ、及びＴ３９４Ｗ（鎖Ｂ）を含むように非対称的に修飾された（Ｆｃのアミノ酸番号付けは、ＥＵ番号付けシステムに従っている）。これらの非対称Ｆｃ修飾は、固有の重鎖のヘテロ二量体化を促進するために含んだ。
【０５２５】
Ｍａｂセットで設計されたヘテロ二量体が二重特異性抗体の文脈において優先的対合を促進する能力は、前の実施例に記載のＣＡＴ－２２００及びペルツズマブ抗体、及びＣＲ８０７１（抗インフルエンザＢヘマグルチニンタンパク質）抗体及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａ（抗ＣＤ１９）の組み合わせを用いて、３つの二重特異性系で評価した。試験した３つの二重特異性系は、Ａ）ＣＡＴ－２２００（ラムダ軽鎖を有する）／ペルツズマブ（カッパ軽鎖を有する）、Ｂ）ＣＡＴ－２２００（ラムダ軽鎖を有する）／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ（カッパ軽鎖を有する）、及びＣ）ＣＲ８０７１（ラムダ軽鎖を有する）／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ（カッパ軽鎖を有する）であった。ＣＡＴ－２２００及びＣＲ８０７１は、ヒト抗体である一方、ペルツズマブ及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａは、ヒト化抗体である。
【０５２６】
アッセイ形式（ＳＭＣＡ）
Ｍａｂ設計セットのアミノ酸置換を含有するヘテロ二量体が優先的に対合して、正しく対合された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（一方の抗体からＨ１及びＬ１鎖と、他方の抗体からＨ２及びＬ２鎖）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。図８は、４つの出発ポリペプチド鎖と、ヘテロ二量体対の（Ｆａｂ及びＦｃ領域の両方における）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可能性のある産物とを示す概略図を提供する。２つの固有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（Ｍａｂ種とも呼ばれる）：Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ１、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ

１Ｌ２、Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ２、Ｈ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１、Ｈ２Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２、Ｈ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２、Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１、及びＨ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２を得た。Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２種は、正しく対合された二重特異性抗体である（図８を参照）。図８に示すように、４つのタイプのハーフ抗体（ハーフＡｂ）種も可能であった。固有の重鎖のヘテロ二量体化を促進するために修飾をＦｃ領域に導入する場合、可能性のあるＭａｂ種の数は減少する（すなわち、種Ｅ～Ｊはそれほど観察されない）。正しく対合された二重特異性抗体種Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２対他の種の量の観点における相対的な対合特異性は、タンパク質Ａ（ｐＡ）精製及び脱グリコシル化後に、ＬＣ－ＭＳを用いて決定された。可能であれば、鎖はタグ付けされないままであり、全てのＭａｂ種及び半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、ＨＡタグの切断が時々観察される際に、可能であれば、ＦＬＡＧタグの使用を強調して、種間の十分な質量の差別化を提供するために、Ｎ末端タグ（ＨＡまたはＦＬＡＧ）を軽鎖に添加した（ＣＲ８０７１を含有する構築物の場合には、ＦＬＡＧタグのみを使用した）。

【０５２７】

二重特異性抗体のＨ１、Ｌ１、Ｈ２、及びＬ２の発現、及び対合産物のその後の分析を伴うこのアッセイは、ＳＭＣＡと呼ばれる。

【０５２８】

構築物の調製

設計に従ってアミノ酸修飾を含むＣＡＴ－２２００、ペルツズマブ、ＣＲ８０７１及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａのＩｇＧの重鎖及び軽鎖をコードする構築物を、以下のように調製した。ＣＡＴ－２２００及びペルツズマブ軽鎖配列は、実施例３に記載されたように調製されたが、部分ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン［配列番号６］をコードし、ヘテロ二量体化を促進するように修飾されたＩｇＧ１＊０１ＤＮＡ配列を、実施例３に記載される（ヒンジの部分を含有し、ＬＣＣＡにおける構築物で使用したABD_2伸長を除外する）Ｆａｂ重鎖調製物のＣＨ１ドメインのＣ末端上に付加することによって、これらの抗体の完全長重鎖配列を作製した。Ｍａｂ設計セットのアミノ酸置換を含有する構築物は、実施例３で述べたように、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って生成した。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）。

【０５２９】

重鎖（配列番号１８）のＦａｂ部分の塩基ＤＮＡ配列、及びＣＲ８０７１の軽鎖（配列番号１９）のＤＮＡ配列を表３Ｃに示す。重鎖（配列番号１４）及び軽鎖（配列番号１５）のＣＲ８０７１　ＦａｂアミノＮ酸配列は、重鎖中のＲ２２２Ｋ置換を行って、最も共通のＩＧＨＧ１＊０１配列に変換したＰＤＢエントリー４ＦＱＪ（Ｆａｂ　ＣＲ８０７１及びヘマグルチニンの複合体）におけるものに対応する。

【０５３０】

重鎖（配列番号１６）のＦａｂ部分の塩基ＤＮＡ配列、及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａの軽鎖（配列番号１７）のＤＮＡ配列も表３Ｃに示す。ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ配列は、配列番号７に対応し、１７個が、米国特許第８，２４２，２５２号に報告され、配列番号１２（重鎖）及び配列番号１３（軽鎖）としてここで含まれる。

【０５３１】

上述のように、Ｍａｂセットにおいて設計されたヘテロ二量体のいくつかにおけるＣＡＴ－２２００、ＣＲ８０７１、ペルツズマブ、及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａ軽鎖配列は、種の間に十分な質量分化を提供するために、ＦＬＡＧまたはＨＡタグの有無に関わらず調製した。タグ付きの軽鎖は、実施例３に記載されたように調製された。

【０５３２】

また、これらの構築物の野生型バージョンは、各系における自然のバイアスを評価し、

対合に対するＨＡまたはＦＬＡＧタグの潜在的な効果を識別し、野生型を上回る、設計された構築物の優先的対合に対する効果を決定するために調製した。

【０５３３】

構築物のトランスフェクション、発現、及び精製

試験した各Ｍａｂ設計セットに対応する野生型またはアミノ酸置換のいずれかの、各二重特異性抗体系の２つの重鎖及び２つの軽鎖をコードする構築物を、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のグルタミン及び０．１％ Ｋｏｌｉｐｈｏｒ Ｐ１８８（Ｓｉｇｍａ ＃Ｋ４８９４）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。２００ｍｌの総体積に対し、１：４のＤＮＡ：ＰＥＩ比でＰＥＩ－ｍａｘ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓカタログ番号２４７６５－２）を用いて、Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２の比を変化させて、（１００μｇの抗体ＤＮＡ、及び１００μｇのＧＦＰ／ＡＫＴ／スタファーＤＮＡからなる）合計２００μｇ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、０．５ｍＭのバルプロ酸（最終濃度）及び１％ｗ／ｖトリプトンＮ１（最終濃度）を細胞に添加した後、細胞を３２℃に移し、収穫前に７日間インキュベートした。培養培地を遠心分離によって収穫し、Ｓｔｅｒｉｃｕｐの０．２２μｍフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅカタログ番号ＳＣＧＰＵ０５ＲＥ）を用いて真空濾過した。その後、濾過した培養培地を、ＰＢＳ ｐＨ７．４で予め平衡化されたプロテインＡ ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＃１７－５４３８－０２）を用いて精製した。次に、樹脂と結合した抗体種をＰＢＳ ｐＨ７．４で洗浄し、１００ｍＭのクエン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ３．６で溶出した。溶出した抗体種を濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ ｕｌｔｒａ １５遠心分離フィルターＵｌｔｒａｃｅｌ １０Ｋ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ＃ＳＣＧＰ００５２５）を用いて、遠心分離によってＰＢＳ ｐＨ７．４中でバッファー交換した。結果として得られた、抗体種を含有するプロテインＡ精製されたＳＭＣＡ試料を、脱グリコシル化及びＬＣ－ＭＳ前にキャリパーによって評価した。

【０５３４】

質量分析法

二重特異性抗体の文脈において、Ｍａｂ設計セットによりドライブされたヘテロ二量体の優先的対合の程度を、プロテインＡでの精製及び非変性の脱グリコシル化後、質量分析を用いて評価した。ヘテロ二量体は、Ｆｃ Ｎ結合グリカンのみを含有したため、ＳＭＣＡ試料を、ただ１つの酵素、Ｎ－グリコシダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅ－Ｆ）で処理した。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 ｐＨ７．０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、０．５ｍｇ／ｍＬであった。脱グリコシル化後、ＬＣ－ＭＳ分析前に試料を４℃で保存した。

【０５３５】

脱グリコシル化したタンパク質試料は、イオンマックスエレクトロスプレー源（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を介してＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ ＸＬ質量分析計（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に連結したＡｇｉｌｅｎｔ １１００ ＨＰＬＣ系を用いるインタクトＬＣ－ＭＳにより分析した。試料（５μｇ）を、２．１×３０ｍｍのＰｏｒｏｓ Ｒ２逆相カラム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上に注入し、以下の勾配条件：０～３分：２０％溶媒Ｂ；３～６分：２０～９０％溶媒Ｂ；６～７分：９０～２０％溶媒Ｂ；７～９分：２０％溶媒Ｂを用いて分解した。溶媒Ａは、脱気０．１％ギ酸水溶液であり、溶媒Ｂは、脱気アセトニトリルであった。流量は、３ｍＬ／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。カラムを８２．５℃まで加熱し、溶媒を８０℃までプレカラム加熱して、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 １６

２１）を用いて較正し、１０ｍｇ／ｍＬのＣｓＩ溶液を用いて調整した。コーン電圧（源のフラグメンテーション設定）は４８Ｖであり、ＦＴ解像度は７，５００であり、走査範囲は、ｍ／ｚ４００～４，０００であった。より大きなタンパク質（＞５０ｋＤａ）の最適な検出のためにＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ＸＬを調整した。

【０５３６】

フルサイズ抗体（ｍ／ｚ２０００～３８００）とハーフ抗体（ｍ／ｚ１４００～２０００）から多荷電イオンを含有する範囲は、ＭａｓｓＬｙｎｘ、装置の制御及びデータ分析ソフトウェアであるＭａｘＥｎｔ　１モジュール（Ｗａｔｅｒｓ）を用いて、分子量プロファイルに別々に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、ＭａｘＥｎｔ１を用いてデコンボリューションした。各試料中の各抗体種の量は、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。

【０５３７】

ＬＣ－ＭＳ結果の分析

全体として、ほとんどの場合、脱グリコシル化処理は、ＬＣ－ＭＳによって同定された可能な異なる抗体種の全てを同定する能力をもたらした。多くの場合、各抗体種は、単一のＬＣ－ＭＳピークによって表された。例外としては、所望の二重特異性種に対応する可能性が高い側ピーク（おそらく付加物またはリーダーペプチドの切断における異質性）を含んだが；しかしながら、側ピークをもたらす種の同一性は明確ではなかったため、これらの側ピークは、二重特異性種に寄与するとは考えなかった。さらに、所望の二重特異性種、Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２は、ＬＣ－ＭＳに基づいて、誤対合タイプ、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１から実験的に区別することが一般的にできない。従って、二重特異性抗体含有量を表に報告する場合、このタイプの誤対合種を含有しないことを完全に排除することはできない。しかしながら、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１、並びにＨ１Ｌ２及びＨ２Ｌ１ハーフ抗体などの種で観察された非常に低い含有量は、誤対合種による二重特異性種の、あるとすれば、ごくわずかな汚染が発生したことを示す。

【０５３８】

自然バイアスの評価、及び野生型系における対合に対するタグの効果

第１ステップとして、試験した３つの二重特異性系ごとに、系ごとの親抗体の野生型（種間の十分な質量分化のために、必要に応じて、タグを含有する軽鎖のうちの１つ）の、非修飾重鎖及び軽鎖を、Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２の種々のＤＮＡ比を用いて同時発現させ、結果として得られた抗体種を同定し、定量化した。これにより、（例えば、二重特異性系における一方の親抗体の軽鎖が、二重特異性系における他方の親抗体の重鎖と優先的に結合する場合に）各系における任意の固有の対合バイアス（またはタグの存在によって導入されたもの）を同定することができ、最低量のハーフＡｂｓと共に最高量の二重特異性抗体をもたらしたＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２のＤＮＡ比を同定することもできた。ＤＮＡ比は、発現レベルの天然の差、及び／または２つの親抗体の重鎖と軽鎖の間の固有の対合バイアス、及び／または系ごとの影響を補償するために選択した。試験した野生型二重特異性系Ａ及びＢでは、Ｌ２は、ＦＬＡＧタグとタグ付けされた。二重特異性系Ｃでは、軽鎖のいずれもタグ付けなかった。

【０５３９】

表１２は、この評価の結果を示す。最低量のハーフＡｂｓと共に最高量の二重特異性抗体をもたらしたＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２のＤＮＡ比は、系Ａでは１０：２０：２４：４６、系Ｂでは１５：１５：３５：３５、及び系Ｃでは１５：１５：３５：３５であった。注目すべきは、ＣＡＴ－２２００／ペルツズマブ二重特異性Ａｂ系（系Ａ）では、ペルツズマブ重鎖（Ｈ２）がＣＡＴ－２２００軽鎖（Ｌ１）と優先的に対合された場合にバイアスが観察された。重鎖１及び重鎖２は当量比であるが、軽鎖１及び軽鎖２が逆比であるデー

タを考える場合（例えば、表１２において、Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２が８：２２：１７：５３、及び８：２２：５３：１７であるＬ１：Ｌ２　ＤＮＡ逆比を考える）に、このバイアスは明らかであった。Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２＝８：２２：５３：１７のこれらの条件下で、Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１の一般的な誤対合Ｍａｂ種は、Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２の一般的な誤対合種が約３８．４％からなったＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２＝８：２２：１７：５３の場合よりもはるかに豊富である（７９．６％）。これは、ペルツズマブ軽鎖がＦＬＡＧタグを有した場合に、ペルツズマブ重鎖が、この系におけるＣＡＴ－２２００軽鎖と優先的に対合するものと思われたことを示した。

【０５４０】

軽鎖のうちの１つ上にＮ末端タグ（ＨＡまたはＦＬＡＧ）を含有した設計ＳＭＣＡ構築物は、軽鎖が重鎖と対合する能力の推定される影響について調査された類似の野生型のＳＭＣＡ構築物の調製を誘導した。表１３は、この実験結果を示し、場合によっては、タグが、重鎖と軽鎖の対合に影響を有したことを示す。例えば、ＣＡＴ－２２００軽鎖とペルツズマブ重鎖の優先的対合が存在した上述の系Ａの場合に対して、ペルツズマブ軽鎖がＦＬＡＧタグを含有した場合、ＣＡＴ－２２００軽鎖がＨＡタグを含有し、４つのポリペプチド鎖を同じＤＮＡ比で発現させた場合、ペルツズマブ軽鎖へのＣＡＴ－２２００重鎖の優先的対合が観察された（表１３、「系Ａ、Ｌ１－ＨＡ」を参照し、「系Ａ、Ｌ１－ＨＡ」を「系Ａ、Ｌ２－ＦＬＡＧ」と、１０：２０：２４：４６の同じ比で比較されたい）。さらに、ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ／ＣＡＴ－２２００二重特異性系（系Ｂ）の場合、ＦＬＡＧタグ付きＳＧＮ－ＣＤ１９ａ軽鎖を含有する系におけるＣＡＴ－２２００軽鎖とＳＧＮ－ＣＤ１９ａの重鎖の誤対合の度合いは、同じ比での同じ系の他の２つの変形例よりも大きかった（表１３、「系Ｂ、Ｌ１－ＦＬＡＧ」を参照し、「系Ｂ、Ｌ１－ＦＬＡＧ」を「系Ｂ、Ｌ２－ＦＬＡＧ及びＬ２－ＨＡ」と、１５：１５：３５：３５の同じ比で比較されたい）。表１３は、行われた全ての反復で蓄積されたデータを反映しているため、種のパーセンテージは、場合によっては、表１２に提供される最初の評価段階でのデータを異なり得る点に留意されたい。

【０５４１】

各二重特異性系内の４０個の代表的な設計の各々を試験する場合、使用したＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２　ＤＮＡ比は、最高量の二重特異性Ａｂ種と最低量のハーフＡｂを生成した対応する野生型二重特異性系からの比であった。前述のように、ＣＡＴ－２２００／ペルツズマブ系の場合、使用した比は、１０：２０：２４：４６（Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２）であった。ここで、Ｈ１及びＬ１は、ＣＡＴ－２２００を指し、Ｈ２及びＬ２は、ペルツズマブを指す。ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ／ＣＡＴ－２２００及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａ／ＣＲ８０７１系の場合、使用した比は、１５：１５：３５：３５（Ｈ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２）であった。

【０５４２】

二重特異性抗体形式における優先的対合結果

試験した４０個の代表的な設計によるＳＭＣＡの結果を表１４～１７に示す。表１４～１７は、「設計」としてＭａｂ設計セットを指し、４桁の数字で識別されている。各４桁の数字は、表１０－Ａ１～Ａ１２及び１０－Ｂ１～１０－Ｂ１０におけるＭａｂ設計セット固有の識別子（ＬＣＣＡセット固有の識別子）に対応する。表２４は、ＳＭＣＡで試験した設計と、ＬＣＣＡセット固有の識別子の間の対応表を提供する。優先的対合の分析は、２つのタイプの計算に基づいて行った。第１タイプの計算は、表において「％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合」と記載され、総産物のパーセンテージとして、１つの正しく対合されたアームのみを有していたかもしれないＭａｂ種（Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２＿及び＿Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＋Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ１＋Ｈ２Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２＋Ｈ１Ｌ１＋Ｈ２Ｌ２＋０．５×（Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１＋Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ２＋Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２＋Ｈ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２））を含む、観察された全てのＭａｂ種及びハーフＡｂ種にわたるＨ１とＬ１、及びＨ２とＬ２の間の正しい対合の量を表す。この計算は、「総対合」計算と呼ばれる。第２タイプの計算は、表において「Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＊＊」と記載さ

れ、観察された全てのＭａｂ種（すなわち、図８のＭａｂ種Ａ～Ｊ）（Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２＿及び＿Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１／（Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２＿及び＿Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＋Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ１＋Ｈ２Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２＋Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１＋Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２＋Ｈ１Ｌ１＿Ｈ１Ｌ２＋Ｈ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２＋Ｈ１Ｌ２＿Ｈ１Ｌ２＋Ｈ２Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１））のパーセンテージとして、正しく対合された二重特異性抗体の量を表す。この計算は、「総二重特異性」計算と呼ばれる。ハーフ抗体は、存在する場合、分取ＳＥＣによって、またはさらなるＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２　ＤＮＡ滴定を介して除去／最小化し得るため、考慮されなかった。表１２は、ＤＮＡ滴定が、発現されたハーフＡｂ種のパーセンテージを操作するのに効果的であることを示す。「Ｆｃ鎖Ａ」タイプのハーフＡｂの量を減少させる分取ＳＥＣ精製の有効性を実施例１８に示す。

【０５４３】

上述のように、いくつかの野生型の二重特異性系で観察されたバイアスを考慮するため、優先的対合データは、同じＨ１：Ｈ２：Ｌ１：Ｌ２　ＤＮＡ比で対応する野生型の二重特異性構築物との比較として報告された。この比較は、列「野生型に対する％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合の変化」（すなわち、野生型に対する総対合の変化）及び「野生型に対するＨ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１の変化＊＊」（すなわち、野生型に対する総二重特異性の変化）で報告された。対応する野生型二重特異性構築物がＳＭＣＡによって評価されなかった場合、類似の野生型構築物との比較を行った。これらのケースは、報告された値の次に「ǂ」で示される。比較用に選択された類似の野生型構築物は、以下のように選択された。二重特異性系及び構築物（タグの有無に関わらず）ごとに、反復ＳＭＣＡ実験／ＤＮＡ比から、「Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１　＊＊」の中央値、及び「％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合」の平均値を取った。各構築物内の任意の比から最大値を取り、全ての構築物にわたる中央値を使用して、特定の系の野生型の参照を表した（図１６Ａ及び１６Ｂを参照）。

【０５４４】

表１４及び１５は、試験した代表的なＫ－Ｌ設計のＳＭＣＡ結果の概要を提供し、設計は、「野生型に対する％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合の変化」（表１４）または「野生型に対するＨ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＊＊の変化」（表１５）に従ってビニングした。同様に、表１６及び１７は、試験した代表的なＫ－Ｌ設計のＳＭＣＡ結果の概要を提供し、設計は、総対合の変化（表１６）または総二重特異性（表１７）計算の変化に従ってビニングした。

【０５４５】

性能

代表的な設計ごとの正しい重鎖と軽鎖の優先的対合を促進する性能または能力は、総対合計算及び総二重特異性計算を用いて評価した。第一に、列「野生型に対する％Ｈ１Ｌ１及び％Ｈ２Ｌ２対合の変化」（野生型に対する総対合の変化）における正の値は、Ｍａｂ設計セットが優先的対合を促進することができたことを示した。第二に、列「野生型に対するＨ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＊＊の変化」（野生型に対する総二重特異性の変化）における正の値は、Ｍａｂ設計セットが優先的対合を促進することができたことも示した。

【０５４６】

場合によっては、異なる誤対合種の量は、野生型と比較して増加したが、Ｋ－Ｌ設計の全て、及び２１個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計のうちの１８個は、野生型と比較して主要な誤対合種（Ｈ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ２またはＨ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ１）の量の減少を示した。平均すると、Ｋ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の両方は、系Ａ（４８．８％）で、野生型に対する所望の二重特異性の最大の増加（野生型に対する総二重特異性の変化）を生成し、系Ｂ（３１．１％）、及び系Ｃ（１４．５％）と続いた。平均すると、試験した全ての設計は、２４．１％から２７．９％と、野生型と比較してハーフ抗体の比較的軽微な増加をもたらしたが、対合ハーフ抗体の誤対合ハーフ抗体に対する平均比を１．５から６．９に改善させた。

【０５４７】
移動可能性
複数の系において優先的対合を促進する代表的なＭａｂ設計セットの能力は、設計の「移動可能性」の尺度として試験した。「野生型に対する総対合の変化」計算を用いて、３３個のＫ－Ｌ設計のうちの２９個は、試験した３つの系のうちの３つで伝達可能であり、３個の設計は、試験した３つの系のうちの２つで伝達可能であった（表１４）。言い換えれば、これらの設計は、「野生型に対する対合の変化」の正の値を示した。「野生型に対する総二重特異性の変化」計算を用いて優先的対合を測定した場合、３３個のＫ－Ｌ設計のうちの２４個は、３つの系のうちの３つで伝達可能として同定され、８個の設計は、３つの系のうちの２つで伝達可能であった（表１５）。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計の場合、７個の設計のうちの２個は、「野生型に対する総対合の変化」計算を用いて、３つの系のうちの３つで伝達可能であり、４個の設計は、３つの系のうちの２つで伝達可能であった（表１６）。「野生型に対する総二重特異性の変化」計算を用いて、７個の設計のうちの１個が、３つの系のうちの３つで伝達可能であり、５個の設計が、３つの系のうちの２つで伝達可能であった（表１７）。３３個のＫ－Ｌ設計のうちの２３個、及び７個のＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計のうちの１個が、両方の計算を用いて評価した場合に、試験した３つの系のうちの３つで伝達可能であった。
【０５４８】
クラスターの性能に対して、１２個のＫ－Ｌクラスターのうちの９個内の全ての設計は、「野生型に対する総対合の変化」計算に従って、３／３系で伝達可能であり、「野生型に対する総二重特異性の変化」計算に従って、１２個のうちの４個であった。クラスターｋｌ－４、ｋｌ－９、及びｋｌ－１２内の全ての設計は、両方の計算を用いて、３／３系で伝達可能であった。図１０は、「野生型に対する総二重特異性の変化」計算（図１０Ａ、二重特異性％の変化）または「野生型に対する総対合の変化」計算（図１０Ｂ、対合％の変化）に基づいた、各クラスターからの代表的な設計の性能を比較した箱ひげ図を示す。Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌクラスターの場合、クラスター当たりただ１つの設計を試験したため、クラスター移動可能性は、上述の設計移動可能性と同等であった。
【０５４９】
全体的に、Ｋ－Ｌ設計は、Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計よりも効果的に優先的対合を促進することができた。図１１は、Ｋ－Ｌ設計及びＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計が、「野生型に対する総二重特異性の変化」計算に基づいて、試験した各系において優先的対合を促進する能力を示す箱ひげ図を示す。例えば、図１１は、Ｋ－Ｌ設計が、Ｋ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計（系ごとの「ｋｌ　ａｌｌ」値と「ｋｋ　ａｌｌ」値を比較する）よりも、野生型と比較して二重特異性抗体の量のより大きな増加を一般的に促進したことを示す。２つ以上または３つ全ての系において伝達可能な設計のみを考えた場合にも真である。
【０５５０】
実施例１７：生物物理学的特徴付けのための、選択されたＳＭＣＡ二重特異性抗体及び親Ｍａｂの分取サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）。
実施例１６に記載のＳＭＣＡで生成された二重特異性抗体の生物物理学的特徴を評価するため、試験した代表的な設計のサブセットからのプロテインＡ精製されたＳＭＣＡ試料に分取ＳＥＣを施し、ハーフＡｂ種を除去した。少なくとも６０％の「Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１＊＊」（総二重特異性）を有するＳＭＣＡ試料をこのステップのために選択した（合計で３６個）。このカットオフを満たさないいくつかのＳＭＣＡ試料も完全のために含まれた。例えば、所与の設計のＳＭＣＡ試料が、試験した３つの二重特異性系のうちの２つでこのカットオフを満たした場合には、ＳＭＣＡ試料は、このカットオフを満たしたが、３番目ではないが、３つ全ての系のＳＭＣＡ試料を含んだ。分取ＳＥＣは、以下のように実行した。試料をカラム上に注入するのに使用したＡＬＩＡＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏｏｌオートサンプラー（Ｓｐａｒｋ－Ｈｏｌｌａｎｄ）を備えたＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔ　２５システム上に取り付けられたＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラムを用いて

、ＳＭＣＡ試料中の抗体種を分離した。ＰＢＳ　ｐＨ７．４中のＳＭＣＡ試料（０．９ｍｌ）（Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＤＰＢＳ／改変、カルシウム無、マグネシウム無、Ｃａｔ番号ＳＨ－３０００２８．０２）を、ＰＢＳで満たした２ｍｌループ中に自動的に装填した。その後、試料をカラム上に自動的に注入し、０．５ｍｌ／分で、１ＣＶ溶出体積で分解した。タンパク質溶出は、OD_{280}でモニターし、０．５ｍｌ画分で回収した。ＳＭＣＡ試料ごとに、主ピークを含んだ画分（画分は、Ｃａｌｉｐｅｒによって評価した）をプールし、実施例１９及び２０に記載されるようにさらに生物物理学的に特徴付けた。

【０５５１】

実施例１８：分取サイズ排除クロマトグラフィーによるハーフ抗体の除去

実施例１６では、産生されたハーフＡｂのパーセンテージは、ＤＮＡ滴定によって操作することができる、または、「Ｆｃ鎖Ａ」タイプのハーフＡｂの場合には、これらは、プロテインＡ精製されたＳＭＣＡ試料の分取ＳＥＣ精製によって除去／最小化することもできるため、ハーフＡｂは、「総二重特異性」計算に従って、対合の計算から排除されたことが確認された。「Ｆｃ鎖Ａハーフ Ａｂ」の除去を実証するため、３つ全ての二重特異性系における２つのＫ－Ｌ設計に対する実施例１７の精製されたＳＭＣＡ試料に、実施例１６に記載されるようにＬＣ－ＭＳ分析を施した。選択された２つのＫ－Ｌ設計は、（表１１Ａで同定されたように）２９０１及び３９７２であった。結果を表１８に示す。

【０５５２】

表１８のＬＣ－ＭＳデータを、表１４のプロテインＡ精製されたＳＭＣＡ試料のそれぞれのＬＣ－ＭＳデータと比較することで、分取ＳＥＣが、「Ｆｃ鎖Ａ」タイプ（２９０１及び３９７２中のＨ１Ｌ１）のハーフＡｂ種の除去／最小化に有効になり得ることが示される。試験した全ての試料では、所望の二重特異性抗体種（Ｈ１Ｌ１＿Ｈ２Ｌ２及びＨ１Ｌ２＿Ｈ２Ｌ１）のパーセンテージの濃縮、並びに「Ｆｃ鎖Ａ」タイプ（表１８のＨ１Ｌ１）のハーフ抗体種のパーセンテージの減少が存在した。

【０５５３】

実施例１９：ＳＭＣＡ二重特異性抗体の熱安定性。

分取ＳＥＣ後、分取ＳＥＣ精製されたＳＭＣＡ二重特異性抗体の熱安定性を測定し、アミノ酸置換が熱安定性に任意の効果を有したかどうかを判断するために、親ＣＡＴ－２２００、ペルツズマブ、ＣＲ８０７１及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａモノクローナル抗体と比較した。

【０５５４】

熱安定性の測定

選択された二重特異性ヘテロ二量体抗体及び野生型対照の熱安定性は、以下のように、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）を用いて測定した。

分取ＳＥＣ処理後、ＰＢＳ中の０．４ｍｇ／ｍｌの主濃度の試料４００μＬを、ＶＰ－キャピラリーＤＳＣ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、ＤＳＣ分析のために使用した。各ＤＳＣ起動の開始時に、緩衝液ブランクの注入を５回行って、ベースラインを安定させ、参照用の各試料注入前には、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、３分間のｐｒｅＴｓｔａｔ、及び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。

【０５５５】

結果を表２０及び表２１に示す。表で報告された「野生型からのＦａｂ　Ｔｍの平均差（℃）」を計算するために使用した野生型Ｆａｂ　Ｔｍ値は、ＣＡＴ－２２００（７１．２℃）、ペルツズマブ（７６．７℃）、ＣＲ８０７１（６６．９℃、主ピークに対応）、及びＳＧＮ－ＣＤ１９ａ（９１．０℃）の親抗体のＤＳＣサーモグラムから得られた。ＣＲ８０７１親抗体は、２つのＦａｂ転移を示した。親抗体の場合、追加の熱転移は、（それぞれ、おおよそ７１℃及び８２℃で）ＦｃのＣＨ２及びＣＨ３ドメインで観察され、これらは、Ｆａｂ転移で重なり合わなかった（図１２）。大量のＨ２Ｌ２「Ｆｃ鎖Ｂ」ハーフ抗体を有するいくつかの設計は、おおよそ６０℃で追加の熱転移を示し、これは、非共

有結合ホモ二量体の存在による可能性が高かった。いくつかの場合では、設計が、ペルツズマブＦａｂのＴｍの減少を引き起こした結果、これらの試料中でＣＡＴ－２２００　Ｆａｂ、ペルツズマブＦａｂ、及びＣＨ２ピークの重なりをもたらした（図１２Ａ、代表的な設計３９７２）。同様に、多くの設計は、これらの抗体中でＣＨ３ピークとの重なりを引き起こした程度にまでＳＧＮ－ＣＤ１９ａ　ＦａｂのＴｍを減少させた（図１２Ｂ及び１２Ｃ、代表的な設計３９７２）。これらの重なりは、寄与するＦａｂ成分のＴｍ　割り当てに幾つかの曖昧さをもたらしたため、表２０及び２１で報告されたＴｍ値は、近似と考えられる。興味深いことに、２つの転移ではなく単一のＣＲ８０７１　Ｆａｂ転移を示した設計を含有するＣＲ８０７１／ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ二重特異性抗体が、野生型の二重特異性抗体で観察された（例えば、図１２Ｃ）。

【０５５６】

試験した全てのＫ－Ｌ設計のうち、全ての系にわたる野生型からのＦａｂ　Ｔｍの平均差は、６設計で０℃～－１．５℃、１１設計で－１．５℃～－３．０×、１５設計で－３．０℃～－４．５℃であった（表２０）。試験した全てのＫ－Ｋ由来Ｋ－Ｌ設計のうち、平均差は、２設計で０℃～－１．５℃、１設計で－１．５℃～－３．０℃、及び１設計で－３．０℃～－４．５℃であった（表２１）。試験した設計にわたる野生型からのＦａｂＴｍの平均差は、ＣＡＴ－２２００で－０．９℃（ＳＴＤＥＶ＝１．４）、ペルツズマブで－４．６℃（ＳＴＤＥＶ＝１．６）、ＳＧＮ－ＣＤ１９ａで－５．８℃（ＳＴＤＥＶ＝３．５）、及びＣＲ８０７１で＋１．１℃（ＳＴＤＥＶ＝０．８）であった。図１３は、試験した全ての設計（「Ａｌｌ」）、またはパラトープ（ＣＡＴ－２２００、ペルツズマブ、ＣＲ８０７１、またはＳＧＮ－ＣＤ１９ａ）による、試験した設計の親抗体と比較したＦａｂ　Ｔｍの変化の箱ひげ図を示す。

【０５５７】

実施例２０：二重特異性抗体の抗原親和性測定

二重特異性抗体が適当な抗原と結合する能力は、アミノ酸置換が、抗原結合に任意の効果を有したかどうかを判断するために評価した。抗原結合親和性は、以下のようにＳＰＲによって決定された。

【０５５８】

ＳＰＲバイオセンサーアッセイ

Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００：ＣＭ５シリーズＳセンサーチップで試験するために、Ｂｉａｃｏｒｅアミンカップリングキット（ＮＨＳ、ＥＤＣ、及び１Ｍエタノールアミン）、及び１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液は、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ，Ｃａｎａｄａ）から購入した。Ｂｉｏｒａｄ　ＰｒｏｔｅＯｎ：ＧＬＭセンサーチップで試験するために、Ｂｉｏｒａｄ　ＰｒｏｔｅＯｎアミンカップリングキット（ＥＤＣ、ｓＮＨＳ、及びエタノールアミン）、及び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。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。抗原：Ｈｉｓタグ付き組換えヒトＣＤ－１９は、Ａｂｅａｍ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）から購入し、Ｈｉｓタグ付きインフルエンザＢヘマグルチニン（Ｂ／Ｂｒｉｓｂａｎｅ／６０／２００８）は、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ（Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）から購入した。組換えＨｅｒ２細胞外ドメイン（ＥＣＤ）タンパク質は、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から購入した。組換えヒトＩＬ－１７Ａは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）から購入した。

【０５５９】

抗原ヘマグルチニン及びＣＤ－１９による表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイを、２５℃の温度で、（０．５Ｍ　ＥＤＴＡ原液を添加して３．４ｍＭの最終濃度にした）Ｐ

ＢＳＴ泳動緩衝液を用いるＢｉａｃｏｒｅ Ｔ２００装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて実行した。抗原ＨＥＲ２ ＥＣＤ及びＩＬ－１７による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。

【０５６０】

ＳＧＮ－ＣＤ１９ａ：ＣＤ－１９親和性決定は、以下のように実行した。

ＣＤ－１９抗原と結合するための抗体（分取ＳＥＣ精製されたＳＭＣＡ試料及びＯＡＡ対照）のスクリーニングは、抗Ｈｉｓ ＩｇＧ表面上にＨｉｓタグ付きＣＤ－１９の間接的捕捉、続いて、単一サイクル動態を用いた動態分析のために５つの濃度の精製された抗体の注入、という２つのステップにおいて行われた。製造者の指示に従って、活性及び参照フローセルの上におおよそ１２０００ＲＵの抗Ｈｉｓ ＩｇＧ（Ｈｉｓ Ｃａｐｔｕｒｅ Ｋｉｔ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）をアミンカップリングすることによって、抗Ｈｉｓ捕捉表面を、ＣＭ５シリーズＳセンサーチップ上に調製した。ＣＤ－１９を、１０μｌ／分の流量で６０秒間、活性フローセルの上に１０μｇ／ｍｌで注入した。一般に、これは、抗Ｈｉｓ ＩｇＧ表面の上におおよそ２５０ＲＵのＣＤ－１９の捕捉をもたらした。ＣＤ－１９は、参照（ブランク）フローセル上に捕捉されなかった。捕捉ステップの後、続いて、５つの濃度の精製された抗体（抗体に応じて、２００ｎＭ及び２倍希釈液、８０ｎＭ及び２倍希釈液、または４０ｎＭ及び２倍希釈液）を、６００秒の解離相をおいて、４０μＬ／分で１８０秒間、活性及び参照フローセルの両方の上に順次注入した。捕捉された抗体表面を、１０ｍＭグリシンｐＨ１．５によって３０μＬ／分で１２０秒間再生成し、表面を次の注入サイクル用に調製した。少なくとも２つのモック緩衝液注入を分析物注入ごとに行い、参照用に使用した。得られた単一サイクル動態センサーグラムをＢｉａｃｏｒｅ Ｔ２００ ＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアバージョン３．０を用いて分析し、１：１の結合モデルにフィットさせた。

【０５６１】

ＣＲ８０７１：ヘマグルチニン親和性決定は、以下のように実行した。

ヘマグルチニン（ＨＡ）を１０ｍＭ酢酸緩衝液ｐＨ５．５中で希釈し、アミンカップリングを介して、ＣＭ５シリーズＳセンサーチップ上に直接固定化した。これにより、おおよそ１２０～１３０ＲＵの固定化されたＨＡが得られた。参照フローセルは、ブランク対照として使用するために空のままにした（エタノールアミン遮断された）。単一サイクル動態を用いた動態分析のために抗体をＨＡ表面上に注入した。続いて、５つの濃度（４０ｎＭ及び２倍希釈液）の精製された抗体（分取ＳＥＣ精製されたＳＭＣＡ試料及びＯＡＡ対照）を、３６００秒の解離相をおいて、５０μＬ／分で３００秒間、活性及び参照フローセルの両方の上に順次注入した。ＨＡ表面を、２サイクルの１０ｍＭグリシンｐＨ１．５を用いて、３０μＬ／分で１２０秒間再生成し、表面を次の注入サイクル用に調製した。少なくとも２つのモック緩衝液注入を分析物注入ごとに行い、参照用に使用した。得られた単一サイクル動態センサーグラムを、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００ ＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアバージョン３．０を用いて分析し、１：１の結合モデルにフィットさせた。

【０５６２】

ＣＡＴ－２２００：ＩＬ－１７親和性決定は、以下の改変を加えて、実施例６で上述したように実行した：試験した抗体は、ＣＡＴ－２２００ Ｆａｂではなく、分取ＳＥＣ精製されたＳＭＣＡ試料及びＯＡＡ対照であった。対照抗体１３６１２のうちの１つを、６０ｎＭではなく１０ｎＭで開始して注入した。

【０５６３】

ペルツズマブ：ＨＥＲ２親和性決定は、以下のように実行した。全ての株を、２５μｇ／ｍｌヤギ抗ヒトＩｇＧ，Ｆｃγ断片特異的（抗ヒトＦｃ）で水平に固定化した。平均で４０５８共鳴単位（ＲＵ）を固定化した。抗ヒトＦｃ抗体捕捉表面を、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

１：１０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中の抗ヒトＦｃ抗体の２５μｇ／ｍＬの溶液を、おおよそ４０００共鳴単位（ＲＵ）が固定されるまで、２５μＬ／分の流量で２４０秒間、分析物（垂直）方向に注入した。分析物方向に３０μＬ／分で３００秒間、１Ｍのエタノールアミンの１４０秒間の注入により、残りの活性基を急冷し、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。ＨＥＲ２と結合する抗体のスクリーニングは、リガンド方向に抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃγ断片特異的な）表面上に抗体（分取ＳＥＣ精製されたＳＭＣＡ試料及びＯＡＡ対照）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ＨＥＲ２　ＥＣＤ及び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１００μＬ／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。抗体の捕捉ごとに、抗体を、ＰＢＳＴ中で２μｇ／ｍｌに希釈した。１～５つの抗体または対照を、個々のリガンドチャネル中に２５μＬ／分の流量で４８０秒間同時に注入した。これにより、抗ヒトＦｃ表面上におおよそ８００～１２００ＲＵ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。この捕捉ステップの直後に、緩衝液を１回、分析物方向に注入してベースラインを安定させた後、１００ｎＭ、３３．３ｎＭ、１１．１ｎＭ、３．７ｎＭ及び０．４１ｎＭ　Ｈｅｒ２を、緩衝液ブランクと共に、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２回の１８秒間のパルスで１００μＬ／分で再生成し、次の注入サイクル用に調製した。緩衝液ブランクの注入及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を使用して分析した。二重参照されたセンサーグラムをラングミュア結合モデルにフィットさせた。

【０５６４】

ヘテロ二量体抗体の抗原親和性は、それぞれのＯＡＡ（ワンアームド）野生型対照を参照しながら評価した。野生型二重特異性抗体に対する抗原親和性も得られたが；しかしながら、野生型の二重特異性のＳＰＲ捕捉は、異質であり得る（例えば、誤対合ヘテロ二量体の捕捉を伴う）ため、ＫＤ決定に干渉する。さらに、野生型親和性は、抗体に存在する関連軽鎖タグを含有するＯＡＡ形式で測定された。タグの存在は、ＣＤ１９に対するＳＧＮ－ＣＤ－１９ａの親和性を４～５倍ほど減少させるように観察された（表１９）。例えば、ＣＤ１９に対するＳＧＮ－ＣＤ－１９ａの測定された結合親和性は、ＦＬＡＧタグを軽鎖に付加することで６７．５ｎＭから２２４．５ｎＭに減少した（表１９）。そのため、野生型に対する親和性の変化の全ての計算は、マッチングタグ付き野生型構築物の中央値を用いて行った。

【０５６５】

ＣＤ－１９との結合を測定する場合、いくつかの抗体のセンサーグラムは、１：１結合モデルにフィットできなかった。これらの場合には、抗体は、ホモ二量体化しやすい大量の「Ｆｃ鎖Ｂ」ハーフ抗体を含有したことで、アビディティー効果を引き起こし、Ｆａｂ結合挙動を不明瞭にさせた。影響を受けた抗体の場合、結合親和性をＯＡＡ形式でさらに評価した。

【０５６６】

試験した設計（作成した９６個の二重特異性抗体に対応する３６個の設計）の大部分は、それぞれの野生型のものに匹敵するＫＤ値を示した（表２０及び２１、図１４）。９つの設計されたＦａｂは、野生型と比較して、２～３倍の親和性減少を示し、単一設計されたＦａｂでは、４倍の親和性減少が観察された。これら１０個のＦａｂのうち、ただ１つの設計（＃３４）が２回存在し、１０個の影響を受けたＦａｂのうちの８つが、ＣＲ８０７１であった。全ての弾頭を有する設計の野生型からのｌｏｇ（ＫＤ）の平均差（－（ｌｏｇ　ＫＤ＿抗体－ｌｏｇ　ＫＤ＿ｗｔ））は、０．１８７の標準偏差で０．００３であった（例えば、－０．３は、親和性の２倍の減少に対応し、－０．６は、親和性の４倍の減

少に対応する）。これらの結果を図１４にまとめる。図１４は、試験した全ての設計（「Ａｌｌ」）、またはパラトープ（ＣＡＴ－２２００、ペルツズマブ、ＣＲ８０７１、またはＳＧＮ－ＣＤ１９ａ）による、試験した設計の親抗体と比較した親和性の変化の箱ひげ図を示す。

【０５６７】

実施例２１：親抗体と比較した遺伝子操作された二重特異性抗体の高速液体クロマトグラフィーサイズ排除クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ－ＳＥＣ）プロファイル

遺伝子操作された二重特異性抗体の品質を評価するため、実施例１７と同様に分取ＳＥＣにより精製された抗体にＵＰＬＣ－ＳＥＣを施した。ＵＰＬＣ－ＳＥＣを、３０℃に設定し、ＰＤＡ検出器を備えたＷａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣシステム上に取り付けられたＷａｔｅｒｓ　ＢＥＨ２００　ＳＥＣカラム（２．５ｍＬ、４．６×１５０ｍｍ、ステンレス鋼、１．７μｍ粒子）を用いて行った。泳動時間は、７分からなり、０．４ｍｌ／分で、ＰＢＳ及び０．０２％のＴｗｅｅｎ２０　ｐＨ７．４の泳動緩衝液による注入１回当たりの総体積は、２．８ｍＬであった。溶出は、２１０～４００ｎｍの範囲でＵＶ吸光度によりモニターし、クロマトグラムを２８０ｎｍで抽出した。ピーク積分は、Ｅｍｐｏｗｅｒ　３ソフトウェアを用いて行った。

【０５６８】

図１５Ａ～Ｄは、親抗体のＵＰＬＣ－ＳＥＣプロファイルを示し、図１５Ｅ～Ｇは、３つの二重特異性系における設計３９７２抗体に対応するものを示す。例示的な設計３９７２をここで使用し、高二重特異性含有量（＞８０％）の設計された／遺伝子操作された二重特異性抗体が、親抗体のものに匹敵するＵＰＬＣ－ＳＥＣプロファイルを有することが実証された。そのような遺伝子操作された二重特異性抗体の場合、モノマー種の中央値パーセンテージは、９５．２％である（すなわち、高分子量種がほとんどまたは全く検出されなかった）。

【０５６９】

本明細書の本文内に引用された全ての参考文献、出願特許及び特許出願、及び配列受託番号（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号）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。

【０５７０】

表１：Ｆａｂモデルの基準

基準	重要性
ヒトまたはヒト化ＩｇＧ１／κまたはＩｇＧ１／λは、一般的に使用されるV_H及び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 ３Ｄ構造は、典型的なカッパまたはラムダ立体構造（低ペアワイズ計算されたＲＭＳＤ）を表す	類似性
アポ及び複合化Ｆａｂに利用可能な構造 抗原への結合時に大きな構造変化は観察されない	設計
抗原結合は容易に評価することができる	アッセイ

【０５７１】

表２：Ｄ３Ｈ４４（１ＪＰＴ、カッパ軽鎖を含有する典型的なＦａｂ）及びＣＡＴ－２２００（２ＶＸＳ、ラムダ軽鎖を含有する典型的なＦａｂ）における重鎖及び軽鎖の接続部分でのホットスポットアミノ酸位置（アスタリスクでマーク）．

重鎖（Ｋａｂａｔ番号付け）			
１ＪＰＴ	１ＪＰＴホットスポット	２ＶＸＳホットスポット	２ＶＸＳ
Ｆ１２２	*	*	Ｆ１２２
Ｓ１３０	*		Ｓ１３０
Ｓ１３４	*		Ｓ１３４
Ａ１３９	*		Ａ１３９
Ｌ１４３		*	Ｌ１４３
Ｋ１４５	*	*	Ｋ１４５
Ｈ１７２	*	*	Ｈ１７２
Ｆ１７４	*	*	Ｆ１７４
Ｐ１７５	*		Ｐ１７５
Ｖ１７７	*	*	Ｖ１７７
Ｓ１８８		*	Ｓ１８８
Ｋ２２８	*	*	Ｋ２２８

軽鎖（Ｋａｂａｔ番号付け）			
１ＪＰＴ	１ＪＰＴホットスポット	２ＶＸＳホットスポット	２ＶＸＳ
Ｆ１１６	*		Ｔ１１６
Ｆ１１８	*	*	Ｆ１１８
Ｐ１１９	*		Ｐ１１９
Ｅ１２３	*	*	Ｅ１２３
Ｌ１３５	*	*	Ｌ１３５
Ｎ１６０	*	*	Ｅ１６０
Ｅ１６１			Ｔ１６１
Ｓ１６２	*	*	Ｔ１６２
Ｔ１６４	*		Ｐ１６４
Ｔ１７８		*	Ｙ１７８

【０５７２】

表 3A. D3H44、ペルツズマブ、及び CAT-2200 Fabs の重鎖アミノ酸配列の Kabat 番号付け

表 3A			
重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 1）	CAT-2200 （配列番号 3）
1	E	E	E
2	V	V	V
3	Q	Q	Q
4	L	L	L
5	V	V	L
6	E	E	E
7	S	S	S
8	G	G	G
9	G	G	G
10	G	G	G
11	L	L	L
12	V	V	V
13	Q	Q	Q
14	P	P	P
15	G	G	G
16	G	G	G
17	S	S	S
18	L	L	L
19	R	R	R
20	L	L	L
21	S	S	S
22	C	C	C
23	A	A	A
24	A	A	A
25	S	S	S
26	G	G	G
27	F	F	F
28	N	T	T
29	I	F	F
30	K	T	S
31	E	D	S
32	Y	Y	Y
33	Y	T	A
34	M	M	M
35	H	D	S
36	W	W	W
37	V	V	V
38	R	R	R

表 3A

重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 1）	CAT-2200 （配列番号 3）
39	Q	Q	Q
40	A	A	A
41	P	P	P
42	G	G	G
43	K	K	K
44	G	G	G
45	L	L	L
46	E	E	E
47	W	W	W
48	V	V	V
49	G	A	S
50	L	D	A
51	I	V	I
52	D	N	S
52A	P	P	G
53	E	N	S
54	Q	S	G
55	G	G	G
56	N	G	S
57	T	S	T
58	I	I	Y
59	Y	Y	Y
60	D	N	A
61	P	Q	D
62	K	R	S
63	F	F	V
64	Q	K	K
65	D	G	G
66	R	R	R
67	A	F	F
68	T	T	T
69	I	L	I
70	S	S	S
71	A	V	R
72	D	D	D
73	N	R	N
74	S	S	S
75	K	K	K
76	N	N	N
77	T	T	T
78	A	L	L
79	Y	Y	Y
80	L	L	L
81	Q	Q	Q

表 3A

重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 1）	CAT-2200 （配列番号 3）
82	M	M	M
82A	N	N	N
82B	S	S	S
82C	L	L	L
83	R	R	R
84	A	A	A
85	E	E	E
86	D	D	D
87	T	T	T
88	A	A	A
89	V	V	V
90	Y	Y	Y
91	Y	Y	Y
92	C	C	C
93	A	A	A
94	R	R	R
95	D	N	D
96	T	L	L
97	A	G	I
98	A	P	H
99	Y	S	G
100	F	F	V
100A	-	Y	T
100B	-	F	-
101	D	D	R
102	Y	Y	N
103	W	W	W
104	G	G	G
105	Q	Q	Q
106	G	G	G
107	T	T	T
108	L	L	L
109	V	V	V
110	T	T	T
111	V	V	V
112	S	S	S
113	S	S	S
114	A	A	A
115	S	S	S
116	T	T	T
117	K	K	K
118	G	G	G
119	P	P	P
120	S	S	S

表 3A

重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ（配列番号 1）	CAT-2200（配列番号 3）
121	V	V	V
122	F	F	F
123	P	P	P
124	L	L	L
125	A	A	A
126	P	P	P
127	S	S	S
128	S	S	S
129	K	K	K
130	S	S	S
133	T	T	T
134	S	S	S
135	G	G	G
136	G	G	G
137	T	T	T
138	A	A	A
139	A	A	A
140	L	L	L
141	G	G	G
142	C	C	C
143	L	L	L
144	V	V	V
145	K	K	K
146	D	D	D
147	Y	Y	Y
148	F	F	F
149	P	P	P
150	E	E	Q
151	P	P	P
152	V	V	V
153	T	T	T
154	V	V	V
156	S	S	S
157	W	W	W
162	N	N	N
163	S	S	S
164	G	G	G
165	A	A	A
166	L	L	L
167	T	T	T
168	S	S	S
169	G	G	G
171	V	V	V
172	H	H	H

表 3A

重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ（配列番号 1）	CAT-2200（配列番号 3）
173	T	T	T
174	F	F	F
175	P	P	P
176	A	A	A
177	V	V	V
178	L	L	L
179	Q	Q	Q
180	S	S	S
182	S	S	S
183	G	G	G
184	L	L	L
185	Y	Y	Y
186	S	S	S
187	L	L	L
188	S	S	S
189	S	S	S
190	V	V	V
191	V	V	V
192	T	T	T
193	V	V	V
194	P	P	P
195	S	S	S
196	S	S	S
197	S	S	S
198	L	L	L
199	G	G	G
200	T	T	T
203	Q	Q	Q
205	T	T	T
206	Y	Y	Y
207	I	I	I
208	C	C	C
209	N	N	N
210	V	V	V
211	N	N	N
212	H	H	H
213	K	K	K
214	P	P	P
215	S	S	S
216	N	N	N
217	T	T	T
218	K	K	K
219	V	V	V
220	D	D	D

表 3A			
重鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 1）	CAT-2200 （配列番号 3）
221	K	K	K
222	K	K	K
223	V	V	V
226	E	E	E
227	P	P	P
228	K	K	K
232	S	S	S
233	C	C	C
234	D	D	D
235	K	K	K
236	T	T	T
237	H	H	H
238	T	T	T

【０５７３】

表 3B. D3H44、ペルツズマブ、及び CAT-2200 の軽鎖アミノ酸配列の Kabat 番号付け

表 3B			
軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ (配列番号 2)	CAT-2200 (配列番号 4)
1	D	D	N
2	I	I	F
3	Q	Q	M
4	M	M	L
5	T	T	T
6	Q	Q	Q
7	S	S	P
8	P	P	H
9	S	S	S
10	S	S	-
11	L	L	V
12	S	S	S
13	A	A	E
14	S	S	S
15	V	V	P
16	G	G	G
17	D	D	K
18	R	R	T
19	V	V	V
20	T	T	T
21	I	I	I
22	T	T	S
23	C	C	C
24	R	K	T
25	A	A	R
26	S	S	S
27	R	Q	S
27A	-	-	G
27B	-	-	S
28	D	D	L
29	I	V	A
30	K	S	N
31	S	I	Y
32	Y	G	Y
33	L	V	V
34	N	A	Q
35	W	W	W
36	Y	Y	Y
37	Q	Q	Q
38	Q	Q	Q
39	K	K	R
40	P	P	P

表 3B

軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 2）	CAT-2200 （配列番号 4）
41	G	G	G
42	K	K	S
43	A	A	S
44	P	P	P
45	K	K	T
46	V	L	I
47	L	L	V
48	I	I	I
49	Y	Y	F
50	Y	S	A
51	A	A	N
52	T	S	N
53	S	Y	Q
54	L	R	R
55	A	Y	P
56	E	T	S
57	G	G	G
58	V	V	V
59	P	P	P
60	S	S	D
61	R	R	R
62	F	F	F
63	S	S	S
64	G	G	G
65	S	S	S
66	G	G	I
66A	-	-	D
66B	-	-	S
67	S	S	S
68	G	G	S
69	T	T	N
70	D	D	S
71	Y	F	A
72	T	T	S
73	L	L	L
74	T	T	T
75	I	I	I
76	S	S	S
77	S	S	G
78	L	L	L
79	Q	Q	K
80	P	P	T
81	E	E	E
82	D	D	D

表 3B

軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ (配列番号 2)	CAT-2200 (配列番号 4)
83	F	F	E
84	A	A	A
85	T	T	D
86	Y	Y	Y
87	Y	Y	Y
88	C	C	C
89	L	Q	Q
90	Q	Q	T
91	H	Y	Y
92	G	Y	D
93	E	I	P
94	S	Y	Y
95	P	P	S
96	W	Y	V
97	T	T	V
98	F	F	F
99	G	G	G
100	Q	Q	G
101	G	G	G
102	T	T	T
103	K	K	K
104	V	V	L
105	E	E	T
106	I	I	V
106A	-	-	L
107	K	K	G
108	R	R	Q
109	T	T	P
110	V	V	K
111	A	A	A
112	A	A	A
113	P	P	P
114	S	S	S
115	V	V	V
116	F	F	T
117	I	I	L
118	F	F	F
119	P	P	P
120	P	P	P
121	S	S	S
122	D	D	S
123	E	E	E
124	Q	Q	E
125	L	L	L

表 3B

軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ （配列番号 2）	CAT-2200 （配列番号 4）
126	K	K	Q
127	S	S	A
128	G	G	N
129	T	T	K
130	A	A	A
131	S	S	T
132	V	V	L
133	V	V	V
134	C	C	C
135	L	L	L
136	L	L	I
137	N	N	S
138	N	N	D
139	F	F	F
140	Y	Y	Y
141	P	P	P
142	R	R	G
143	E	E	A
144	A	A	V
145	K	K	T
146	V	V	V
147	Q	Q	A
148	W	W	W
149	K	K	K
150	V	V	A
151	D	D	D
152	N	N	S
153	A	A	S
154	L	L	P
155	Q	Q	V
156	S	S	K
157	G	G	A
158	N	N	G
159	S	S	V
160	Q	Q	E
161	E	E	T
162	S	S	T
163	V	V	T
164	T	T	P
165	E	E	S
166	Q	Q	K
167	D	D	Q
168	S	S	S
169	K	K	-

表 3B			
軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ (配列番号 2)	CAT-2200 (配列番号 4)
170	D	D	N
171	S	S	N
172	T	T	K
173	Y	Y	Y
174	S	S	A
175	L	L	A
176	S	S	S
177	S	S	S
178	T	T	Y
179	L	L	L
180	T	T	S
181	L	L	L
182	S	S	T
183	K	K	P
184	A	A	E
185	D	D	Q
186	Y	Y	W
187	E	E	K
188	K	K	S
189	H	H	H
190	K	K	R
191	V	V	S
192	Y	Y	Y
193	A	A	S
194	C	C	C
195	E	E	Q
196	V	V	V
197	T	T	T
198	H	H	H
199	Q	Q	E
200	G	G	G
201	L	L	-
202	S	S	-
203	S	S	S
204	P	P	T
205	V	V	V
206	T	T	E
207	K	K	K
208	S	S	T
209	F	F	V
210	N	N	A
211	R	R	P
212	G	G	T
213	E	E	E

表 3B			
軽鎖起源			
KABAT 番号付け	D3H44	ペルツズマブ (配列番号 2)	CAT-2200 (配列番号 4)
214	C	C	C
215	-	-	S

【０５７４】

表 3C.アミノ酸及び DNA 配列

配列番号:	記述（配列に対して番号付けされたアミノ酸残基）	配列
1	ペルツズマブ重鎖Fab（ドメイン境界：VH；E1 - S119、CH1；A120 - V217、ヒンジ（部分）；E218 - T227）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
2	ペルツズマブ軽鎖（カッパ）（ドメイン境界：VL；D1 - K107、CL；R108 - C214）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	CAT-2200 重鎖 Fab（ドメイン境界：VH；E1 - S118、CH1；A119 - V216、ヒンジ（部分）；E217 - T226）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP QPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
4	CAT-2200 軽鎖（ラムダ）（ドメイン境界：VL；N1 - L110、CL；G111 - S216）	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYYVQWYQQRPGSSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTI SGLKTEDEADYYCQTYDPYSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
5	IgG1 Fc（ドメイン境界：ヒンジ（部分）；C1 - P5、CH2；A6 - K115、CH3；G116 - K222）	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	IgG1 Fc	TGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACAC TCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCCA CTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGT CAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAG GTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCT TCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCA GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGA ACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCG GCAAA
7	ペルツズマブ重鎖 Fab	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCT AGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTCG CCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCCTGTCAGTGGA CCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCC GGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTCTGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACC AAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCT GGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCT TTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGA ACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAGTC TTGTGATAAAACCCATACA
8	ペルツズマブ軽鎖（カッパ）	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGC TTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTATA GCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACTCTGACC ATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCC AGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAG CTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGA AGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTA TAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACA CATCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
9	CAT-2200 重鎖 Fab	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGGGGCCTGGTGCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTGTCATGTGCTGCC AGCGGGTTTACTTTCAGCTCCTACGCTATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCCGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCT CTGCAATCAGTGGGTCAGGCGGGAGTACTTACTATGCCGACAGCGTGAAGGGACGGTTCACTATCTCAAGAGA TAACAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCAGAAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCC AGGGATCTGATCCACGGAGTCACTCGCAATTGGGGCCAGGGGACTCTGGTGACCGTCTCTAGTGCTAGCACAA AGGGGCCCTCTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCAAGCAAAAGCACATCCGGAGGAACTGCAGCTCTGGGATGTCT GGTGAAGGACTACTTCCCCCAGCCTGTGACCGTCTCTTGGAACAGTGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACA TTTCCTGCTGTCCTGCAGTCCTCTGGCCTGTACTCCCTGAGTTCAGTGGTCACAGTGCCTAGCTCCTCTCTGGGG ACCCAGACATATATTTGCAACGTGAATCATAAACCAAGCAACACTAAGGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGA GCTGTGATAAAACTCATACC

配列番号:	記述（配列に対して番号付けされたアミノ酸残基）	配列
10	CAT-2200 軽鎖（ラムダ）	AACTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCCGTGTCCGAGAGCCCTGGCAAAACTGTGACTATTTCATGTACCCGATCA TCTGGAAGCCTGGCCAACTACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCAGCTCCCCCACTATCGTGATTTT CGCTAACAATCAGCGGCCTTCCGGCGTCCCAGACAGATTTTCCGGGTCTATCGATTCTAGTTCAAATAGTGCATC ACTGACTATTTCCGGGCTGAAGACCGAGGACGAAGCCGATTACTATTGCCAGACCTACGACCCCTATTCTGTGG TCTTCGGCGGGGGAACCAAGCTGACAGTGCTGGGACAGCCAAAAGCGGCGCCCAGTGTCACACTGTTTCCCCC TAGCTCCGAGGAACTGCAGGCTAACAAAGCAACACTGGTGTGTCTGATCAGCGACTTCTACCCTGGAGCTGTG ACTGTCGCCTGGAAGGCTGATTCTAGTCCAGTGAAAGCAGGCGTCGAGACCACAACTCCCTCTAAGCAGAGTA ACAACAAGTACGCAGCCTCAAGCTATCTGTCACTGACCCCAGAACAGTGGAAGAGCCACCGGAGCTATTCCTGC CAGGTCACTCACGAAGGCTCCACTGTCGAGAAAACCGTCGCTCCCACCGAATGTTCA
11	ヒンジを有さないヒト IgG1 Fc 配列 231-447（EU-番号付け）	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	SGN-CD19a 重鎖 Fab（ドメイン境界：VH；Q1 - S120、CH1；A121 - V218、ヒンジ（部分）；E219 - T228）	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSK NQVVLTMTNMDPVDTAAYYCARMELWSYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
13	SGN-CD19a 軽鎖（カッパ）（ドメイン境界：VL；E1 - K106、CL；R107 - C213）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCFQQSVYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
14	CR8071 重鎖 Fab（ドメイン境界：VH；Q1 - S125、CH1；A126 - V223、ヒンジ（部分）；E224 - T233）	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCRASGYIFTESGITWVRQAPGQGLEWMGWISGYSGDTKYAQKLQGRVTMTKDT STTTAYMELRSLRYDDTAVYYCARDVQYSGSYLGAYYFDYWSPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HT
15	CR8071 軽鎖（ラムダ）（ドメイン境界：VL；Q1 - L110、CL；R111 - S216）	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQFPGTAPKLLIYRSYQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGL QSEDEADYYCATWDDSLDGWVFGGGTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
16	SGN-CD19a 重鎖 Fab	CAGGTGACACTGAGAGAATCCGGCCCAGCCCTGGTGAAGCCCACTCAGACCCTGACACTGACTTGCACCTTCTC TGGGTTTTCCCTGTCTACAAGTGGGATGGGAGTGGGATGGATCAGGCAGCCACCTGGAAAAGCCCTGGAGTG GCTGGCTCACATTTGGTGGGACGATGACAAGCGGTACAACCCAGCACTGAAAAGCAGACTGACAATCAGCAAG GATACTTCCAAAAACCAGGTGGTCCTGACAATGACTAATATGGACCCCGTGGACACAGCCGCTTACTATTGCGC CCGCATGGAACTGTGGAGCTACTATTTCGACTACTGGGGGCAGGGAACACTGGTCACTGTGAGCTCCGCTAGC ACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATG TCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCAT ACTTTTCCCGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTG GGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCA AGAGCTGTGATAAAACTCATACC
17	SGN-CD19a 軽鎖（カッパ）	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGCCACCCTGTCCTGCTCTGC CAGCTCCAGCGTGAGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTAGGCTGCTGATCTACGAC ACCAGCAAGCTGGCCTCCGGCATCCCCGCAAGATTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACAAT CAGCTCCCTGGAGCCTGAGGATTTCGCCGTGTACTATTGTTTTCAGGGCAGCGTGTATCCATTCACCTTTGGCCA GGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGGACAGTGGCGGCGCCCAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTAGCGACGAACAG CTGAAGTCTGGGACAGCCAGTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTAGAGAGGCTAAAGTGCAGTGGA AGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTA TTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCC ACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGAGGGGAGTGC
18	CR8071 重鎖 Fab	CAGGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGGGCTGAAGTGAAAAAACCTGGGGCATCCGTGCGGGTGTCATGTCGGGCA AGCGGGTATATCTTTACTGAGTCTGGAATCACCTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGACAGGGACTGGAATGGATG GGATGGATTTCTGGATACAGTGGCGACACAAAGTATGCACAGAAACTGCAGGGCCGCGTCACCATGACAAAG GATACTTCAACCACAACTGCCTACATGGAGCTGCGGAGCCTGAGATATGACGATACAGCCGTGTACTATTGCGC CCGGGACGTGCAGTACAGCGGGTCCTACCTGGGGGCATACTACTTCGATTACTGGTCACCTGGAACTCTGGTC ACCGTCTCTTCAGCTAGCACCAAGGGCCCTTCTGTGTTTCCACTGGCACCCTCAAGCAAAAGCACCTCCGGAGG AACAGCAGCACTGGGATGTCTGGTCAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTCTCATGGAATAGCGGCGCA CTGACTAGTGGGGTGCACACCTTTCCCGCCGTCCTGCAGTCCTCTGGGCTGTACAGCCTGAGTTCAGTGGTCAC AGTGCCAAGCTCCTCTCTGGGAACTCAGACCTATATCTGCAACGTCAATCATAAACCCAGCAACACAAAGGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACC

配列番号:	記述（配列に対して番号付けされたアミノ酸残基）	配列
19	CR8071 軽鎖（ラムダ）	CAGAGCGTCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCCTCCGGAACACCTGGGCAGAGAGTGACTATCTCCTGTAGCGGATC AAGCTCAAACATTGGAACCAACTACGTGTATTGGTACCAGCAGTTCCCCGGCACAGCTCCTAAGCTGCTGATCT ATCGGAGCTACCAGAGACCAAGCGGGGTCCCCGACAGGTTTTCTGGCAGTAAATCAGGGAGCTCCGCCAGCCT GGCTATTTCCGGCCTGCAGTCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGCGCCACCTGGGACGATTCCCTGGATGGA TGGGTCTTCGGCGGCGGCACAAAACTGACCGTCCTGAGGCAGCCAAAGGCGGCGCCCAGTGTCACACTGTTTC CCCCTAGCTCCGAGGAACTGCAGGCTAACAAAGCAACACTGGTGTGTCTGATCAGCGACTTCTACCCTGGAGCT GTGACTGTCGCCTGGAAGGCTGATTCTAGTCCAGTGAAAGCAGGCGTCGAGACCACAACTCCCTCTAAGCAGA GTAACAACAAGTACGCAGCCTCAAGCTATCTGTCACTGACCCCAGAACAGTGGAAGAGCCACCGGAGCTATTCC TGCCAGGTCACTCACGAAGGCTCCACTGTCGAGAAAACCGTCGCTCCCACCGAATGTTCA

10

20

30

40

50

【０５７５】

表 4A：K-L 設計ライブラリー

表 4A –K-L 設計ライブラリー						
固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10771-11335	-	-	S186I_S188W	S176V	CAT-2200	ベルツズマブ
10771-11360	-	-	S186L_S188W	S176V	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11312	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11321	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143S_S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11353	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10780-11417	F174G	S176F	V190F	-	CAT-2200	ベルツズマブ
10781-11300	F174G	S176F	L143I_V190F	L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
10781-11419	F174G	S176F	V190F	L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
10786-11299	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	-	CAT-2200	ベルツズマブ
10786-11418	F174G	T116F_S176F	V190F	-	CAT-2200	ベルツズマブ
10787-11301	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
10787-11420	F174G	T116F_S176F	V190F	L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
10788-11422	F174G	T116F_S176F	V190F	L135A_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10792-11305	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10792-11424	F174G	T116F_S176F	V190F	T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10793-11375	F174G	T116F_S176F	S188F	V133A	CAT-2200	ベルツズマブ
10795-11390	K145T_S188E	Y178K	S188K	S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10796-11396	K145T_S188E	Y178K	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-11256	K145T_S188E	Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-11268	K145T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10800-11416	K145T_S188E	Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10806-11326	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	Q179K	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10806-11369	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S186R	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10808-11308	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10808-11315	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143R	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10809-11378	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10810-11383	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10811-11386	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10812-11393	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11311	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11320	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143S_S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11352	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10814-11233	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10816-11253	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10816-11265	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10818-11404	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10819-11407	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10820-11413	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10827-11373	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S186R_S188W	Q124E_Q160E_S176A_T178A_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10828-11327	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	Q179K	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10828-11370	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S186R	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10830-11309	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ

表 4A-K1 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10830-11316	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L143R	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10831-11379	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10832-11384	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10833-11387	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10834-11394	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10835-11234	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11254	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11266	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10840-11408	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11328	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	Q179K	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11371	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11310	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11317	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143R	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10851-11380	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10852-11385	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10853-11388	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10854-11395	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11312	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11321	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143S_S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11353	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186K_S188T	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10856-11235	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10857-11243	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R	V133G_S176D_T178D	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11255	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11267	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10860-11406	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10861-11409	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10862-11414	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10869-11390	K145T_V177T_S188E	Y178K	S188K	S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10870-11396	K145T_V177T_S188E	Y178K	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10871-11240	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11256	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11268	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10875-11416	K145T_V177T_S188E	Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10881-11412	L124E_V190D	L135K_Y178F	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10883-11236	L124E_V190D	V133I_L135K	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10888-11415	L124E_V190D	V133I_L135K_Y178F	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10898-11239	L124E_V190E	V133I_L135R_Y178F	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10923-11306	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10924-11376	L143D_K145T	E124Q_T131K	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10926-11391	L143D_K145T	E124Q_T131K	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10927-11290	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10927-11344	L143D_K145T	E124Q_T131K	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11294	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11348	L143D_K145T	E124Q_T131K	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11249	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ

表 4A-K1 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10929-11257	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11261	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11251	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11259	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11263	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10934-11410	L143D_K145T	E124Q_T131K	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11291	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11345	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11295	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11349	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11307	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11314	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10945-11377	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10946-11382	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188R	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ベルツズマブ
10947-11392	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11250	L143D_K145I	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11258	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11262	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11252	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11260	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11264	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
10952-11398	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10953-11411	L143D_K145T	E124Q_T131R	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11296	L143D_K145T	T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11350	L143D_K145T	T131K	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11293	L143D_K145T	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11347	L143D_K145T	T131K_V133S	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11297	L143D_K145T	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11351	L143D_K145T	T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11290	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11344	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10970-11294	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10970-11348	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11291	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11345	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11295	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11349	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10977-11292	L143D_K145T_Q179E	T131K	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10977-11346	L143D_K145T_Q179E	T131K	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11296	L143D_K145T_Q179E	T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11350	L143D_K145T_Q179E	T131K	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11293	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11347	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	S186K	V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11297	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11351	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E	CAT-2200	ベルツズマブ

表 4A-K1 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10983-11306	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ペルツズマブ
10984-11376	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
10985-11381	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
10986-11391	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
10987-11249	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
10987-11257	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
10987-11261	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
10989-11251	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10989-11259	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10989-11263	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10992-11410	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
10998-11307	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143K	Q124E_V133D	CAT-2200	ペルツズマブ
10998-11314	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D	CAT-2200	ペルツズマブ
10999-11377	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
11000-11382	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S131E_V133G_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
11001-11392	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S176E_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11002-11250	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11002-11258	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11002-11262	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11004-11252	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
11004-11260	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
11004-11264	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
11006-11398	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11007-11411	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
11025-11284	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11026-11270	L143K	K129T_V133D	L124W_L143E_K145T_Q179E	Q124K_V133A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11027-11281	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S186I_S188W	Q124R_Q160R_S176A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11028-11275	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188W	Q124R_Q160R_S176A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11029-11282	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11029-11288	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S186I_S188W	Q124R_S176A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11030-11276	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188W	Q124R_S176A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11030-11285	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11032-11199	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11033-11209	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
11033-11215	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ペルツズマブ
11034-11204	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ペルツズマブ
11035-11212	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
11035-11218	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ペルツズマブ
11036-11221	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ペルツズマブ
11039-11224	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_S186E	S131R_V133S_L135K	CAT-2200	ペルツズマブ
11042-11273	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_L143E_K145T	S131R_V133T_L135K_T178S	CAT-2200	ペルツズマブ
11043-11181	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
11044-11191	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ペルツズマブ
11055-11322	S186K_S188T	T131S_V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_S176A_T178S	CAT-2200	ペルツズマブ

表 4A-4: L1 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
11056-11324	S186K_S188T	T131S_V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_T178S	CAT-2200	ベルツズマブ
11061-11273	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11062-11323	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_S176A_T178S	CAT-2200	ベルツズマブ
11063-11325	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_T178S	CAT-2200	ベルツズマブ
11064-11201	S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11065-11206	S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11066-11181	S186K_S188T	V133D_Y178T	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11076-11355	S188A	S176A_Y178W	S186I_S188W	S176A_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11087-11179	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11088-11185	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178I	CAT-2200	ベルツズマブ
11089-11189	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11096-11272	S188K	S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11097-11277	S188K	S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11098-11200	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11099-11210	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11099-11216	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11100-11205	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11101-11213	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11101-11219	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11102-11180	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11103-11186	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178I	CAT-2200	ベルツズマブ
11104-11190	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11105-11195	S188K	S176E_Y178E	L124E	V133A_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11225	S188K	S176E_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133A_S176K_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11229	S188K	S176E_Y178E	L124E_S188W	V133A_S176K_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11107-11197	S188K	S176E_Y178E	L124E	V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11227	S188K	S176E_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11231	S188K	S176E_Y178E	L124E_S188W	V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11124-11202	S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11125-11207	S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11140-11202	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11141-11207	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11142-11182	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11143-11187	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178I	CAT-2200	ベルツズマブ
11144-11192	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11148-11183	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11149-11188	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178I	CAT-2200	ベルツズマブ
11150-11193	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11156-11274	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11157-11279	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11158-11203	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11211	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11217	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11160-11208	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11161-11214	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ

表 4A-K-1 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
11161-11220	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11162-11184	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K	CAT-2200	ベルツズマブ
11163-11194	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
11164-11196	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E	V133A_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11226	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133A_S176K_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11230	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S188W	V133A_S176K_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11166-11198	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E	V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11228	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11232	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E"	L124E_S188W	V133G_S176R_T178A	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５７６】

表 4B - K-K 由来 K-L 設計ライブラリー

表 4B- K-K 由来 K-L 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10629-10695	A139W	T116A	-	L135W	CAT-2200	ペルツズマブ
10631-10722	D146G_Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10632-10724	D146G_Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10640-10713*	L124E	V133G_S176R	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10734	L143E_K145T	E124R	Q179K	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10755	L143E_K145T	E124R	S186R	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10656-10758	L143E_K145T_Q179E	E124K_Y178R	S186R	Q160E_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10657-10760	L143E_K145T_Q179E	E124K_Y178R	S186R	T178E_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10662-10733*	L45F	-	L45P	P44F	CAT-2200	ペルツズマブ
10671-10751	Q39D	Q38R	Q39R	Q38E	CAT-2200	ペルツズマブ
10674-10749*	Q39E	Q38K	Q39K	Q38E	CAT-2200	ペルツズマブ
10676-10750*	Q39E	Q38R	Q39R	Q38D	CAT-2200	ペルツズマブ
10677-10751	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E	CAT-2200	ペルツズマブ
10624-10700*	-	L135W	A139W	F116A	CAT-2200	ペルツズマブ
10625-10701*	-	L135W	A139W	F116A_L135V	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10702	L143E_K145T	E124R	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
10684-10706	S186R	K129T_S180E	K145T_Q179E	S131K	CAT-2200	ペルツズマブ
10689-10707	S186R	S180E	K145T_Q179E	S131K	CAT-2200	ペルツズマブ
10682-10718	S186R	-	L143E_K145T	Q124K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10685-10719	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10658-10720	L143R	-	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10659-10720	L143R	-	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10683-10720	S186R	-	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10664-10722	Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10687-10722	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124R	CAT-2200	ペルツズマブ
10665-10724	Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10688-10724	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10685-10726	S186R	S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10690-10727	S186R	Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
10621-10731*	-	-	L45A	P44F	CAT-2200	ペルツズマブ
10662-10731*	L45F	-	L45A	P44F	CAT-2200	ペルツズマブ
10621-10733*	-	-	L45P	P44F	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10736	-	-	Q39D	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10737	Q39K	Q38D	Q39D	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10738	Q39K	Q38E	Q39D	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10739	-	-	Q39D	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10740*	Q39R	Q38D	Q39D	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10741	Q39R	Q38E	Q39D	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10742	-	-	Q39E	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10743	Q39K	Q38D	Q39E	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10744	Q39K	Q38E	Q39E	Q38K	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10745	-	-	Q39E	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10746	Q39R	Q38D	Q39E	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10747	Q39R	Q38E	Q39E	Q38R	CAT-2200	ペルツズマブ

* カッパ-カッパライブラリー設計に完全に一致した突然変異を有する設計。

【０５７７】

表 5A：性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果								
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10771-11335	0.48	NA	62:38	-0.39	NA	40:60	CAT-2200	ペルツズマブ
10771-11360	0.48	NA	62:38	-0.39	NA	40:60	CAT-2200	ペルツズマブ
10776-11312	-0.19	NA	45:55	1.39	0.1	80:20	CAT-2200	ペルツズマブ
10776-11321	-0.19	NA	45:55	0.54	NA	63:37	CAT-2200	ペルツズマブ
10776-11353	-0.19	NA	45:55	0.85	0.03	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10780-11417	0.03	NA	51:49	0.6	4.25	65:35	CAT-2200	ペルツズマブ
10781-11300	0.74	NA	68:32	-0.16	NA	46:54	CAT-2200	ペルツズマブ
10781-11419	0.74	NA	68:32	-0.34	NA	42:58	CAT-2200	ペルツズマブ
10786-11299	-0.07	NA	48:52	0.49	0.43	62:38	CAT-2200	ペルツズマブ
10786-11418	-0.07	NA	48:52	0.47	NA	62:38	CAT-2200	ペルツズマブ
10787-11301	1.15	0.37	76:24	-0.04	NA	49:51	CAT-2200	ペルツズマブ
10787-11420	1.15	0.37	76:24	-0.26	NA	44:56	CAT-2200	ペルツズマブ
10788-11422	-0.01	NA	50:50	0.41	NA	60:40	CAT-2200	ペルツズマブ
10792-11305	0.04	NA	51:49	0.62	NA	65:35	CAT-2200	ペルツズマブ
10792-11424	0.04	NA	51:49	0.9	NA	71:29	CAT-2200	ペルツズマブ
10793-11375	0.24	0.14	56:44	0.93	0.18	72:28	CAT-2200	ペルツズマブ
10795-11390	1.27	0.55	78:22	1.41	NA	80:20	CAT-2200	ペルツズマブ
10796-11396	0.81	0.2	69:31	2.67	NA	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
10798-11256	2.12	0.81	89:11	0.63	0.12	65:35	CAT-2200	ペルツズマブ
10798-11268	2.12	0.81	89:11	1.21	0.31	77:23	CAT-2200	ペルツズマブ
10800-11416	1.12	0.42	75:25	0.55	NA	63:37	CAT-2200	ペルツズマブ
10806-11326	0.39	0.61	60:40	2.33	0.86	91:9	CAT-2200	ペルツズマブ
10806-11369	0.39	0.61	60:40	3.29	0.39	96:4	CAT-2200	ペルツズマブ
10808-11308	0.59	NA	64:36	1.78	NA	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
10808-11315	0.59	NA	64:36	1.3	0.22	79:21	CAT-2200	ペルツズマブ
10809-11378	1.29	0.73	78:22	1.85	0.12	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
10810-11383	0.8	0.22	69:31	2.77	0.55	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
10811-11386	1.71	0.38	85:15	1.83	NA	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
10812-11393	0.56	0.54	64:36	2.75	0.48	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
10813-11311	0.39	NA	60:40	1.2	NA	77:23	CAT-2200	ペルツズマブ
10813-11320	0.39	NA	60:40	0.58	NA	64:36	CAT-2200	ペルツズマブ
10813-11352	0.39	NA	60:40	0.49	NA	62:38	CAT-2200	ペルツズマブ
10814-11233	1.53	0.78	82:18	1.63	0.4	84:16	CAT-2200	ペルツズマブ
10816-11253	1.95	0.27	88:12	0.75	0.08	68:32	CAT-2200	ペルツズマブ
10816-11265	1.95	0.27	88:12	1.06	0.14	74:26	CAT-2200	ペルツズマブ
10818-11404	1.14	0.77	76:24	2.34	NA	91:9	CAT-2200	ペルツズマブ
10819-11407	0.35	0.46	59:41	2.83	NA	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
10820-11413	1.61	0.48	83:17	2.37	NA	91:9	CAT-2200	ペルツズマブ
10827-11373	-0.02	NA	50:50	2.64	NA	93:7	CAT-2200	ペルツズマブ

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10828-11327	-0.35	0.61	41:59	1.88	0.41	87:13	CAT-2200	ベルツズマブ
10828-11370	-0.35	0.61	41:59	2.07	NA	89:11	CAT-2200	ベルツズマブ
10830-11309	0.31	NA	58:42	2.64	0.73	93:7	CAT-2200	ベルツズマブ
10830-11316	0.31	NA	58:42	1.53	NA	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10831-11379	0.71	0.56	67:33	1.77	NA	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
10832-11384	0.09	0.31	52:48	2.17	0.12	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
10833-11387	1.23	0.01	77:23	1.78	NA	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ
10834-11394	-0.29	0.48	43:57	2.96	NA	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
10835-11234	0.52	NA	63:37	1.06	0.39	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11254	1.5	0.38	82:18	0.67	0.19	66:34	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11266	1.5	0.38	82:18	0.98	0.09	73:27	CAT-2200	ベルツズマブ
10840-11408	-0.38	0.47	41:59	2.79	NA	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11328	-0.02	0.67	50:50	3.21	0.9	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11371	-0.02	0.67	50:50	3.46	0.75	97:3	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11310	0.74	0.17	68:32	1.95	0.04	88:12	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11317	0.74	0.17	68:32	1.84	0.12	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ
10851-11380	0.95	0.27	72:28	2.09	0.61	89:11	CAT-2200	ベルツズマブ
10852-11385	0.24	0.67	56:44	2.35	0.38	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
10853-11388	0.79	1	69:31	2.16	NA	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
10854-11395	0.1	0.15	52:48	2.87	NA	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11312	0.62	0.2	65:35	1.39	0.1	80:20	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11321	0.62	0.2	65:35	0.54	NA	63:37	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11353	0.62	0.2	65:35	0.85	0.03	70:30	CAT-2200	ベルツズマブ
10856-11235	1.24	0.26	78:22	1.75	0.78	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
10857-11243	0.43	NA	61:39	0.43	0.31	61:39	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11255	1.13	1.23	76:24	0.79	0.16	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11267	1.13	1.23	76:24	1.17	0.07	76:24	CAT-2200	ベルツズマブ
10860-11406	0.81	0.63	69:31	2.58	NA	93:7	CAT-2200	ベルツズマブ
10861-11409	0.18	0.16	54:46	2.63	NA	93:7	CAT-2200	ベルツズマブ
10862-11414	0.45	1.18	61:39	2.38	NA	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
10869-11390	1.07	0.67	74:26	1.41	NA	80:20	CAT-2200	ベルツズマブ
10870-11396	0.75	0.36	68:32	2.67	NA	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
10871-11240	0.87	NA	70:30	1.68	0.56	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11256	1.32	0.02	79:21	0.63	0.12	65:35	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11268	1.32	0.02	79:21	1.21	0.31	77:23	CAT-2200	ベルツズマブ
10875-11416	1.04	0.63	74:26	0.55	NA	63:37	CAT-2200	ベルツズマブ
10881-11412	0.39	NA	60:40	1.64	NA	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
10883-11236	-0.25	0.64	44:56	1.8	1.06	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ
10888-11415	0.27	0.28	57:43	1.83	0.08	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ
10898-11239	-0.14	0.52	47:53	1.56	0.38	83:17	CAT-2200	ベルツズマブ
10923-11306	1.11	0.12	75:25	2.48	0.22	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
10924-11376	0.51	0.14	62:38	1.5	0.39	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10926-11391	0.21	0.45	55:45	2.71	0.33	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10927-11290	0.72	0.39	67:33	0.36	NA	59:41	CAT-2200	ベルツズマブ
10927-11344	0.72	0.39	67:33	0.22	NA	55:45	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11294	1.23	0.36	77:23	0.81	NA	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11348	1.23	0.36	77:23	0.41	NA	60:40	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11249	1.46	0.91	81:19	0.77	0.24	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11257	1.46	0.91	81:19	1.12	0.28	75:25	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11261	1.46	0.91	81:19	1.04	0.26	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11251	1.17	0.41	76:24	0.95	NA	72:28	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11259	1.17	0.41	76:24	1.47	NA	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11263	1.17	0.41	76:24	1.5	0.7	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10934-11410	1.23	0.34	77:23	2.15	NA	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11291	0.83	0.77	70:30	1.18	NA	76:24	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11345	0.83	0.77	70:30	0.82	NA	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11295	1.02	0.85	73:27	1.6	NA	83:17	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11349	1.02	0.85	73:27	1.27	0.16	78:22	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11307	1.02	NA	73:27	2.3	0.17	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11314	1.02	NA	73:27	3.06	0.45	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
10945-11377	0.97	0.39	73:27	2.22	0.65	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
10946-11382	0.53	0.18	63:37	1.67	NA	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
10947-11392	0.59	0.66	64:36	2.75	0.27	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11250	1.4	0.35	80:20	0.69	NA	67:33	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11258	1.4	0.35	80:20	1.22	NA	77:23	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11262	1.4	0.35	80:20	1.18	0.44	76:24	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11252	1.92	0.07	87:13	0.97	0.3	73:27	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11260	1.92	0.07	87:13	1.32	NA	79:21	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11264	1.92	0.07	87:13	1.47	0.18	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
10952-11398	1.08	1.48	75:25	2.33	NA	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
10953-11411	1.03	1.32	74:26	2.3	0.11	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11296	0.65	0.18	66:34	0.76	NA	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11350	0.65	0.18	66:34	0.22	NA	55:45	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11293	0.39	0.1	60:40	0.92	NA	72:28	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11347	0.39	0.1	60:40	0.77	NA	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11297	0.34	0.57	58:42	1.5	NA	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11351	0.34	0.57	58:42	1.05	NA	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11290	0.82	0.77	69:31	0.36	NA	59:41	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11344	0.82	0.77	69:31	0.22	NA	55:45	CAT-2200	ベルツズマブ
10970-11294	1.19	0.39	77:23	0.81	NA	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
10970-11348	1.19	0.39	77:23	0.41	NA	60:40	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11291	1.3	0.16	79:21	1.18	NA	76:24	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11345	1.3	0.16	79:21	0.82	NA	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11295	1.39	0.29	80:20	1.6	NA	83:17	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11349	1.39	0.29	80:20	1.27	0.16	78:22	CAT-2200	ベルツズマブ
10977-11292	0.59	0.16	64:36	0.26	NA	56:44	CAT-2200	ベルツズマブ

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10977-11346	0.59	0.16	64:36	0.02	NA	50:50	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11296	0.76	0.24	68:32	0.76	NA	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11350	0.76	0.24	68:32	0.22	NA	55:45	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11293	0.41	0.06	60:40	0.92	NA	72:28	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11347	0.41	0.06	60:40	0.77	NA	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11297	0.58	0.1	64:36	1.5	NA	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11351	0.58	0.1	64:36	1.05	NA	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
10983-11306	1.21	0.36	77:23	2.48	0.22	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
10984-11376	0.65	0.2	66:34	1.5	0.39	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10985-11381	-0.04	0.01	49:51	1.7	NA	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
10986-11391	0.46	0.44	61:39	2.71	0.33	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11249	3.04	1.13	95:5	0.77	0.24	68:32	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11257	3.04	1.13	95:5	1.12	0.28	75:25	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11261	3.04	1.13	95:5	1.04	0.26	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11251	2.73	0.64	94:6	0.95	NA	72:28	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11259	2.73	0.64	94:6	1.47	NA	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11263	2.73	0.64	94:6	1.5	0.7	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
10992-11410	1.64	0.16	84:16	2.15	NA	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
10998-11307	1.24	0.55	78:22	2.3	0.17	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
10998-11314	1.24	0.55	78:22	3.06	0.45	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
10999-11377	0.8	0.41	69:31	2.22	0.65	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
11000-11382	0.28	0.03	57:43	1.67	NA	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11001-11392	0.77	0.13	68:32	2.75	0.27	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11250	2.87	1.15	95:5	0.69	NA	67:33	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11258	2.87	1.15	95:5	1.22	NA	77:23	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11262	2.87	1.15	95:5	1.18	0.44	76:24	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11252	2.38	0.52	92:8	0.97	0.3	73:27	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11260	2.38	0.52	92:8	1.32	NA	79:21	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11264	2.38	0.52	92:8	1.47	0.18	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
11006-11398	1.7	0.54	85:15	2.33	NA	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
11007-11411	1.65	0.61	84:16	2.3	0.11	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
11025-11284	1.38	0.88	80:20	3.02	0.11	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11026-11270	1.8	1.64	86:14	2.51	0.42	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11027-11281	1.13	0.17	76:24	1.42	1.88	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
11027-11287	1.13	0.17	76:24	1.71	1.6	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11028-11275	1.55	0.72	82:18	3.15	0.91	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
11029-11282	1.21	NA	77:23	2.8	NA	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
11029-11288	1.21	NA	77:23	2.83	NA	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
11030-11276	1.38	0.39	80:20	2.63	0.26	93:7	CAT-2200	ベルツズマブ
11030-11285	1.38	0.39	80:20	3	0.73	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11032-11199	1.72	0.2	85:15	2.38	0.61	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11033-11209	1.72	1.34	85:15	1.69	NA	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11033-11215	1.72	1.34	85:15	2.31	0.42	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
11034-11204	1.43	0.25	81:19	3.12	0.61	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
11035-11212	1.81	0.46	86:14	2.04	0.12	88:12	CAT-2200	ベルツズマブ
11035-11218	1.81	0.46	86:14	3.12	0.48	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
11036-11221	1.35	0.18	79:21	1.38	0.52	80:20	CAT-2200	ベルツズマブ
11039-11224	0.9	0.46	71:29	0.62	0.2	65:35	CAT-2200	ベルツズマブ
11042-11273	0.83	1.03	70:30	1.75	0.25	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11043-11181	1.09	0.21	75:25	1.68	0.67	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11044-11191	0.93	0.18	72:28	1.5	0.61	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
11055-11322	-0.34	0.5	42:58	1.51	0.2	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
11056-11324	0.42	NA	60:40	0.84	NA	70:30	CAT-2200	ベルツズマブ
11061-11273	1.23	0.45	77:23	1.75	0.25	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11062-11323	0.54	NA	63:37	0.15	NA	54:46	CAT-2200	ベルツズマブ
11063-11325	0.83	NA	70:30	-0.25	NA	44:56	CAT-2200	ベルツズマブ
11064-11201	1.64	0.68	84:16	2.18	0.61	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
11065-11206	1.84	0.08	86:14	2.72	0.33	94:6	CAT-2200	ベルツズマブ
11066-11181	0.91	0.15	71:29	1.68	0.67	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11076-11355	-0.4	NA	40:60	0.7	NA	67:33	CAT-2200	ベルツズマブ
11087-11179	1.98	0.49	88:12	1.83	NA	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ
11088-11185	1.63	0.48	84:16	2.29	0.29	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
11089-11189	1.77	0.2	85:15	1.64	NA	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11096-11272	1.75	0.63	85:15	2.62	0.05	93:7	CAT-2200	ベルツズマブ
11097-11277	1.87	0.16	87:13	2.22	NA	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
11098-11200	2.65	0.47	93:7	2.21	0.1	90:10	CAT-2200	ベルツズマブ
11099-11210	2.31	0.64	91:9	0.9	NA	71:29	CAT-2200	ベルツズマブ
11099-11216	2.31	0.64	91:9	1.77	0.35	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11100-11205	2.58	0.19	93:7	2.51	0.72	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11101-11213	2.44	0.37	92:8	1.24	NA	78:22	CAT-2200	ベルツズマブ
11101-11219	2.44	0.37	92:8	2.13	0.34	89:11	CAT-2200	ベルツズマブ
11102-11180	2.21	0.22	90:10	1.95	0.23	88:12	CAT-2200	ベルツズマブ
11103-11186	2.04	0.32	88:12	1.52	0.1	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
11104-11190	2.37	0.11	91:9	1.9	NA	87:13	CAT-2200	ベルツズマブ
11105-11195	1.93	NA	87:13	-0.15	0.29	46:54	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11225	1.83	NA	86:14	0.65	NA	66:34	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11229	1.83	NA	86:14	0.18	0.06	54:46	CAT-2200	ベルツズマブ
11107-11197	1.92	0.25	87:13	0.25	0.18	56:44	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11227	2.4	NA	92:8	0.94	NA	72:28	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11231	2.4	NA	92:8	0.15	0.33	54:46	CAT-2200	ベルツズマブ
11124-11202	2.1	0.67	89:11	2.94	1.29	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11125-11207	2.13	0.27	89:11	2.85	1.01	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11140-11202	2.29	0.32	91:9	2.94	1.29	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11141-11207	2.1	NA	89:11	2.85	1.01	95:5	CAT-2200	ベルツズマブ
11142-11182	1.93	0.21	87:13	2.4	0.71	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11143-11187	1.4	0.57	80:20	2.11	0.33	89:11	CAT-2200	ベルツズマブ

表 5A 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
11144-11192	1.96	0.32	88:12	2.3	0.38	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
11148-11183	2.25	0.2	90:10	1.93	1.9	87:13	CAT-2200	ベルツズマブ
11149-11188	1.99	0.29	88:12	1.59	0.29	83:17	CAT-2200	ベルツズマブ
11150-11193	2.13	0.7	89:11	1.59	0.3	83:17	CAT-2200	ベルツズマブ
11156-11274	0.42	0.77	60:40	3.21	0.22	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
11157-11279	0.38	0.09	59:41	3.16	0.59	96:4	CAT-2200	ベルツズマブ
11158-11203	2.02	NA	88:12	2.41	0.13	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11211	2.02	0.05	88:12	0.82	NA	69:31	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11217	2.02	0.05	88:12	1.98	0.27	88:12	CAT-2200	ベルツズマブ
11160-11208	2.02	NA	88:12	2.42	0.22	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11161-11214	2.08	0.26	89:11	1.55	NA	82:18	CAT-2200	ベルツズマブ
11161-11220	2.08	0.26	89:11	2.4	0.71	92:8	CAT-2200	ベルツズマブ
11162-11184	1.13	0.65	76:24	1.09	NA	75:25	CAT-2200	ベルツズマブ
11163-11194	1.16	0.09	76:24	1.75	NA	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11164-11196	0.93	0.3	72:28	1.69	0.58	84:16	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11226	0.92	NA	72:28	1.03	NA	74:26	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11230	0.92	NA	72:28	1.71	0.18	85:15	CAT-2200	ベルツズマブ
11166-11198	0.66	0.17	66:34	2.32	0.85	91:9	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11228	0.85	NA	70:30	1.19	NA	77:23	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11232	0.85	NA	70:30	1.84	0.11	86:14	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５７８】

表 5B：性能カットオフ基準を通過した K-K 由来 K-L 設計の LCCA 結果

表 5B：性能カットオフ基準を通過した K-K 由来 K-L 設計の LCCA 結果								
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10621-10731	0.49	0.43	62:38	0.37	0.09	59:41	CAT-2200	ペルツズマブ
10621-10733	0.49	0.43	62:38	0.72	3.76	67:33	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10736	0.69	NA	67:33	-0.11	NA	47:53	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10742	0.69	NA	67:33	-0.11	NA	47:53	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10739	1.06	NA	74:26	-0.03	NA	49:51	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10745	1.06	NA	74:26	-0.08	NA	48:52	CAT-2200	ペルツズマブ
10624-10700	-0.25	NA	44:56	0.57	NA	64:36	CAT-2200	ペルツズマブ
10625-10701	0.59	0.07	64:36	-0.04	0.18	49:51	CAT-2200	ペルツズマブ
10629-10695	0.76	NA	68:32	-0.36	NA	41:59	CAT-2200	ペルツズマブ
10631-10722	1.1	0.23	75:25	0.87	1.04	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10632-10724	2.16	0.67	90:10	0.61	0.27	65:35	CAT-2200	ペルツズマブ
10640-10713	0.08	0.48	52:48	1.51	0.81	82:18	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10702	-0.11	0.41	47:53	3.29	1.58	96:4	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10734	-0.11	0.41	47:53	2.67	0.39	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10755	-0.11	0.41	47:53	1.42	NA	81:19	CAT-2200	ペルツズマブ
10656-10758	-0.13	0.61	47:53	2.54	0.65	93:7	CAT-2200	ペルツズマブ
10657-10760	0.53	0.46	63:37	2.85	1.28	95:5	CAT-2200	ペルツズマブ
10658-10720	0.07	NA	52:48	0.83	0.66	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10659-10720	0.28	0.12	57:43	0.83	0.66	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10662-10731	0.63	0.31	65:35	0.37	0.09	59:41	CAT-2200	ペルツズマブ
10662-10733	0.63	0.31	65:35	0.72	3.76	67:33	CAT-2200	ペルツズマブ
10664-10722	0.94	0.05	72:28	0.87	1.04	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10665-10724	2.32	0.27	91:9	0.61	0.27	65:35	CAT-2200	ペルツズマブ
10671-10751	0.56	NA	64:36	0.15	0.32	54:46	CAT-2200	ペルツズマブ
10674-10749	1.13	0.18	76:24	0.18	0.21	54:46	CAT-2200	ペルツズマブ
10676-10750	0.81	0.23	69:31	0.23	0.19	56:44	CAT-2200	ペルツズマブ
10677-10751	0.78	0.39	69:31	0.15	0.32	54:46	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10737	0.91	0.37	71:29	1.09	0.39	75:25	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10743	0.91	0.37	71:29	1.09	0.91	75:25	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10738	0.61	0.08	65:35	1.35	NA	79:21	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10744	0.61	0.08	65:35	1.29	0.69	78:22	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10740	1.23	0.47	77:23	1.19	0.37	77:23	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10746	1.23	0.47	77:23	1.02	0.38	73:27	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10741	0.92	0.26	72:28	2.47	1.3	92:8	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10747	0.92	0.26	72:28	1.19	0.73	77:23	CAT-2200	ペルツズマブ
10682-10718	2.12	0.77	89:11	0.55	0.61	63:37	CAT-2200	ペルツズマブ
10683-10720	0.82	0.33	69:31	0.83	0.66	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
10684-10706	1.94	0.25	87:13	0.53	0.26	63:37	CAT-2200	ペルツズマブ
10685-10719	2.07	0.27	89:11	1.01	0.14	73:27	CAT-2200	ペルツズマブ
10685-10726	2.07	0.27	89:11	1.46	0.39	81:19	CAT-2200	ペルツズマブ
10687-10722	1.04	0.63	74:26	0.87	1.04	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ

表 5B：性能カットオフ基準を通過した K-K 由来 K-L 設計の LCCA 結果

固有識別子	H1L1：H1L2 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の正規化された中央スカラー値 ln（r1/f1）	正規化されたスカラー値 ln（r1/f1）の H2L2：H2L1 範囲	H2L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10688-10724	2.24	0.66	90:10	0.61	0.27	65:35	CAT-2200	ベルツズマブ
10689-10707	1.13	0.38	76:24	0.53	0.74	63:37	CAT-2200	ベルツズマブ
10690-10727	2.1	0.46	89:11	1.42	0.09	81:19	CAT-2200	ベルツズマブ
10621-10731	0.49	0.43	62:38	0.37	0.09	59:41	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５７９】

表 6A：LCCA 性能カットオフ基準を通過した K–L 設計の抗原結合及び熱安定性評価

表 6A – K-L 設計														
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab (nM) の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10771-11335	0.27	0.00	ND	ND	77.0	0.0	ND	ND	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10771-11360	0.27	0.00	ND	ND	77.0	0.0	ND	ND	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11312	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11321	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10776-11353	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10780-11417	0.22	0.09	ND	ND	76.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10781-11300	0.22	0.09	ND	ND	76.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10781-11419	0.22	0.09	7.76	0.02	76.5	-0.5	80.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10786-11299	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10786-11418	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10787-11301	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10787-11420	0.23	0.08	7.76	0.02	75.7	-1.3	80.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10788-11422	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10792-11305	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10792-11424	0.23	0.08	ND	ND	75.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10793-11375	0.23	0.08	8.13	0.00	75.7	-1.3	80.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10795-11390	0.34	-0.10	7.92	0.01	74.0	-3.0	80.7	-1.3	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10796-11396	0.34	-0.10	8.15	0.00	74.0	-3.0	82.5	0.5	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-11256	0.34	-0.10	7.78	0.02	74.0	-3.0	81.5	-0.5	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-11268	0.34	-0.10	8.25	-0.01	74.0	-3.0	81.5	-0.5	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10800-11416	0.34	-0.10	8.26	-0.01	74.0	-3.0	78.0	-4.0	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10806-11326	0.27	0.00	7.65	0.02	69.7	-7.3	83.2	1.3	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10806-11369	0.27	0.00	6.98	0.06	69.7	-7.3	81.7	-0.3	65.5	-5.2	78.4	-0.3	CAT-2200	ベルツズマブ
10808-11308	0.27	0.00	7.41	0.04	69.7	-7.3	81.0	-1.0	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10808-11315	0.27	0.00	7.91	0.01	69.7	-7.3	80.3	-1.7	65.5	-5.2	77.1	-1.6	CAT-2200	ベルツズマブ
10809-11378	0.27	0.00	8.46	-0.02	69.7	-7.3	80.2	-1.8	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10810-11383	0.27	0.00	8.31	-0.01	69.7	-7.3	78.8	-3.2	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10811-11386	0.27	0.00	7.92	0.01	69.7	-7.3	80.7	-1.3	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10812-11393	0.27	0.00	8.15	0.00	69.7	-7.3	82.5	0.5	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11311	0.27	0.00	ND	ND	69.7	-7.3	ND	ND	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11320	0.27	0.00	ND	ND	69.7	-7.3	ND	ND	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10813-11352	0.27	0.00	ND	ND	69.7	-7.3	ND	ND	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10814-11233	0.27	0.00	8.28	-0.01	69.7	-7.3	80.8	-1.1	65.5	-5.2	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10816-11253	0.27	0.00	7.78	0.02	69.7	-7.3	81.5	-0.5	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10816-11265	0.27	0.00	8.25	-0.01	69.7	-7.3	81.5	-0.5	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10818-11404	0.27	0.00	ND	ND	69.7	-7.3	ND	ND	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10819-11407	0.27	0.00	ND	ND	69.7	-7.3	ND	ND	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10820-11413	0.27	0.00	8.26	-0.01	69.7	-7.3	78.0	-4.0	65.5	-5.2	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10827-11373	0.25	0.04	7.57	0.03	60.0	-17.0	82.2	0.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ

表 6A－K-L 続き

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10828-11327	0.25	0.04	7.65	0.02	60.0	-17.0	83.2	1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10828-11370	0.25	0.04	6.98	0.06	60.0	-17.0	81.7	-0.3	ND	ND	78.4	-0.3	CAT-2200	ベルツズマブ
10830-11309	0.25	0.04	7.41	0.04	60.0	-17.0	81.0	-1.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10830-11316	0.25	0.04	7.91	0.01	60.0	-17.0	80.3	-1.7	ND	ND	77.1	-1.6	CAT-2200	ベルツズマブ
10831-11379	0.25	0.04	8.46	-0.02	60.0	-17.0	80.2	-1.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10832-11384	0.25	0.04	8.31	-0.01	60.0	-17.0	78.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10833-11387	0.25	0.04	7.92	0.01	60.0	-17.0	80.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10834-11394	0.25	0.04	8.15	0.00	60.0	-17.0	82.5	0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10835-11234	0.25	0.04	8.28	-0.01	60.0	-17.0	80.8	-1.1	ND	ND	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11254	0.25	0.04	7.78	0.02	60.0	-17.0	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10837-11266	0.25	0.04	8.25	-0.01	60.0	-17.0	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10840-11408	0.25	0.04	ND	ND	60.0	-17.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11328	0.27	0.01	7.65	0.02	67.7	-9.3	83.2	1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10848-11371	0.27	0.01	6.98	0.06	67.7	-9.3	81.7	-0.3	ND	ND	78.4	-0.3	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11310	0.27	0.01	7.41	0.04	67.7	-9.3	81.0	-1.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10850-11317	0.27	0.01	7.91	0.01	67.7	-9.3	80.3	-1.7	ND	ND	77.1	-1.6	CAT-2200	ベルツズマブ
10851-11380	0.27	0.01	8.46	-0.02	67.7	-9.3	80.2	-1.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10852-11385	0.27	0.01	8.31	-0.01	67.7	-9.3	78.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10853-11388	0.27	0.01	7.92	0.01	67.7	-9.3	80.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10854-11395	0.27	0.01	8.15	0.00	67.7	-9.3	82.5	0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11312	0.27	0.01	ND	ND	67.7	-9.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11321	0.27	0.01	ND	ND	67.7	-9.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10855-11353	0.27	0.01	ND	ND	67.7	-9.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10856-11235	0.27	0.01	8.28	-0.01	67.7	-9.3	80.8	-1.1	ND	ND	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10857-11243	0.27	0.01	10.65	-0.12	67.7	-9.3	78.8	-3.2	ND	ND	75.5	-3.2	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11255	0.27	0.01	7.78	0.02	67.7	-9.3	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10858-11267	0.27	0.01	8.25	-0.01	67.7	-9.3	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10860-11406	0.27	0.01	ND	ND	67.7	-9.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10861-11409	0.27	0.01	ND	ND	67.7	-9.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10862-11414	0.27	0.01	8.26	-0.01	67.7	-9.3	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10869-11390	0.21	0.11	7.92	0.01	73.7	-3.3	80.7	-1.3	68.9	-1.8	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10870-11396	0.21	0.11	8.15	0.00	73.7	-3.3	82.5	0.5	68.9	-1.8	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10871-11240	0.21	0.11	8.28	-0.01	73.7	-3.3	80.8	-1.1	68.9	-1.8	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11256	0.21	0.11	7.78	0.02	73.7	-3.3	81.5	-0.5	68.9	-1.8	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10873-11268	0.21	0.11	8.25	-0.01	73.7	-3.3	81.5	-0.5	68.9	-1.8	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10875-11416	0.21	0.11	8.26	-0.01	73.7	-3.3	78.0	-4.0	68.9	-1.8	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10881-11412	NB	-3.56	8.26	-0.01	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10883-11236	NB	-3.56	8.28	-0.01	ND	ND	80.8	-1.1	ND	ND	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10888-11415	NB	-3.56	8.26	-0.01	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10898-11239	ND	ND	8.28	-0.01	ND	ND	80.8	-1.1	ND	ND	78.2	-0.5	CAT-2200	ベルツズマブ

表 6A－K-L 続き

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10923-11306	0.22	0.10	7.41	0.04	74.0	-3.0	81.0	-1.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10924-11376	0.22	0.10	8.46	-0.02	74.0	-3.0	80.2	-1.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10926-11391	0.22	0.10	8.15	0.00	74.0	-3.0	82.5	0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10927-11290	0.22	0.10	ND	ND	74.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10927-11344	0.22	0.10	8.01	0.00	74.0	-3.0	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11294	0.22	0.10	7.13	0.05	74.0	-3.0	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10928-11348	0.22	0.10	ND	ND	74.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11249	0.22	0.10	8.64	-0.03	74.0	-3.0	80.0	-2.0	ND	ND	76.6	-2.1	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11257	0.22	0.10	8.53	-0.02	74.0	-3.0	80.0	-2.0	ND	ND	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
10929-11261	0.22	0.10	ND	ND	74.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11251	0.22	0.10	7.78	0.02	74.0	-3.0	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11259	0.22	0.10	ND	ND	74.0	-3.0	79.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10931-11263	0.22	0.10	8.25	-0.01	74.0	-3.0	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10934-11410	0.22	0.10	8.26	-0.01	74.0	-3.0	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11291	0.33	-0.08	ND	ND	74.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10942-11345	0.33	-0.08	8.01	0.00	74.0	-3.0	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11295	0.33	-0.08	7.13	0.05	74.0	-3.0	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10943-11349	0.33	-0.08	ND	ND	74.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11307	0.35	-0.10	7.41	0.04	74.2	-2.8	81.0	-1.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10944-11314	0.35	-0.10	7.91	0.01	74.2	-2.8	80.3	-1.7	ND	ND	77.1	-1.6	CAT-2200	ベルツズマブ
10945-11377	0.35	-0.10	8.46	-0.02	74.2	-2.8	80.2	-1.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10946-11382	0.35	-0.10	8.31	-0.01	74.2	-2.8	78.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10947-11392	0.35	-0.10	8.15	0.00	74.2	-2.8	82.5	0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11250	0.35	-0.10	8.64	-0.03	74.2	-2.8	80.0	-2.0	ND	ND	76.6	-2.1	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11258	0.35	-0.10	8.53	-0.02	74.2	-2.8	80.0	-2.0	ND	ND	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
10948-11262	0.35	-0.10	ND	ND	74.2	-2.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11252	0.35	-0.10	7.78	0.02	74.2	-2.8	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11260	0.35	-0.10	ND	ND	74.2	-2.8	79.0	-3.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10950-11264	0.35	-0.10	8.25	-0.01	74.2	-2.8	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10952-11398	0.35	-0.10	9.02	-0.05	74.2	-2.8	80.2	-1.8	ND	ND	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
10953-11411	0.35	-0.10	8.26	-0.01	74.2	-2.8	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11296	ND	ND	7.13	0.05	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10962-11350	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11293	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10965-11347	ND	ND	8.01	0.00	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11297	ND	ND	7.13	0.05	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10966-11351	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11290	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10969-11344	ND	ND	8.01	0.00	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10970-11294	ND	ND	7.13	0.05	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ

表 6A－K-1 続き

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10970-11348	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11291	0.30	-0.04	ND	ND	73.2	-3.8	ND	ND	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10973-11345	0.30	-0.04	8.01	0.00	73.2	-3.8	78.0	-4.0	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11295	0.30	-0.04	7.13	0.05	73.2	-3.8	78.0	-4.0	69.7	-1.0	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10974-11349	0.30	-0.04	ND	ND	73.2	-3.8	ND	ND	69.7	-1.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10977-11292	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10977-11346	ND	ND	8.01	0.00	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11296	ND	ND	7.13	0.05	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10978-11350	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11293	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10981-11347	ND	ND	8.01	0.00	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11297	ND	ND	7.13	0.05	ND	ND	78.0	-4.0	ND	ND	74.9	-3.8	CAT-2200	ベルツズマブ
10982-11351	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10983-11306	0.32	-0.06	7.41	0.04	73.0	-4.0	81.0	-1.0	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10984-11376	0.32	-0.06	8.46	-0.02	73.0	-4.0	80.2	-1.8	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10985-11381	0.32	-0.06	8.31	-0.01	73.0	-4.0	78.8	-3.2	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10986-11391	0.32	-0.06	8.15	0.00	73.0	-4.0	82.5	0.5	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11249	0.32	-0.06	8.64	-0.03	73.0	-4.0	80.0	-2.0	68.3	-2.4	76.6	-2.1	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11257	0.32	-0.06	8.53	-0.02	73.0	-4.0	80.0	-2.0	68.3	-2.4	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
10987-11261	0.32	-0.06	ND	ND	73.0	-4.0	ND	ND	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11251	0.32	-0.06	7.78	0.02	73.0	-4.0	81.5	-0.5	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11259	0.32	-0.06	ND	ND	73.0	-4.0	79.0	-3.0	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10989-11263	0.32	-0.06	8.25	-0.01	73.0	-4.0	81.5	-0.5	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10992-11410	0.32	-0.06	8.26	-0.01	73.0	-4.0	78.0	-4.0	68.3	-2.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10998-11307	0.29	-0.03	7.41	0.04	73.0	-4.0	81.0	-1.0	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10998-11314	0.29	-0.03	7.91	0.01	73.0	-4.0	80.3	-1.7	69.1	-1.6	77.1	-1.6	CAT-2200	ベルツズマブ
10999-11377	0.29	-0.03	8.46	-0.02	73.0	-4.0	80.2	-1.8	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11000-11382	0.29	-0.03	8.31	-0.01	73.0	-4.0	78.8	-3.2	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11001-11392	0.29	-0.03	8.15	0.00	73.0	-4.0	82.5	0.5	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11250	0.29	-0.03	8.64	-0.03	73.0	-4.0	80.0	-2.0	69.1	-1.6	76.6	-2.1	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11258	0.29	-0.03	8.53	-0.02	73.0	-4.0	80.0	-2.0	69.1	-1.6	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
11002-11262	0.29	-0.03	ND	ND	73.0	-4.0	ND	ND	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11252	0.29	-0.03	7.78	0.02	73.0	-4.0	81.5	-0.5	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11260	0.29	-0.03	ND	ND	73.0	-4.0	79.0	-3.0	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11004-11264	0.29	-0.03	8.25	-0.01	73.0	-4.0	81.5	-0.5	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11006-11398	0.29	-0.03	9.02	-0.05	73.0	-4.0	80.2	-1.8	69.1	-1.6	76.8	-1.9	CAT-2200	ベルツズマブ
11007-11411	0.29	-0.03	8.26	-0.01	73.0	-4.0	78.0	-4.0	69.1	-1.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11025-11284	0.26	0.03	7.38	0.04	73.8	-3.2	81.2	-0.8	ND	ND	77.6	-1.1	CAT-2200	ベルツズマブ
11026-11270	0.26	0.03	7.30	0.04	73.8	-3.2	79.5	-2.5	ND	ND	76.0	-2.7	CAT-2200	ベルツズマブ
11027-11281	0.26	0.03	ND	ND	73.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ

表 6A－K-L 設計

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15	
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab	
11027-11287	0.26	0.03	5.81	0.14	73.8	-3.2	81.8	-0.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11028-11275	0.26	0.03	7.57	0.03	73.8	-3.2	80.8	-1.2	ND	ND	77.4	-1.3	CAT-2200	ベルツズマブ	
11029-11282	0.26	0.03	ND	ND	73.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11029-11288	0.26	0.03	7.71	0.02	73.8	-3.2	81.0	-1.0	ND	ND	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11030-11276	0.26	0.03	7.00	0.06	73.8	-3.2	81.3	-0.7	ND	ND	77.9	-0.8	CAT-2200	ベルツズマブ	
11030-11285	0.26	0.03	7.44	0.03	73.8	-3.2	81.5	-0.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11032-11199	0.26	0.03	8.09	0.00	73.8	-3.2	80.0	-2.0	ND	ND	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11033-11209	0.26	0.03	ND	ND	73.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11033-11215	0.26	0.03	7.98	0.00	73.8	-3.2	75.5	-6.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11034-11204	0.26	0.03	8.11	0.00	73.8	-3.2	80.8	-1.2	ND	ND	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11035-11212	0.26	0.03	ND	ND	73.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11035-11218	0.26	0.03	8.06	0.00	73.8	-3.2	77.0	-5.0	ND	ND	74.3	-4.4	CAT-2200	ベルツズマブ	
11036-11221	0.26	0.03	7.72	0.02	73.8	-3.2	75.5	-6.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11039-11224	0.26	0.03	ND	ND	73.8	-3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11042-11273	0.18	0.19	7.19	0.05	72.7	-4.3	81.2	-0.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11043-11181	0.18	0.19	7.30	0.04	72.7	-4.3	75.8	-6.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11044-11191	0.18	0.19	ND	ND	72.7	-4.3	76.0	-6.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11055-11322	0.12	0.02	ND	ND	71.8	-4.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11056-11324	0.12	0.02	ND	ND	71.8	-4.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11061-11273	0.28	-0.02	7.19	0.05	72.3	-4.7	81.2	-0.8	68.6	-2.1	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11062-11323	0.28	-0.02	ND	ND	72.3	-4.7	ND	ND	68.6	-2.1	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11063-11325	0.28	-0.02	ND	ND	72.3	-4.7	ND	ND	68.6	-2.1	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11064-11201	0.28	-0.02	8.09	0.00	72.3	-4.7	80.0	-2.0	68.6	-2.1	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11065-11206	0.28	-0.02	8.11	0.00	72.3	-4.7	80.8	-1.2	68.6	-2.1	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11066-11181	0.28	-0.02	7.30	0.04	72.3	-4.7	75.8	-6.2	68.6	-2.1	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11076-11355	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11087-11179	0.37	-0.13	7.30	0.04	72.2	-4.8	75.8	-6.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11088-11185	0.37	-0.13	7.40	0.04	72.2	-4.8	67.7	-14.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11089-11189	0.37	-0.13	ND	ND	72.2	-4.8	76.0	-6.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11096-11272	0.36	-0.12	7.19	0.05	72.7	-4.3	81.2	-0.8	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11097-11277	0.36	-0.12	7.00	0.06	72.7	-4.3	81.3	-0.7	68.8	-1.9	77.9	-0.8	CAT-2200	ベルツズマブ	
11098-11200	0.36	-0.12	8.09	0.00	72.7	-4.3	80.0	-2.0	68.8	-1.9	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11099-11210	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	ND	ND	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11099-11216	0.36	-0.12	7.98	0.00	72.7	-4.3	75.5	-6.5	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11100-11205	0.36	-0.12	8.11	0.00	72.7	-4.3	80.8	-1.2	68.8	-1.9	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ	
11101-11213	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	ND	ND	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11101-11219	0.36	-0.12	8.06	0.00	72.7	-4.3	77.0	-5.0	68.8	-1.9	74.3	-4.4	CAT-2200	ベルツズマブ	
11102-11180	0.36	-0.12	7.30	0.04	72.7	-4.3	75.8	-6.2	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11103-11186	0.36	-0.12	7.40	0.04	72.7	-4.3	67.7	-14.3	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	
11104-11190	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	76.0	-6.0	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ	

表 6A－K-L 設計

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab (nM) の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
11105-11195	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	ND	ND	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11225	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	ND	ND	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11106-11229	0.36	-0.12	7.71	0.02	72.7	-4.3	77.5	-4.5	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11107-11197	0.36	-0.12	8.22	-0.01	72.7	-4.3	80.7	-1.3	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11227	0.36	-0.12	ND	ND	72.7	-4.3	ND	ND	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11108-11231	0.36	-0.12	7.80	0.01	72.7	-4.3	77.2	-4.8	68.8	-1.9	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11124-11202	0.24	0.06	8.09	0.00	71.8	-5.2	80.0	-2.0	ND	ND	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11125-11207	0.24	0.06	8.11	0.00	71.8	-5.2	80.8	-1.2	ND	ND	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11140-11202	0.23	0.08	8.09	0.00	71.8	-5.2	80.0	-2.0	68.1	-2.6	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11141-11207	0.23	0.08	8.11	0.00	71.8	-5.2	80.8	-1.2	68.1	-2.6	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11142-11182	0.23	0.08	7.30	0.04	71.8	-5.2	75.8	-6.2	68.1	-2.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11143-11187	0.23	0.08	7.40	0.04	71.8	-5.2	67.7	-14.3	68.1	-2.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11144-11192	0.23	0.08	ND	ND	71.8	-5.2	76.0	-6.0	68.1	-2.6	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11148-11183	0.34	-0.09	7.30	0.04	71.0	-6.0	75.8	-6.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11149-11188	0.34	-0.09	7.40	0.04	71.0	-6.0	67.7	-14.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11150-11193	0.34	-0.09	ND	ND	71.0	-6.0	76.0	-6.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11156-11274	0.22	0.08	7.19	0.05	71.3	-5.8	81.2	-0.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11157-11279	0.22	0.08	7.00	0.06	71.3	-5.8	81.3	-0.7	ND	ND	77.9	-0.8	CAT-2200	ベルツズマブ
11158-11203	0.22	0.08	8.09	0.00	71.3	-5.8	80.0	-2.0	ND	ND	76.5	-2.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11211	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11159-11217	0.22	0.08	7.98	0.00	71.3	-5.8	75.5	-6.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11160-11208	0.22	0.08	8.11	0.00	71.3	-5.8	80.8	-1.2	ND	ND	77.5	-1.2	CAT-2200	ベルツズマブ
11161-11214	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11161-11220	0.22	0.08	8.06	0.00	71.3	-5.8	77.0	-5.0	ND	ND	74.3	-4.4	CAT-2200	ベルツズマブ
11162-11184	0.22	0.08	7.30	0.04	71.3	-5.8	75.8	-6.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11163-11194	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	76.0	-6.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11164-11196	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11226	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11165-11230	0.22	0.08	7.71	0.02	71.3	-5.8	77.5	-4.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11166-11198	0.22	0.08	8.22	-0.01	71.3	-5.8	80.7	-1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11228	0.22	0.08	ND	ND	71.3	-5.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
11167-11232	0.22	0.08	7.80	0.01	71.3	-5.8	77.2	-4.8	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５８０】

表 6B：LCCA 性能カットオフ基準を通過した K-K 由来 K-L 設計の抗原結合及び熱安定性評価

表 6B - - K-K 由来 K-L 設計														
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab heterodimer の KD（nM）	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10621-10731	0.27	0.00	6.75	0.08	77.0	0.0	80.5	-1.5	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10621-10733	0.27	0.00	5.72	0.15	77.0	0.0	83.8	1.8	70.7	0.0	79.4	0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10736	0.27	0.00	ND	ND	77.0	0.0	ND	ND	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10622-10742	0.27	0.00	ND	ND	77.0	0.0	ND	ND	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10739	0.27	0.00	6.39	0.10	77.0	0.0	81.3	-0.7	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10623-10745	0.27	0.00	8.08	0.00	77.0	0.0	82.5	0.5	70.7	0.0	78.3	-0.4	CAT-2200	ペルツズマブ
10624-10700	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10625-10701	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10629-10695	ND	ND	ND	ND	ND	ND	79.8	-2.2	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10631-10722	0.19	0.15	ND	ND	73.7	-3.3	ND	ND	ND	ND	78.0	-0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10632-10724	0.19	0.15	NB	-2.09	73.7	-3.3	74.0	-7.9	ND	ND	77.8	-0.9	CAT-2200	ペルツズマブ
10640-10713	0.23	0.08	8.28	-0.01	73.3	-3.7	80.8	-1.1	69.1	-1.6	78.2	-0.5	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10702	0.28	-0.01	7.78	0.02	73.0	-4.0	81.3	-0.7	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10734	0.28	-0.01	7.65	0.02	73.0	-4.0	83.2	1.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10652-10755	0.28	-0.01	6.98	0.06	73.0	-4.0	81.7	-0.3	ND	ND	78.4	-0.3	CAT-2200	ペルツズマブ
10656-10758	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10657-10760	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10658-10720	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	78.0	-0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10659-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	78.0	-0.7	CAT-2200	ペルツズマブ

表 6B－K-K 由来 (-L 設計

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab heterodimer の KD (nM)	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10720														
10662-10731	0.29	-0.02	6.75	0.08	75.0	-2.0	80.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10662-10733	0.29	-0.02	5.72	0.15	75.0	-2.0	83.8	1.8	ND	ND	79.4	0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10664-10722	0.29	-0.03	ND	ND	77.3	0.3	ND	ND	70.7	0.0	78.0	-0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10665-10724	0.29	-0.03	NB	-2.09	77.3	0.3	74.0	-7.9	70.7	0.0	77.8	-0.9	CAT-2200	ペルツズマブ
10671-10751	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10674-10749	0.21	0.12	6.09	0.12	74.5	-2.5	81.0	-1.0	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10676-10750	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10677-10751	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10737	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10678-10743	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10738	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10679-10744	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10740	0.39	-0.16	6.39	0.10	72.0	-5.0	81.3	-0.7	74.2	3.5	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10680-10746	0.39	-0.16	8.08	0.00	72.0	-5.0	82.5	0.5	74.2	3.5	78.3	-0.4	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10741	0.35	-0.11	6.39	0.10	71.5	-5.5	81.3	-0.7	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10681-10747	0.35	-0.11	8.08	0.00	71.5	-5.5	82.5	0.5	ND	ND	78.3	-0.4	CAT-2200	ペルツズマブ
10682-10718	ND	ND	7.43	0.04	ND	ND	81.7	-0.3	ND	ND	ND	ND	CAT-2200	ペルツズマブ
10683-10720	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	78.0	-0.7	CAT-2200	ペルツズマブ
10684-10706	0.26	0.03	7.28	0.04	75.2	-1.8	81.5	-0.5	69.6	-1.1	77.2	-1.5	CAT-2200	ペルツズマブ

表 6B－K-K 由来 K-L 設計

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13	列 14	列 15
固有識別子	H1L1 Fab heterodimer の KD (nM)	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H1L1 Fab	H2L2 Fab
10685-10719	0.22	0.09	7.43	0.04	75.0	-2.0	81.7	-0.3	70.3	-0.4	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ
10685-10726	0.22	0.09	7.24	0.05	75.0	-2.0	80.3	-1.7	70.3	-0.4	77.4	-1.3	CAT-2200	ベルツズマブ
10687-10722	0.22	0.09	ND	ND	75.0	-2.0	ND	ND	70.3	-0.4	78.0	-0.7	CAT-2200	ベルツズマブ
10688-10724	0.22	0.09	NB	-2.09	75.0	-2.0	74.0	-7.9	70.3	-0.4	77.8	-0.9	CAT-2200	ベルツズマブ
10689-10707	0.22	0.09	7.28	0.04	75.0	-2.0	81.5	-0.5	70.3	-0.4	77.2	-1.5	CAT-2200	ベルツズマブ
10690-10727	0.24	0.05	7.24	0.05	73.5	-3.5	80.3	-1.7	ND	ND	77.4	-1.3	CAT-2200	ベルツズマブ
10621-10731	0.27	0.00	6.75	0.08	77.0	0.0	80.5	-1.5	70.7	0.0	ND	ND	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５８１】

表 7A：第２の K-L 設計ライブラリー

表 7A：第２の K-L 設計ライブラリー						
固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
12944-13093	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12958-13064	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12958-13106	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12958-13469	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12961-13108	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12961-13471	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13200-13421	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13202-13426	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13203-13427	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13248-13475	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13309-13443	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13322-13425	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_T129K_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13204-13351	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_S131K	CAT-2200	ベルツズマブ
13205-13353	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_T129K_S131K	CAT-2200	ベルツズマブ
13196-13351	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_S131K	CAT-2200	ベルツズマブ
13197-13353	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_T129K_S131K	CAT-2200	ベルツズマブ
13250-13355	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	K145T_Q179E_S188F_V190F	S131K_L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
13277-13420	L143A_S186R	K129T_V133W_S180E	L124W_L143E_K145T	Q124K_V133A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13319-13473	S186R	K129T_S176A_Y178W_S180E	L143E_K145T_S188W	Q124K_S176A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13188-13421	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13190-13422	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13242-13475	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13192-13426	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13194-13427	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13317-13423	Q179K_V190K	K129T_V133D_L135S_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13188-13430	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13200-13430	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13246-13463	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124K_L135A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ

表 7A：第２の K-L 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13238-13463	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124K_L135A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13248-13465	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13242-13465	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13246-13459	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188F_V190F	Q124K_L135A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13238-13459	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188F_V190F	Q124K_L135A_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13192-13452	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13194-13456	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13202-13452	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13203-13456	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13254-13508	K145T_S188E	Y178K	S186R_S188K	Q124E_Q160E_S176D_T178D	CAT-2200	ベルツズマブ
13255-13509	K145T_S188E	Y178K	S186R_S188K	Q124E_Q160E_S176D_T178D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13262-13481	K145T_S188E	Y178K	L143K_S188K	Q124E_V133D_S176E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13261-13480	K145T_S188E	Y178K	L143K_S188K	Q124E_V133D_S176E_T178E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13258-13504	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13256-13502	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T178D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13257-13503	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T178E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13269-13403	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13268-13401	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T178E_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
12878-11240	K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-13036	K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13265-13392	K145T_S188E	Y178K	L124K_S188K	Q124E_V133G_S176D_T178D	CAT-2200	ベルツズマブ
13265-13419	K145T_S188E	Y178K	L124R_S188K	Q124E_V133G_S176D_T178D	CAT-2200	ベルツズマブ
13212-13396	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13211-13395	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_L135W_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
13168-13397	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	L124R_K228D	S121K_V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
13296-13399	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
13297-13402	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13264-13400	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D	CAT-2200	ベルツズマブ
13332-13360	S188K	K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E	S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13328-13359	S188K	K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E	S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ

表 7A：第２の K-L 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13335-13361	S188K	K129T_Y178D	K145T_S186E	S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13337-13362	S188K	K129T_Y178E	K145T_S186E	S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13237-13358	A139W_S188K	K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E	S131K_L135W_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13235-13357	A139W_S188K	K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E	S131K_L135W_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13209-13364	A125R_S188K	S122D_K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E_K228D	S121K_S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13207-13363	A125R_S188K	S122D_K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E_K228D	S121K_S131K_S176K	CAT-2200	ベルツズマブ
13210-13510	A139W_K145T_S188E	Y178K	S188K	L135W_S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13167-13514	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	S188K_K228D	S121K_S176E_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13294-13492	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13292-13489	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13263-13493	K145T_S188E	Y178K	L143R_S188K	Q124E_V133D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13259-13491	K145T_S188E	Y178K	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E	CAT-2200	ベルツズマブ
13212-13415	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13169-13418	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13331-13447	S188K	K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13327-13446	S188K	K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13334-13449	S188K	K129T_Y178D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13336-13450	S188K	K129T_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13236-13433	A139W_S188K	K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13234-13432	A139W_S188K	K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13208-13455	A125R_S188K	S122D_K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13206-13454	A125R_S188K	S122D_K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13333-13387	S188K	K129T_S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13295-13484	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_T180D	CAT-2200	ベルツズマブ
13282-13484	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_T180D	CAT-2200	ベルツズマブ
13218-13482	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_L135W	CAT-2200	ベルツズマブ
13219-13483	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_L135W_T180D	CAT-2200	ベルツズマブ
13175-13486	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L143R_K228D	S121K_Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13176-13487	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L143R_K228D	S121K_Q124E_V133D_T180D	CAT-2200	ベルツズマブ
13280-13488	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178D	CAT-2200	ベルツズマブ

表 7A：第２の κL 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13281-13489	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
13291-13488	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178D	CAT-2200	ペルツズマブ
13287-13494	L143D_K145T_F174G	T116F_E124Q_T131R_S176F	L143R_V190F	Q124E_V133D_L135A	CAT-2200	ペルツズマブ
13214-13405	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13221-13406	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13214-13410	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13221-13411	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_L135W_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13285-13414	L143D_K145T_F174G	T116F_E124Q_T131K_S176F	L124R_S186K_V190F	V133G_L135A_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13171-13416	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13178-13417	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ペルツズマブ
13220-13511	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_L135W_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
13177-13513	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	S188K_K228D	S121K_S131D_V133G_T178F	CAT-2200	ペルツズマブ
13288-13516	L143E_K145T_F174G_Q179E	T116F_E124Q_T131R_S176F	S188K_V190F	V133I_L135A_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
13223-13512	A139W_L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	V133I_L135W_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
13180-13515	A125R_L143E_K145T_Q179E	S122D_E124Q_T131R	S188K_K228D	S121K_V133I_S176D_T178E	CAT-2200	ペルツズマブ
13298-13439	L143K	K129T_T131D_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13300-13441	L143K	K129T_T131E_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13271-13439	L124K_L143K	K129T_T131D_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13273-13441	L124K_L143K	K129T_T131E_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13299-13379	L143K	K129T_T131D_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13301-13381	L143K	K129T_T131E_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13272-13379	L124K_L143K	K129T_T131D_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13274-13381	L124K_L143K	K129T_T131E_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13305-13448	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13304-13466	L143K_F174G	T116F_K129T_V133D_S176F	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124R_L135A_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13226-13434	A139W_L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13182-13458	A125R_L143K	S122D_K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ
13227-13383	A139W_L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13184-13388	A125R_L143K	S122D_K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ペルツズマブ
13229-13428	A139W_S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ペルツズマブ

表 7A：第 2 の Kd 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13224-13428	A139W_L143I_S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13231-13386	A139W_S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13199-13391	A125R_S186K_S188T	S122D_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13230-13384	A139W_S186K	K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13198-13389	A125R_S186K	S122D_K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13225-13384	A139W_L143I_S186K	K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13181-13389	A125R_L143I_S186K	S122D_K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13306-13375	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L124E_K145T	S131K_L135K	CAT-2200	ベルツズマブ
13306-13373	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L124E_A139I_K145T_V190I	S131K_L135K	CAT-2200	ベルツズマブ
13185-13374	A125R_L143K_V190K	S122D_K129T_V133D_L135S	L124E_A139I_K145T_V190I_K228D	S121K_S131K_L135K	CAT-2200	ベルツズマブ
13283-13507	L143D_K145T_F174G	E124Q_T131K_V133S_S176F	S186K_V190F	Q124E_V133D_L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
13216-13505	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	Q124E_V133D_L135W	CAT-2200	ベルツズマブ
13173-13506	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K_V133S	S186K_K228D	S121K_Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13283-13478	L143D_K145T_F174G	E124Q_T131K_V133S_S176F	L143I_S186K_V190F	Q124E_V133D_L135A	CAT-2200	ベルツズマブ
13216-13476	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	Q124E_V133D_L135W	CAT-2200	ベルツズマブ
13173-13477	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K_K228D	S121K_Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13329-13366	S188K	K129T_S176E_Y178E	L45P_L124E_K145T_Q179E	P44F_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13252-13369	K145T_S188E	Y178K	L45P_L124R_Q179K	P44F_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13289-13368	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L45P_L124R_Q179K	P44F_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13338-13371	S188K	S176E_Y178E	L45P_L143E_K145T_Q179E	P44F_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13278-13372	L143D_K145T	E124Q_T131R	L45P_L143R	P44F_Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13320-13370	S186R	K129T_S180E	L45P_L143E_K145T_Q179E	P44F_Q124K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13302-13367	L143K	K129T_V133D	L45P_L124E_K145T_Q179E	P44F_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13330-13495	S188K	K129T_S176E_Y178E	Q39E_L124E_K145T_Q179E	Q38R_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ
13253-13498	K145T_S188E	Y178K	Q39E_L124R_Q179K	Q38R_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13290-13497	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	Q39E_L124R_Q179K	Q38R_V133G_S176D_T180E	CAT-2200	ベルツズマブ
13339-13500	S188K	S176E_Y178E	Q39E_L143E_K145T_Q179E	Q38R_Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13279-13501	L143D_K145T	E124Q_T131R	Q39E_L143R	Q38R_Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13321-13499	S186R	K129T_S180E	Q39E_L143E_K145T_Q179E	Q38R_Q124K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13303-13496	L143K	K129T_V133D	Q39E_L124E_K145T_Q179E	Q38R_S131R_V133G_S176R	CAT-2200	ベルツズマブ

表 7A：第 2 の K-L 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
12957-13061	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12906-13152	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	Q124E_V133D	CAT-2200	ベルツズマブ
13318-13437	S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５８２】

表 7B - 第２の K-K 由来 K-L 設計ライブラリー

表 7B - 第２の K-K 由来 K-L 設計ライブラリー

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）	H1L1 Fab	H2L2 Fab
12938-13064	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13309-13425	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_T129K_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13314-13424	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12938-13469	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12944-13471	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13275-13470	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13276-13472	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13308-13340	Q179K	K129T_S180E	F122C_L143E_K145T	Q124C_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12961-13093	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12958-13079	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12938-13079	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13323-13444	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13310-13444	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13322-13443	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13316-13451	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13314-13438	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12938-13106	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
12944-13108	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13275-13461	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13276-13462	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ
13308-13341	Q179K	K129T_S180E	F122C_L143E_K145T_Q179E	Q124C_Q160K_T178R	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５８３】

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果								
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
12944-13093	1.41	1.04	79：21	1.39	0.27	80：20	CAT-2200	ペルツズマブ
12958-13064	1.29	1.13	77：23	0.86	NA	70：30	CAT-2200	ペルツズマブ
12958-13106	1.29	1.13	77：23	3.06	0.1	95：5	CAT-2200	ペルツズマブ
12958-13469	1.29	1.13	77：23	1.83	0.02	86：14	CAT-2200	ペルツズマブ
12961-13108	2	NA	88：12	1.82	NA	86：14	CAT-2200	ペルツズマブ
12961-13471	2	NA	88：12	1.16	NA	76：24	CAT-2200	ペルツズマブ
13200-13421	-2.46	NA	7：93	-0.26	0.35	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13202-13426	-2.18	NA	10：90	-0.24	NA	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13203-13427	-2.68	NA	6：94	2.19	4.71	72：28	CAT-2200	ペルツズマブ
13248-13475	1.72	NA	84：16	-0.23	NA	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13309-13443	0.98	NA	72：28	1.35	NA	79：21	CAT-2200	ペルツズマブ
13322-13425	1.1	0.72	74：26	-0.13	0.03	47：53	CAT-2200	ペルツズマブ
13204-13351	1.71	0.98	84：16	-0.1	0.21	48：52	CAT-2200	ペルツズマブ
13205-13353	2.28	NA	90：10	0.07	NA	51：49	CAT-2200	ペルツズマブ
13196-13351	1	NA	73：27	-0.1	0.21	48：52	CAT-2200	ペルツズマブ
13197-13353	0.37	NA	59：41	0.07	NA	51：49	CAT-2200	ペルツズマブ
13250-13355	1.38	0.6	79：21	-0.45	NA	39：61	CAT-2200	ペルツズマブ
13277-13420	1.08	0.17	75：25	0.73	0.12	67：33	CAT-2200	ペルツズマブ
13319-13473	-0.88	0.71	30：70	0.43	0.43	60：40	CAT-2200	ペルツズマブ
13188-13421	1.6	0.53	83：17	-0.26	0.35	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13190-13422	1.5	NA	81：19	-0.32	NA	42：58	CAT-2200	ペルツズマブ
13242-13475	1.48	NA	81：19	-0.23	NA	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13192-13426	1.96	NA	87：13	-0.24	NA	44：56	CAT-2200	ペルツズマブ
13194-13427	1.22	0.18	77：23	2.19	4.71	72：28	CAT-2200	ペルツズマブ

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２のK-L 設計ライブラリーからのK-L 設計のLCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13317-13423	-1.42	NA	19：81	3.09	1.62	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13188-13430	1.6	0.53	83：17	0.77	0.25	68：32	CAT-2200	ベルツズマブ
13200-13430	-2.46	NA	7：93	0.77	0.25	68：32	CAT-2200	ベルツズマブ
13246-13463	1.98	0.9	87：13	-0.51	0.09	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13238-13463	2.26	0.73	90：10	-0.51	0.09	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13248-13465	1.72	NA	84：16	-0.29	NA	42：58	CAT-2200	ベルツズマブ
13242-13465	1.48	NA	81：19	-0.29	NA	42：58	CAT-2200	ベルツズマブ
13246-13459	1.98	0.9	87：13	-0.51	NA	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13238-13459	2.26	0.73	90：10	-0.51	NA	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13192-13452	1.96	NA	87：13	1.15	NA	75：25	CAT-2200	ベルツズマブ
13194-13456	1.22	0.18	77：23	0.72	0.02	67：33	CAT-2200	ベルツズマブ
13202-13452	-2.18	NA	10：90	1.15	NA	75：25	CAT-2200	ベルツズマブ
13203-13456	-2.68	NA	6：94	0.72	0.02	67：33	CAT-2200	ベルツズマブ
13254-13508	1.68	0.94	83：17	0.8	0.08	69：31	CAT-2200	ベルツズマブ
13255-13509	1.67	NA	84：16	0	NA	49：51	CAT-2200	ベルツズマブ
13262-13481	2.41	0.41	91：9	1.01	0.15	73：27	CAT-2200	ベルツズマブ
13261-13480	1.91	NA	87：13	0.61	NA	64：36	CAT-2200	ベルツズマブ
13258-13504	-0.25	NA	43：57	2.76	NA	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13256-13502	0.53	NA	62：38	2.01	NA	88：12	CAT-2200	ベルツズマブ
13257-13503	0.85	0.63	70：30	2.48	0.41	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13269-13403	2.58	1.35	92：8	0.35	0.23	58：42	CAT-2200	ベルツズマブ
13268-13401	2.25	NA	90：10	0.07	NA	51：49	CAT-2200	ベルツズマブ
12878-11240	1.85	0.37	86：14	2.2	0.04	90：10	CAT-2200	ベルツズマブ
10798-13036	2.29	0.65	90：10	2.34	NA	91：9	CAT-2200	ベルツズマブ
13265-13392	2.97	0.72	95：5	-0.29	NA	42：58	CAT-2200	ベルツズマブ
13265-13419	2.97	0.72	95：5	0.54	0.12	63：37	CAT-2200	ベルツズマブ

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13212-13396	3	0.15	95：5	0.29	0.2	57：43	CAT-2200	ベルツズマブ
13211-13395	2.12	NA	89：11	0.55	NA	63：37	CAT-2200	ベルツズマブ
13168-13397	3.03	0.12	95：5	1.97	5.15	67：33	CAT-2200	ベルツズマブ
13296-13399	1.05	0.04	74：26	0.55	0.45	63：37	CAT-2200	ベルツズマブ
13297-13402	1.21	NA	77：23	0.25	NA	56：44	CAT-2200	ベルツズマブ
13264-13400	1.14	NA	75：25	0.45	NA	61：39	CAT-2200	ベルツズマブ
13332-13360	1.69	0.38	84：16	2.25	0.47	90：10	CAT-2200	ベルツズマブ
13328-13359	2.12	NA	89：11	0.9	NA	71：29	CAT-2200	ベルツズマブ
13335-13361	2.01	NA	88：12	1.58	NA	82：18	CAT-2200	ベルツズマブ
13337-13362	2.14	NA	89：11	0.53	NA	63：37	CAT-2200	ベルツズマブ
13237-13358	2.33	0.56	91：9	0.59	0.22	64：36	CAT-2200	ベルツズマブ
13235-13357	1.96	NA	87：13	-0.33	NA	41：59	CAT-2200	ベルツズマブ
13209-13364	2.54	0.19	92：8	1.21	0.05	77：23	CAT-2200	ベルツズマブ
13207-13363	2.09	NA	89：11	0.33	NA	58：42	CAT-2200	ベルツズマブ
13210-13510	1.5	0.14	81：19	2.55	0.51	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13167-13514	2.61	NA	93：7	2.83	1.01	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13294-13492	1.48	0.67	81：19	1.45	0.28	81：19	CAT-2200	ベルツズマブ
13292-13489	1.18	0.48	76：24	1.21	0.25	77：23	CAT-2200	ベルツズマブ
13263-13493	2	0.48	88：12	1.31	0.59	78：22	CAT-2200	ベルツズマブ
13259-13491	2.34	NA	91：9	-0.02	NA	49：51	CAT-2200	ベルツズマブ
13212-13415	3	0.15	95：5	0.23	0.29	56：44	CAT-2200	ベルツズマブ
13169-13418	3.25	0.6	96：4	1.83	4.92	66：34	CAT-2200	ベルツズマブ
13331-13447	0.49	NA	61：39	3.52	NA	97：3	CAT-2200	ベルツズマブ
13327-13446	0.7	NA	66：34	3.01	NA	95：5	CAT-2200	ベルツズマブ
13334-13449	0.46	NA	61：39	2.74	NA	93：7	CAT-2200	ベルツズマブ
13336-13450	0.81	0.4	69：31	3.1	0.75	95：5	CAT-2200	ベルツズマブ

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13236-13433	2.45	1.02	91：9	2.64	NA	93：7	CAT-2200	ベルツズマブ
13234-13432	2	NA	88：12	2.54	NA	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13208-13455	1.54	0.48	82：18	3.5	1.89	95：5	CAT-2200	ベルツズマブ
13206-13454	1.2	NA	76：24	2.56	NA	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13333-13387	1.64	0.38	83：17	4.11	1.06	98：2	CAT-2200	ベルツズマブ
13295-13484	1.44	NA	80：20	1.72	0.08	85：15	CAT-2200	ベルツズマブ
13282-13484	1.68	0.37	84：16	1.72	0.08	85：15	CAT-2200	ベルツズマブ
13218-13482	1.92	0.12	87：13	2.13	0.09	89：11	CAT-2200	ベルツズマブ
13219-13483	2.2	NA	89：11	0.87	NA	70：30	CAT-2200	ベルツズマブ
13175-13486	3.12	2.77	91：9	1.08	0.22	74：26	CAT-2200	ベルツズマブ
13176-13487	2.73	NA	93：7	-0.2	NA	44：56	CAT-2200	ベルツズマブ
13280-13488	0.49	NA	62：38	0.02	NA	50：50	CAT-2200	ベルツズマブ
13281-13489	0.25	NA	56：44	1.21	0.25	77：23	CAT-2200	ベルツズマブ
13291-13488	1.41	NA	80：20	0.02	NA	50：50	CAT-2200	ベルツズマブ
13287-13494	1.73	0.28	85：15	1.25	0.13	77：23	CAT-2200	ベルツズマブ
13214-13405	2.08	NA	88：12	-0.52	NA	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13221-13406	2.38	0.29	91：9	-0.41	0.26	40：60	CAT-2200	ベルツズマブ
13214-13410	2.08	NA	88：12	0	NA	49：51	CAT-2200	ベルツズマブ
13221-13411	2.38	0.29	91：9	0	0	50：50	CAT-2200	ベルツズマブ
13285-13414	1.63	0.18	83：17	-0.44	0.1	39：61	CAT-2200	ベルツズマブ
13171-13416	3.11	NA	95：5	-0.52	NA	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13178-13417	2.74	1.26	93：7	-0.49	0.1	38：62	CAT-2200	ベルツズマブ
13220-13511	1.56	1.08	81：19	1.72	0.22	85：15	CAT-2200	ベルツズマブ
13177-13513	1.58	0.73	82：18	-0.08	0.07	47：53	CAT-2200	ベルツズマブ
13288-13516	1.41	0.68	80：20	0.88	0.26	70：30	CAT-2200	ベルツズマブ
13223-13512	0.95	1.17	70：30	2.03	0.22	88：12	CAT-2200	ベルツズマブ

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13180-13515	1.56	0.75	82：18	1.74	0.42	85：15	CAT-2200	ベルツズマブ
13298-13439	-1.21	NA	23：77	2.79	NA	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13300-13441	-0.72	NA	32：68	2.58	0	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13271-13439	-0.6	NA	35：65	2.79	NA	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13273-13441	-0.31	0.18	42：58	2.58	0	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13299-13379	-0.53	NA	37：63	3.26	NA	96：4	CAT-2200	ベルツズマブ
13301-13381	-0.28	0.2	43：57	3.71	0.93	97：3	CAT-2200	ベルツズマブ
13272-13379	-0.51	NA	37：63	3.26	NA	96：4	CAT-2200	ベルツズマブ
13274-13381	-0.57	NA	36：64	3.71	0.93	97：3	CAT-2200	ベルツズマブ
13305-13448	-1.5	0.06	18：82	3.63	1.65	96：4	CAT-2200	ベルツズマブ
13304-13466	0.63	0.22	65：35	0.99	0.24	73：27	CAT-2200	ベルツズマブ
13226-13434	1.82	0.08	86：14	2.68	0.36	93：7	CAT-2200	ベルツズマブ
13182-13458	1.53	0.76	81：19	1.1	2.96	66：34	CAT-2200	ベルツズマブ
13227-13383	2.47	1.62	90：10	2.31	0.51	90：10	CAT-2200	ベルツズマブ
13184-13388	1.4	0.79	79：21	3.08	0.13	95：5	CAT-2200	ベルツズマブ
13229-13428	1.44	1.12	79：21	2.02	0.28	88：12	CAT-2200	ベルツズマブ
13224-13428	1.48	NA	81：19	2.02	0.28	88：12	CAT-2200	ベルツズマブ
13231-13386	2.02	0.97	87：13	1.7	0.42	84：16	CAT-2200	ベルツズマブ
13199-13391	2.04	NA	88：12	1.9	NA	86：14	CAT-2200	ベルツズマブ
13230-13384	1.63	NA	83：17	1.71	NA	84：16	CAT-2200	ベルツズマブ
13198-13389	1.16	0.33	75：25	2.42	0.43	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13225-13384	0.87	NA	70：30	1.71	NA	84：16	CAT-2200	ベルツズマブ
13181-13389	1.75	NA	85：15	2.42	0.43	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13306-13375	-1.45	0.02	19：81	0.85	0.33	70：30	CAT-2200	ベルツズマブ
13306-13373	-1.45	0.02	19：81	0.48	NA	61：39	CAT-2200	ベルツズマブ
13185-13374	-1.11	0.12	24：76	0.25	NA	56：44	CAT-2200	ベルツズマブ

表 8A：性能カットオフ基準を通過した第２の K-L 設計ライブラリーからの K-L 設計の LCCA 結果

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 の正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
13283-13507	1.09	0.31	74：26	-0.45	0.26	39：61	CAT-2200	ベルツズマブ
13216-13505	1.39	1.28	78：22	0.96	0.05	72：28	CAT-2200	ベルツズマブ
13173-13506	1.33	0.47	78：22	-0.5	0.02	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13283-13478	1.09	0.31	74：26	-0.49	NA	37：63	CAT-2200	ベルツズマブ
13216-13476	1.39	1.28	78：22	1.69	NA	84：16	CAT-2200	ベルツズマブ
13173-13477	1.33	0.47	78：22	-0.18	NA	45：55	CAT-2200	ベルツズマブ
13329-13366	1.54	0.47	82：18	3.9	0.89	97：3	CAT-2200	ベルツズマブ
13252-13369	2.39	0.94	91：9	1.45	0.42	81：19	CAT-2200	ベルツズマブ
13289-13368	1.6	0.48	83：17	1.84	0.15	86：14	CAT-2200	ベルツズマブ
13338-13371	1.05	0.91	73：27	3.81	0.37	98：2	CAT-2200	ベルツズマブ
13278-13372	0.66	0.18	65：35	3.71	0.33	97：3	CAT-2200	ベルツズマブ
13320-13370	1.6	1.11	82：18	2.43	0.35	92：8	CAT-2200	ベルツズマブ
13302-13367	0.69	0.01	66：34	4.3	0.94	98：2	CAT-2200	ベルツズマブ
13330-13495	1.8	0.22	86：14	2.65	0.21	93：7	CAT-2200	ベルツズマブ
13253-13498	1.6	0.57	82：18	1.2	0.06	77：23	CAT-2200	ベルツズマブ
13290-13497	1.58	0.34	83：17	1.36	0.06	80：20	CAT-2200	ベルツズマブ
13339-13500	1.01	0.73	72：28	2.77	0.05	94：6	CAT-2200	ベルツズマブ
13279-13501	0.79	0.12	69：31	3.24	0.61	96：4	CAT-2200	ベルツズマブ
13321-13499	1.84	0.5	85：15	2.37	0.38	91：9	CAT-2200	ベルツズマブ
13303-13496	0.83	NA	69：31	3	NA	95：5	CAT-2200	ベルツズマブ
12957-13061	1.73	0.84	84：16	0.4	0.26	59：41	CAT-2200	ベルツズマブ
12906-13152	0.54	0.45	63：37	1.89	0.22	87：13	CAT-2200	ベルツズマブ
13318-13437	0.06	0.18	51：49	3.31	1.11	96：4	CAT-2200	ベルツズマブ

【０５８４】

表 8B：性能カットオフ基準を通過した第２の K-K 由来 K-L 設計ライブラリーからの K-K 由来 K-L 設計の LCCA 結果

表 8B：性能カットオフ基準を通過した第２の K-K 由来 K-L 設計ライブラリーからの K-K 由来 K-L 設計の LCCA 結果								
列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9
固有識別子	H1L1：H1L2 の中央スカラー値	スカラー値の H1L1：H1L2 範囲	H1L1：H1L2 の正規化された中央値の比	H2L2：H2L1 の中央スカラー値	スカラー値の H2L2：H2L1 範囲	H1L2：H2L1 正規化された中央値の比	H1L1 Fab	H2L2 Fab
12938-13064	1.96	0.19	87:13	0.86	NA	70:30	CAT-2200	ペルツズマブ
13309-13425	0.98	NA	72:28	-0.13	0.03	47:53	CAT-2200	ペルツズマブ
13314-13424	0.89	0.3	70:30	2.02	1.32	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
12938-13469	1.96	0.19	87:13	1.83	0.02	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
12944-13471	1.41	1.04	79:21	1.16	NA	76:24	CAT-2200	ペルツズマブ
13275-13470	1.51	1.16	80:20	1.94	NA	87:13	CAT-2200	ペルツズマブ
13276-13472	0.88	0.11	70:30	2.16	0.12	90:10	CAT-2200	ペルツズマブ
13308-13340	0.98	0.32	72:28	2.34	0.8	90:10	CAT-2200	ペルツズマブ
12961-13093	2	NA	88:12	1.39	0.27	80:20	CAT-2200	ペルツズマブ
12958-13079	1.29	1.13	77:23	1.87	NA	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
12938-13079	1.96	0.19	87:13	1.87	NA	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
13323-13444	1.31	NA	78:22	1.29	NA	78:22	CAT-2200	ペルツズマブ
13310-13444	1.37	NA	79:21	1.29	NA	78:22	CAT-2200	ペルツズマブ
13322-13443	1.1	0.72	74:26	1.35	NA	79:21	CAT-2200	ペルツズマブ
13316-13451	1.22	0.26	77:23	3.71	1.94	96:4	CAT-2200	ペルツズマブ
13314-13438	0.89	0.3	70:30	2.81	NA	94:6	CAT-2200	ペルツズマブ
12938-13106	1.96	0.19	87:13	3.06	0.1	95:5	CAT-2200	ペルツズマブ
12944-13108	1.41	1.04	79:21	1.82	NA	86:14	CAT-2200	ペルツズマブ
13275-13461	1.51	1.16	80:20	2.23	0.45	90:10	CAT-2200	ペルツズマブ
13276-13462	0.88	0.11	70:30	2.29	NA	90:10	CAT-2200	ペルツズマブ
13308-13341	0.98	0.32	72:28	2.04	0.71	88:12	CAT-2200	ペルツズマブ

【０５８５】

表 9A – LCCA 性能カットオフ基準を通過した K-L 設計の抗原結合及び熱安定性評価

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13
固有識別子	H1L1 Fab (nM) の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化
10798-13036	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
11240-12878	0.34	-0.22	7.9	-0.0068	74	-3	80.8	-0.9	69.7	-1	78.2	0.1
12906-13152	0.33	-0.19	7	0.044	74	-3	78.5	-3.2	ND	ND	ND	ND
12944-13093	0.24	-0.056	7	0.046	78	1	81.3	-0.4	#70.7	0	77.9	-0.2
12957-13061	0.26	-0.088	7.4	0.02	75.2	-1.8	81.7	0	69.6	-1.1	ND	ND
12958-13064	0.26	-0.088	7.9	-0.007	75.2	-1.8	81.3	-0.4	69.6	-1.1	77.8	-0.3
12958-13106	0.26	-0.088	6.9	0.051	75.2	-1.8	81	-0.7	69.6	-1.1	78.2	0.1
12958-13469	0.26	-0.088	7.7	0.0027	75.2	-1.8	80	-1.7	69.6	-1.1	77.2	-0.9
12961-13108	0.26	-0.088	7.4	0.02	75.2	-1.8	81.5	-0.2	69.6	-1.1	ND	ND
12961-13471	0.26	-0.088	8	-0.012	75.2	-1.8	81.3	-0.4	69.6	-1.1	77.9	-0.2
13167-13514*	0.19	0.037	8.3	-0.029	74.5	-2.5	80	-1.7	70	-0.7	77.2	-0.9
13168-13397‡	0.19	0.037	7.8	4.80E-04	74.5	-2.5	76.8	-4.9	70	-0.7	ND	ND
13169-13418*	0.19	0.037	7.6	0.0089	74.5	-2.5	78.3	-3.4	70	-0.7	ND	ND
13171-13416	ND	ND	7.6	0.0089	ND	ND	78.3	-3.4	ND	ND	ND	ND
13173-13477*	0.088	0.38	ND	ND	75.3	-1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13173-13506‡	0.088	0.38	9.7	-0.096	75.3	-1.7	72.7	-9	ND	ND	ND	ND
13175-13486‡	0.16	0.11	9.1	-0.07	74.8	-2.2	77.5	-4.2	70	-0.7	74.7	-3.4
13176-13487*	0.16	0.11	ND	ND	74.8	-2.2	ND	ND	70	-0.7	ND	ND
13177-13513‡	0.16	0.11	9.7	-0.096	74.8	-2.2	76.8	-4.9	70	-0.7	73.6	-4.5
13178-13417*	0.16	0.11	7.6	0.0089	74.8	-2.2	78.3	-3.4	70	-0.7	ND	ND
13180-13515†	0.028	0.88	7.5	0.015	73.3	-3.7	75.5	-6.2	ND	ND	ND	ND
13181-13389	ND	ND	7.6	0.0078	ND	ND	79.8	-1.9	ND	ND	76.3	-1.8
13182-13458‡	0.11	0.3	7.5	0.014	74	-3	79.5	-2.2	69.5	-1.2	76.2	-1.9
13184-13388*	0.11	0.3	7.6	0.0078	74	-3	79.8	-1.9	69.5	-1.2	76.3	-1.8
13185-13374	ND	ND	9.2	-0.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13188-13421	0.22	-0.028	7.4	0.024	77.5	0.5	77	-4.7	#70.7	0	ND	ND
13188-13430	0.22	-0.028	8	-0.011	77.5	0.5	78.8	-2.9	#70.7	0	76.1	-2
13190-13422	0.22	-0.028	7.7	0.005	77.5	0.5	78.5	-3.2	#70.7	0	75.8	-2.3
13192-13426	0.22	-0.028	ND	ND	77.5	0.5	ND	ND	#70.7	0	ND	ND
13192-13452	0.22	-0.028	ND	ND	77.5	0.5	ND	ND	#70.7	0	ND	ND
13194-13427†	0.22	-0.028	7.6	0.012	77.5	0.5	79.3	-2.4	#70.7	0	76.5	-1.6
13194-13456†	0.22	-0.028	7.5	0.014	77.5	0.5	79.5	-2.2	#70.7	0	76.2	-1.9
13196-13351†	0.22	-0.028	7.1	0.043	77.5	0.5	80	-1.7	#70.7	0	76.8	-1.3
13197-13353	0.22	-0.028	ND	ND	77.5	0.5	ND	ND	#70.7	0	ND	ND
13198-13389*	0.13	0.2	7.6	0.0078	73.3	-3.7	79.8	-1.9	69.2	-1.5	76.3	-1.8
13199-13391	ND	ND	7.6	0.0078	ND	ND	79.8	-1.9	ND	ND	76.3	-1.8
13200-13421	0.21	-0.0041	7.4	0.024	75	-2	77	-4.7	ND	ND	ND	ND
13200-13430	0.21	-0.0041	8	-0.011	75	-2	78.8	-2.9	ND	ND	76.1	-2

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13
固有識別子	H1L1 Fab (nM) の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化
13202-13426	0.21	-0.0041	ND	ND	75	-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13202-13452	0.21	-0.0041	ND	ND	75	-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13203-13427†	0.21	-0.0041	7.6	0.012	75	-2	79.3	-2.4	ND	ND	76.5	-1.6
13203-13456†	0.21	-0.0041	7.5	0.014	75	-2	79.5	-2.2	ND	ND	76.2	-1.9
13204-13351†	0.21	-0.0041	7.1	0.043	75	-2	80	-1.7	ND	ND	76.8	-1.3
13205-13353	0.21	-0.0041	ND	ND	75	-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13206-13454†	ND	ND	7.5	0.014	ND	ND	79.5	-2.2	ND	ND	76.2	-1.9
13207-13363	ND	ND	7.9	-0.0084	ND	ND	79	-2.7	ND	ND	76.1	-2
13208-13455‡	0.19	0.046	7.5	0.014	72.7	-4.3	79.5	-2.2	68.8	-1.9	76.2	-1.9
13209-13364*	0.19	0.046	7.9	-0.0084	72.7	-4.3	79	-2.7	68.8	-1.9	76.1	-2
13210-13510*	0.18	0.067	7.5	0.015	74.2	-2.8	80.5	-1.2	69.8	-0.9	77	-1.1
13211-13395*	0.18	0.067	ND	ND	74.2	-2.8	ND	ND	69.8	-0.9	ND	ND
13212-13396*	0.18	0.067	8.1	-0.017	74.2	-2.8	78	-3.7	69.8	-0.9	75.3	-2.8
13212-13415*	0.18	0.067	8.8	-0.053	74.2	-2.8	78.3	-3.4	69.8	-0.9	74.6	-3.5
13214-13405*	0.17	0.095	8.1	-0.018	74	-3	78	-3.7	ND	ND	ND	ND
13214-13410*	0.17	0.095	8.4	-0.034	74	-3	77.5	-4.2	ND	ND	ND	ND
13216-13476*	0.078	0.43	7.6	0.01	73.7	-3.3	74.5	-7.2	69.9	-0.8	71.2	-6.9
13216-13505*	0.078	0.43	9.6	-0.093	73.7	-3.3	75	-6.7	69.9	-0.8	ND	ND
13218-13482*	0.19	0.044	7.6	0.01	74.5	-2.5	77.8	-3.9	70.3	-0.4	75.2	-2.9
13219-13483*	0.19	0.044	ND	ND	74.5	-2.5	ND	ND	70.3	-0.4	ND	ND
13220-13511*	0.19	0.044	7	0.044	74.5	-2.5	76.7	-5	70.3	-0.4	ND	ND
13221-13406*	0.19	0.044	8.1	-0.018	74.5	-2.5	78	-3.7	70.3	-0.4	ND	ND
13221-13411*	0.19	0.044	8.4	-0.034	74.5	-2.5	77.5	-4.2	70.3	-0.4	ND	ND
13223-13512	0.12	0.25	7.3	0.028	73	-4	76.8	-4.9	ND	ND	ND	ND
13224-13428	ND	ND	8	-0.011	ND	ND	78.8	-2.9	ND	ND	76.1	-2
13225-13384	ND	ND	7.4	0.02	ND	ND	77.5	-4.2	ND	ND	75.3	-2.8
13226-13434*	0.15	0.15	8	-0.011	73.5	-3.5	79	-2.7	69.5	-1.2	76.1	-2
13227-13383*	0.15	0.15	7.4	0.02	73.5	-3.5	77.5	-4.2	69.5	-1.2	75.3	-2.8
13229-13428	0.13	0.2	8	-0.011	72.3	-4.7	78.8	-2.9	ND	ND	76.1	-2
13230-13384	0.13	0.2	7.4	0.02	72.3	-4.7	77.5	-4.2	ND	ND	75.3	-2.8
13231-13386*	0.12	0.24	7.4	0.02	72	-5	77.5	-4.2	68.2	-2.5	75.3	-2.8
13234-13432*	0.16	0.1	8	-0.011	73	-4	79	-2.7	ND	ND	76.1	-2
13235-13357‡	0.16	0.1	7.3	0.029	73	-4	78.5	-3.2	ND	ND	75.1	-3
13236-13433*	0.13	0.19	8	-0.011	72.5	-4.5	79	-2.7	69.1	-1.6	76.1	-2
13237-13358‡	0.13	0.19	7.3	0.029	72.5	-4.5	78.5	-3.2	69.1	-1.6	75.1	-3
13238-13459	0.36	-0.24	ND	ND	77	0	ND	ND	#70.1	-0.6	ND	ND
13238-13463†	0.36	-0.24	7.8	-8.10E-05	77	0	78.8	-2.9	#70.1	-0.6	ND	ND
13242-13465	0.36	-0.24	ND	ND	77	0	ND	ND	#70.1	-0.6	ND	ND
13242-13475	0.36	-0.24	ND	ND	77	0	ND	ND	#70.1	-0.6	ND	ND
13246-13459	0.32	-0.19	ND	ND	75.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13246-13463†	0.32	-0.19	7.8	-8.10E-05	75.5	-1.5	78.8	-2.9	ND	ND	ND	ND
13248-13465	0.32	-0.19	ND	ND	75.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13248-13475	0.32	-0.19	ND	ND	75.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13250-13355	0.32	-0.19	ND	ND	75.5	-1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13
固有識別子	H1L1 Fab (nM) の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab (nM) の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab (℃) の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab (℃) の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab (℃) の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化
13252-13369	0.34	-0.22	6.7	0.065	74	-3	81	-0.7	69.7	-1	77.4	-0.7
13253-13498	0.34	-0.22	7.5	0.016	74	-3	79.5	-2.2	69.7	-1	76.3	-1.8
13254-13508	0.34	-0.22	8.2	-0.022	74	-3	74.5	-7.2	69.7	-1	ND	ND
13255-13509	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
13256-13502	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
13257-13503	0.34	-0.22	8.4	-0.035	74	-3	81.3	-0.4	69.7	-1	78.4	0.3
13258-13504	0.34	-0.22	7.2	0.032	74	-3	82	0.3	69.7	-1	ND	ND
13259-13491	0.34	-0.22	7.9	-0.0078	74	-3	77.3	-4.4	69.7	-1	ND	ND
13261-13480	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
13262-13481	0.34	-0.22	7.2	0.034	74	-3	75.7	-6	69.7	-1	73.2	-4.9
13263-13493	0.34	-0.22	8.1	-0.015	74	-3	79.7	-2	69.7	-1	76.2	-1.9
13264-13400	0.34	-0.22	8.2	-0.024	74	-3	79.3	-2.4	69.7	-1	ND	ND
13265-13392	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
13265-13419	0.34	-0.22	7.6	0.011	74	-3	76.5	-5.2	69.7	-1	75.3	-2.8
13268-13401	0.34	-0.22	ND	ND	74	-3	ND	ND	69.7	-1	ND	ND
13269-13403	0.34	-0.22	7.8	0.0016	74	-3	79.8	-1.9	69.7	-1	76.1	-2
13271-13439	ND	ND	7.6	0.012	ND	ND	80.8	-0.9	ND	ND	77.4	-0.7
13272-13379	ND	ND	8.1	-0.016	ND	ND	80	-1.7	ND	ND	76.5	-1.6
13273-13441	0.099	0.32	7.6	0.012	74.5	-2.5	80.8	-0.9	70.6	-0.1	77.4	-0.7
13274-13381	0.099	0.32	8.1	-0.016	74.5	-2.5	80	-1.7	70.6	-0.1	76.5	-1.6
13277-13420*	0.17	0.085	7.3	0.028	73	-4	78.2	-3.5	ND	ND	ND	ND
13278-13372	0.35	-0.22	5.9	0.12	74.2	-2.8	80.5	-1.2	ND	ND	ND	ND
13279-13501	0.35	-0.22	7.5	0.015	74.2	-2.8	79.3	-2.4	ND	ND	ND	ND
13280-13488	0.35	-0.22	ND	ND	74.2	-2.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13281-13489	0.35	-0.22	7.9	-0.0078	74.2	-2.8	77.3	-4.4	ND	ND	ND	ND
13282-13484	0.35	-0.22	7.9	-0.0045	74.2	-2.8	77.3	-4.4	ND	ND	74.6	-3.5
13283-13478*	0.098	0.33	ND	ND	73.5	-3.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13283-13507*	0.098	0.33	7.3	0.026	73.5	-3.5	75.3	-6.4	ND	ND	ND	ND
13285-13414†	0.16	0.12	7.2	0.035	75.5	-1.5	77.8	-3.9	69.7	-1	74.5	-3.6
13287-13494	0.15	0.15	7.6	0.012	76.3	-0.7	78.5	-3.2	#69.6	-1.1	75.4	-2.7
13288-13516†	0.16	0.11	7.3	0.026	73.7	-3.3	77.8	-3.9	69	-1.7	74.6	-3.5
13289-13368	0.29	-0.14	6.7	0.065	73	-4	81	-0.7	69.1	-1.6	77.4	-0.7
13290-13497	0.29	-0.14	7.5	0.016	73	-4	79.5	-2.2	69.1	-1.6	76.3	-1.8
13291-13488	0.29	-0.14	ND	ND	73	-4	ND	ND	69.1	-1.6	ND	ND
13292-13489	0.29	-0.14	7.9	-0.0078	73	-4	77.3	-4.4	69.1	-1.6	ND	ND
13294-13492	0.29	-0.14	8.1	-0.015	73	-4	79.7	-2	69.1	-1.6	76.2	-1.9
13295-13484	0.29	-0.14	7.9	-0.0045	73	-4	77.3	-4.4	69.1	-1.6	74.6	-3.5
13296-13399	0.29	-0.14	8.2	-0.024	73	-4	79.3	-2.4	69.1	-1.6	ND	ND
13297-13402	0.29	-0.14	7.8	0.0016	73	-4	79.8	-1.9	69.1	-1.6	76.1	-2
13298-13439	0.12	0.26	7.6	0.012	72.2	-4.8	80.8	-0.9	ND	ND	77.4	-0.7
13299-13379	0.12	0.26	8.1	-0.016	72.2	-4.8	80	-1.7	ND	ND	76.5	-1.6
13300-13441	0.11	0.29	7.6	0.012	72.8	-4.2	80.8	-0.9	ND	ND	77.4	-0.7
13301-13381	0.11	0.29	8.1	-0.016	72.8	-4.2	80	-1.7	ND	ND	76.5	-1.6
13302-13367	0.26	-0.09	5.8	0.13	73.8	-3.2	80.7	-1	69.5	-1.2	77.3	-0.8

【0586】

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化
13303-13496	0.26	-0.09	7.9	-0.0084	73.8	-3.2	79.5	-2.2	69.5	-1.2	ND	ND
13304-13466‡	0.15	0.14	8.2	-0.024	72.5	-4.5	79.7	-2	68.3	-2.4	76.5	-1.6
13305-13448*	0.097	0.33	7	0.046	ND	ND	81.3	-0.4	ND	ND	77.9	-0.2
13306-13373*	0.097	0.33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13306-13375‡	0.097	0.33	8	-0.012	ND	ND	64.7	-17	ND	ND	ND	ND
13309-13443	0.24	-0.056	ND	ND	78	1	ND	ND	#70.7	0	ND	ND
13317-13423	0.12	0.23	7.9	-0.007	73.3	-3.7	81.3	-0.4	ND	ND	77.8	-0.3
13318-13437*	0.1	0.3	7.2	0.035	72.5	-4.5	81.2	-0.5	ND	ND	ND	ND
13319-13473*	0.18	0.072	8.1	-0.02	73.5	-3.5	80.7	-1	69.5	-1.2	78.3	0.2
13320-13370	0.26	-0.088	6	0.11	75.2	-1.8	80.5	-1.2	69.6	-1.1	76.9	-1.2
13321-13499	0.26	-0.088	7.4	0.023	75.2	-1.8	79	-2.7	69.6	-1.1	76	-2.1
13322-13425	0.26	-0.088	ND	ND	75.2	-1.8	ND	ND	69.6	-1.1	ND	ND
13327-13446	ND	ND	7	0.046	ND	ND	81.3	-0.4	ND	ND	77.9	-0.2
13328-13359	ND	ND	7.5	0.019	ND	ND	80.2	-1.5	ND	ND	77.3	-0.8
13329-13366*	0.23	-0.049	5.8	0.13	72.3	-4.7	80.7	-1	ND	ND	77.3	-0.8
13330-13495*	0.23	-0.049	7.9	-0.0084	72.3	-4.7	79.5	-2.2	ND	ND	ND	ND
13331-13447*	0.23	-0.049	7	0.046	72.3	-4.7	81.3	-0.4	ND	ND	77.9	-0.2
13332-13360*	0.23	-0.049	7.5	0.019	72.3	-4.7	80.2	-1.5	ND	ND	77.3	-0.8
13333-13387*	0.23	-0.049	8.1	-0.018	72.3	-4.7	80.8	-0.9	ND	ND	77.5	-0.6
13334-13449*	0.14	0.16	7	0.046	73.5	-3.5	81.3	-0.4	69.7	-1	77.9	-0.2
13335-13361*	0.14	0.16	7.5	0.019	73.5	-3.5	80.2	-1.5	69.7	-1	77.3	-0.8
13336-13450*	0.12	0.26	7	0.046	72.7	-4.3	81.3	-0.4	ND	ND	77.9	-0.2
13337-13362*	0.12	0.26	7.5	0.019	72.7	-4.3	80.2	-1.5	ND	ND	77.3	-0.8
13338-13371	0.36	-0.24	5.9	0.12	72.7	-4.3	81.5	-0.2	68.8	-1.9	ND	ND
13339-13500	0.36	-0.24	7.4	0.023	72.7	-4.3	80	-1.7	68.8	-1.9	ND	ND

H1L1 Fab は、CAT-2200 であり、H2L2 Fab は、ペルツズマブである。

多数のヘテロ二量体は、それらと関連する沈殿物を有した、沈殿物が H1L1 Fab と関連した場合、表 9A 及び 9B で「＊」と記載し；沈殿物が H2L2 Fab と関連した場合、表 9A 及び 9B で「†」と記載し；沈殿物が H1L1 及び H2L2 Fabs の両方と関連した場合、表 9A 及び 9B で「‡」と記載した。#-は、DSC サーモグラムにおける主 Fab ピーク（転移）の肩部の存在を示す。

【0587】

表 9B –LCCA 性能カットオフ基準を通過した K-K 由来 K-L 設計の抗原結合及び熱安定性評価

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8	列 9	列 10	列 11	列 12	列 13
固有識別子	H1L1 Fab（nM）の KD	H1L1 Fab 対野生型の KD の変化	H2L2 Fab（nM）の KD	H2L2 Fab 対野生型の KD の変化	H1L1 Fab（℃）の DSF 値	H1L1 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSF 値	H2L2 Fab 対野生型の DSF 値の変化	H1L1 Fab（℃）の DSC 値	H1L1 Fab 対野生型の DSC 値の変化	H2L2 Fab（℃）の DSC 値	H2L2 Fab 対野生型の DSC 値の変化
12938-13064	0.24	-0.056	7.9	-0.007	78	1	81.3	-0.4	#70.7	0	77.8	-0.3
12938-13079	0.24	-0.056	7.2	0.035	78	1	81.2	-0.5	#70.7	0	ND	ND
12938-13106	0.24	-0.056	6.9	0.051	78	1	81	-0.7	#70.7	0	78.2	0.1
12938-13469	0.24	-0.056	7.7	0.0027	78	1	80	-1.7	#70.7	0	77.2	-0.9
12944-13108	0.24	-0.056	7.4	0.02	78	1	81.5	-0.2	#70.7	0	ND	ND
12944-13471	0.24	-0.056	8	-0.012	78	1	81.3	-0.4	#70.7	0	77.9	-0.2
12958-13079	0.26	-0.088	7.2	0.035	75.2	-1.8	81.2	-0.5	69.6	-1.1	ND	ND
12961-13093	0.26	-0.088	7	0.046	75.2	-1.8	81.3	-0.4	69.6	-1.1	77.9	-0.2
13275-13461*	0.094	0.35	6.9	0.051	75	-2	81	-0.7	70.4	-0.3	78.2	0.1
13275-13470*	0.094	0.35	7.7	0.0027	75	-2	80	-1.7	70.4	-0.3	77.2	-0.9
13276-13462*	0.094	0.35	7.4	0.02	75	-2	81.5	-0.2	70.4	-0.3	ND	ND
13276-13472*	0.094	0.35	8	-0.012	75	-2	81.3	-0.4	70.4	-0.3	77.9	-0.2
13308-13340	0.24	-0.056	8	-0.013	78	1	79	-2.7	#70.7	0	75.9	-2.2
13308-13341	0.24	-0.056	7.8	-6.40E-04	78	1	78.8	-2.9	#70.7	0	76.1	-2
13309-13425	0.24	-0.056	ND	ND	78	1	ND	ND	#70.7	0	ND	ND
13310-13444	0.24	-0.056	8.1	-0.015	78	1	80.2	-1.5	#70.7	0	ND	ND
13314-13424	0.18	0.075	7.9	-0.007	75.7	-1.3	81.3	-0.4	70.8	0.1	77.8	-0.3
13314-13438	0.18	0.075	7.2	0.035	75.7	-1.3	81.2	-0.5	70.8	0.1	ND	ND
13316-13451	0.18	0.075	7	0.046	75.7	-1.3	81.3	-0.4	70.8	0.1	77.9	-0.2
13322-13443	0.26	-0.088	ND	ND	75.2	-1.8	ND	ND	69.6	-1.1	ND	ND
13323-13444	0.26	-0.088	8.1	-0.015	75.2	-1.8	80.2	-1.5	69.6	-1.1	ND	ND

H1L1 Fab は、CAT-2200 であり、H2L2 Fab は、ペルツズマブである。

多数のヘテロ二量体は、それらと関連する沈殿物を有した、沈殿物が H1L1 Fab と関連した場合、表 9A 及び 9B で「*」と記載し；沈殿物が H2L2 Fab と関連した場合、表 9A 及び 9B で「†」と記載し；沈殿物が H1L1 及び H2L2 Fabs の両方と関連した場合、表 9A 及び 9B で「‡」と記載した。#-は、DSC サーモグラムにおける主 Fab ピーク（転移）の肩部の存在を示す。

表 10-A1 クラスター1 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13173-13477	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K_K228D	S121K_Q124E_V133D
13173-13506	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K_V133S	S186K_K228D	S121K_Q124E_V133D
13180-13515	**A125R_L143E_K145T_Q179E**	**S122D_E124Q_T131R**	**S188K_K228D**	**S121K_V133I_S176D_T178E**
13177-13513	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	S188K_K228D	S121K_S131D_V133G_T178F
13178-13417	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E
13171-13416	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131K	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E
13176-13487	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L143R_K228D	S121K_Q124E_V133D_T180D
13175-13486	**A125R_L143D_K145T**	**S122D_E124Q_T131R**	**L143R_K228D**	**S121K_Q124E_V133D**

表 10-A2 クラスター2 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
12906-13152	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	Q124E_V133D
10970-11348	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S186K	V133D_Q160E
10969-11344	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S186K	V133D
10969-11290	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D
10966-11351	L143D_K145T	T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E
10966-11297	L143D_K145T	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E
10965-11347	L143D_K145T	T131K_V133S	S186K	V133D
10965-11293	L143D_K145T	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D
10962-11350	L143D_K145T	T131K	S186K	V133D_Q160E
10962-11296	L143D_K145T	T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E
10946-11382	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S131E_V133G_T178F
10945-11377	**L143D_K145T**	**E124Q_T131R**	**S188K**	**S131D_V133G_T178F**
10944-11314	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D
10944-11307	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143K	Q124E_V133D
10943-11349	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E
10943-11295	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E
10942-11345	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D
10942-11291	L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D
10928-11348	L143D_K145T	E124Q_T131K	S186K	V133D_Q160E

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10928-11294	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E
10927-11344	L143D_K145T	E124Q_T131K	S186K	V133D
10927-11290	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D
10924-11376	L143D_K145T	E124Q_T131K	S188K	S131D_V133G_T178F
10970-11294	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E
10973-11291	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D
13279-13501	L143D_K145T	E124Q_T131R	Q39E_L143R	Q38R_Q124E_V133D
10973-11345	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D
13278-13372	L143D_K145T	E124Q_T131R	L45P_L143R	P44F_Q124E_V133D
13216-13476	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	Q124E_V133D_L135W
13283-13478	L143D_K145T_F174G	E124Q_T131K_V133S_S176F	L143I_S186K_V190F	Q124E_V133D_L135A
13216-13505	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K_V133S	S186K	Q124E_V133D_L135W
13283-13507	L143D_K145T_F174G	E124Q_T131K_V133S_S176F	S186K_V190F	Q124E_V133D_L135A
13220-13511	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_L135W_T178F
13285-13414	L143D_K145T_F174G	T116F_E124Q_T131K_S176F	L124R_S186K_V190F	V133G_L135A_S176D_T180E
13287-13494	**L143D_K145T_F174G**	**T116F_E124Q_T131R_S176F**	**L143R_V190F**	**Q124E_V133D_L135A**
13219-13483	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_L135W_T180D
13218-13482	**A139W_L143D_K145T**	**E124Q_T131R**	**L143R**	**Q124E_V133D_L135W**
13282-13484	**L143D_K145T**	**E124Q_T131R**	**L143R**	**Q124E_V133D_T180D**
10982-11351	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E
10982-11297	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E
10981-11347	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	S186K	V133D
10981-11293	L143D_K145T_Q179E	T131K_V133S	L143I_S186K	V133D
10978-11350	L143D_K145T_Q179E	T131K	S186K	V133D_Q160E
10978-11296	L143D_K145T_Q179E	T131K	L143I_S186K	V133D_Q160E
10977-11346	L143D_K145T_Q179E	T131K	S186K	V133D
10977-11292	L143D_K145T_Q179E	T131K	L143I_S186K	V133D
10974-11349	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	S186K	V133D_Q160E
10974-11295	L143D_K145T_Q179E	E124Q_T131K_V133S	L143I_S186K	V133D_Q160E
10923-11306	L143D_K145T	E124Q_T131K	L143K	Q124E_V133D

【０５８８】

表 10-A3 クラスター3 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13290-13497	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	Q39E_L124R_Q179K	Q38R_V133G_S176D_T180E
10992-11410	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10989-11259	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E
10987-11261	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E
10987-11257	**L143E_K145T_Q179E**	**E124Q_T131K**	**L124R_S186K**	**V133G_S176D_T178E**
10987-11249	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E
10986-11391	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S176E_T178E
10985-11381	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S131E_V133G_T178F
10984-11376	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	S188K	S131D_V133G_T178F
10983-11306	**L143E_K145T_Q179E**	**E124Q_T131K**	**L143K**	**Q124E_V133D**
10953-11411	L143D_K145T	E124Q_T131R	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10952-11398	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	V133I_S176D_T178E
10950-11264	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10950-11260	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E
10950-11252	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10948-11262	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E
10948-11258	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E
10948-11250	L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E
10947-11392	**L143D_K145T**	**E124Q_T131R**	**S188K**	**S176E_T178E**
10934-11410	L143D_K145T	E124Q_T131K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10931-11263	**L143D_K145T**	**E124Q_T131K**	**L124R_S186R**	**V133G_S176D_T180E**
10931-11259	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E
10931-11251	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10929-11261	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E
10929-11257	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E
10929-11249	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E
10926-11391	L143D_K145T	E124Q_T131K	S188K	S176E_T178E
10989-11263	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10998-11307	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143K	Q124E_V133D
13289-13368	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L45P_L124R_Q179K	P44F_V133G_S176D_T180E

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10998-11314	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D
13223-13512	A139W_L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	V133I_L135W_S176D_T178E
13288-13516	L143E_K145T_F174G_Q179E	T116F_E124Q_T131R_S176F	S188K_V190F	V133I_L135A_S176D_T178E
13221-13411	**A139W_L143D_K145T**	**E124Q_T131R**	**L124R_S186K**	**V133G_L135W_S176D_T180E**
13214-13410	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_L135W_S176D_T180E
13221-13406	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_L135W_S176D_T180E
13214-13405	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_L135W_S176D_T180E
13291-13488	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178D
13281-13489	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E
13280-13488	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178D
13295-13484	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_T180D
13292-13489	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E
13294-13492	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L143R_S188K	Q124E_V133D_T178E
13297-13402	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T180E
13296-13399	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D
11007-11411	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
11006-11398	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	V133I_S176D_T178E
11004-11264	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
11004-11260	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T180E
11004-11252	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
11002-11262	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186R	V133G_S176D_T178E
11002-11258	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E
11002-11250	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T178E
11001-11392	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S176E_T178E
11000-11382	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S131E_V133G_T178F
10999-11377	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_T178F
10989-11251	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E

【０５８９】

表 10-A4 クラスター4 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13330-13495	S188K	K129T_S176E_Y178E	Q39E_L124E_K145T_Q179E	Q38R_S131R_V133G_S176R
13329-13366	S188K	K129T_S176E_Y178E	L45P_L124E_K145T_Q179E	P44F_S131R_V133G_S176R
11108-11231	S188K	S176E_Y178E	L124E_S188W	V133G_S176R_T178A
11108-11227	S188K	S176E_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133G_S176R_T178A
11107-11197	S188K	S176E_Y178E	L124E	V133G_S176R
11106-11229	S188K	S176E_Y178E	L124E_S188W	V133A_S176K_T178A
11106-11225	S188K	S176E_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133A_S176K_T178A
11105-11195	S188K	S176E_Y178E	L124E	V133A_S176K
11104-11190	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11103-11186	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178L
11102-11180	S188K	S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
11101-11219	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11101-11213	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11100-11205	**S188K**	**S176E_Y178E**	**L124E_K145T_Q179E**	**S131R_V133G_S176R**
11099-11216	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11099-11210	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11098-11200	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
11076-11355	S188A	S176A_Y178W	S186L_S188W	S176A_T178A
10771-11360	-	-	S186L_S188W	S176V
10771-11335	-	-	S186I_S188W	S176V
11163-11194	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11162-11184	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
11144-11192	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11143-11187	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178L
11142-11182	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
11089-11189	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11088-11185	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178L
11124-11202	S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
11125-11207	S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
11140-11202	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R

【０５９０】

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
11166-11198	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E	V133G_S176R
13333-13387	S188K	K129T_S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
13207-13363	A125R_S188K	S122D_K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E_K228D	S121K_S131K_S176K
13209-13364	**A125R_S188K**	**S122D_K129T_S176E_Y178E**	**K145T_S186E_K228D**	**S121K_S131K_S176K**
13235-13357	A139W_S188K	K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E	S131K_L135W_S176K
13237-13358	A139W_S188K	K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E	S131K_L135W_S176K
13337-13362	S188K	K129T_Y178E	K145T_S186E	S131K_S176K
13335-13361	**S188K**	**K129T_Y178D**	**K145T_S186E**	**S131K_S176K**
13328-13359	S188K	K129T_S176D_Y178T	K145T_S186E	S131K_S176K
13332-13360	S188K	K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E	S131K_S176K
11167-11232	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S188W	V133G_S176R_T178A
11167-11228	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133G_S176R_T178A
11165-11230	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S188W	V133A_S176K_T178A
11141-11207	V177I_S188K	V133I_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
11165-11226	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_S186I_S188W	V133A_S176K_T178A
11164-11196	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E	V133A_S176K
11161-11220	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11161-11214	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11160-11208	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
11159-11217	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11159-11211	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11158-11203	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
11150-11193	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11149-11188	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178L
11148-11183	V177I_S188K	V133I_S176E_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
11087-11179	S188K	S176D_Y178E	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K

表 10-A5 クラスター5 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
11066-11181	**S186K_S188T**	**V133D_Y178T**	**K145T_V177D_S188D**	**S176K_T178K**
11063-11325	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_T178S

【０５９１】

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
11062-11323	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_S176A_T178S
11056-11324	S186K_S188T	T131S_V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_T178S
11055-11322	S186K_S188T	T131S_V133D_Y178T	L143T_S188D	S131K_S176A_T178S
11044-11191	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	K145T_V177D_S188D	S176K_T178R
11043-11181	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
10898-11239	L124E_V190E	V133I_L135R_Y178F	L124R	V133G_S176D
10888-11415	L124E_V190D	V133I_L135K_Y178F	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10883-11236	L124E_V190D	V133I_L135K	L124R	V133G_S176D
10881-11412	L124E_V190D	L135K_Y178F	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E

表 10-A6 クラスター6 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
10861-11409	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E
10776-11353	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186K_S188T	V133D
10814-11233	**K145T_V177D_S188D**	**S176K_Y178K**	**L124R**	**V133G_S176D**
10813-11352	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S186K_S188T	V133D
10813-11320	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143S_S186K_S188T	V133D
10813-11311	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143K	V133D
10812-11393	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S176E_T178E
10810-11383	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S131E_V133G_T178F
10808-11315	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143R	Q124E_V133D
10808-11308	**K145T_V177D_S188D**	**S176K_Y178K**	**L143K**	**Q124E_V133D**
10806-11369	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S186R	Q124E_Q160E_T180E
10806-11326	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	Q179K	Q124E_Q160E_T180E
10776-11321	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143S_S186K_S188T	V133D
10816-11265	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10776-11312	D146T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	V133D
10862-11414	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10860-11406	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E
10853-11388	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S176D_T178E

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10851-11380	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S131D_V133G_T178F
10833-11387	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S176D_T178E
10831-11379	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S131D_V133G_T178F
10820-11413	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10818-11404	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133I_S176D_T178E
10811-11386	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S176D_T178E
10816-11253	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10819-11407	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E
10858-11267	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10848-11371	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
10858-11255	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10857-11243	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R	V133G_S176D_T178D
10856-11235	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L124R	V133G_S176D
10855-11353	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S186K_S188T	V133D
10855-11321	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143S_S186K_S188T	V133D
10855-11312	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	V133D
13330-13495	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S176E_T178E
10852-11385	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	S188K	S131E_V133G_T178F
10850-11317	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143R	Q124E_V133D
10850-11310	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	L143K	Q124E_V133D
10848-11328	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178R	Q179K	Q124E_Q160E_T180E
10827-11373	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S186R_S188W	Q124E_Q160E_S176A_T178A_T180E
10840-11408	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	V177I_S188K	V133I_S176E_T178E
10837-11266	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10837-11254	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10835-11234	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L124R	V133G_S176D
10834-11394	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S176E_T178E
10832-11384	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S188K	S131E_V133G_T178F
10830-11316	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L143R	Q124E_V133D
10830-11309	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	L143K	Q124E_V133D
10828-11370	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	S186R	Q124E_Q160E_T180E

【０５９２】

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
10828-11327	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178L	Q179K	Q124E_Q160E_T180E
10809-11378	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	S188K	S131D_V133G_T178F

表 10-A7 クラスター7 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13253-13498	K145T_S188E	Y178K	Q39E_L124R_Q179K	Q38R_V133G_S176D_T180E
13252-13369	K145T_S188E	Y178K	L45P_L124R_Q179K	P44F_V133G_S176D_T180E
13258-13504	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T180E
13261-13480	K145T_S188E	Y178K	L143K_S188K	Q124E_V133D_S176E_T178E_T180E
13262-13481	K145T_S188E	Y178K	L143K_S188K	Q124E_V133D_S176E_T180E
13255-13509	K145T_S188E	Y178K	S186R_S188K	Q124E_Q160E_S176D_T178D_T180E
13254-13508	K145T_S188E	Y178K	S186R_S188K	Q124E_Q160E_S176D_T178D
10875-11416	K145T_V177T_S188E	Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10873-11268	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10873-11256	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10871-11240	K145T_V177T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D
10870-11396	K145T_V177T_S188E	Y178K	S188K	S176E_T178E
10869-11390	K145T_V177T_S188E	Y178K	S188K	S176D_T178E
10800-11416	K145T_S188E	Y178K	V177I_S188K	V133L_S176D_T178E
10798-11268	K145T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
10798-11256	K145T_S188E	Y178K	L124R_Q179K	V133G_S176D_T180E
10796-11396	K145T_S188E	Y178K	S188K	S176E_T178E
13256-13502	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T178D_T180E
13257-13503	K145T_S188E	Y178K	Q179K_S188K	Q124E_S176E_T178E_T180E
13269-13403	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T180E
13264-13400	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D
13169-13418	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	L124R_S186R_K228D	S121K_V133G_S176D_T180E
13212-13415	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R_S186R	V133G_L135W_S176D_T180E
13259-13491	K145T_S188E	Y178K	L143R_S188K	Q124E_V133D_S176D_T178E
13263-13493	**K145T_S188E**	**Y178K**	**L143R_S188K**	**Q124E_V133D_T178E**
13167-13514	**A125R_K145T_S188E**	**S122D_Y178K**	**S188K_K228D**	**S121K_S176E_T178E**

【０５９３】

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13210-13510	A139W_K145T_S188E	Y178K	S188K	L135W_S176E_T178E
13168-13397	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	L124R_K228D	S121K_V133G_S176D
13268-13401	K145T_S188E	Y178K	L124R_L143K	Q124E_V133G_S176D_T178E_T180E
13211-13395	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_L135W_S176D
13212-13396	A139W_K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_L135W_S176D_T180E
13265-13419	K145T_S188E	Y178K	L124R_S188K	Q124E_V133G_S176D_T178D
13265-13392	K145T_S188E	Y178K	L124K_S188K	Q124E_V133G_S176D_T178D
10798-13036	K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D_T180E
12878-11240	**K145T_S188E**	**Y178K**	**L124R**	**V133G_S176D**
10795-11390	K145T_S188E	Y178K	S188K	S176D_T178E

表 10-A8 クラスター8 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13318-13437	S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
11061-11273	S186K_S188T	V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
12938-13064	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
13319-13473	S186R	K129T_S176A_Y178W_S180E	L143E_K145T_S188W	Q124K_S176A_T178R
13277-13420	L143A_S186R	K129T_V133W_S180E	L124W_L143E_K145T	Q124K_V133A_T178R
13322-13425	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_T129K_Q160K_T178R
12961-13471	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R
12961-13108	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R
12958-13469	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R
12958-13106	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R
12958-13064	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
12944-13093	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
11157-11279	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
11156-11274	V177I_S188K	V133L_S176D_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
11097-11277	S188K	S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
11096-11272	S188K	S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
11042-11273	L143S_S186K_S188T	V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13314-13424	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
11030-11285	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R
11030-11276	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
11029-11288	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188W	Q124R_S176A_T178R
11029-11282	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S186I_S188W	Q124R_S176A_T178R
11028-11275	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R
11027-11287	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188W	Q124R_Q160R_S176A_T178R
11027-11281	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S186I_S188W	Q124R_Q160R_S176A_T178R
11026-11270	**L143K**	**K129T_V133D**	**L124W_L143E_K145T_Q179E**	**Q124K_V133A_T178R**
11025-11284	L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124K_T178R
13308-13341	Q179K	K129T_S180E	F122C_L143E_K145T_Q179E	Q124C_Q160K_T178R
13275-13461	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R
12938-13106	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_Q160K_T178R
13314-13438	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
12938-13079	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
13309-13425	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_T129K_Q160K_T178R
12938-13469	**Q179K**	**K129T_S180E**	**L143E_K145T_S188L**	**Q124R_Q160K_T178R**
12957-13061	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T	Q124K_T178R
13336-13450	S188K	K129T_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
13321-13499	S186R	K129T_S180E	Q39E_L143E_K145T_Q179E	Q38R_Q124K_T178R
13339-13500	S188K	S176E_Y178E	Q39E_L143E_K145T_Q179E	Q38R_Q124R_T178R
13320-13370	**S186R**	**K129T_S180E**	**L45P_L143E_K145T_Q179E**	**P44F_Q124K_T178R**
13338-13371	S188K	S176E_Y178E	L45P_L143E_K145T_Q179E	P44F_Q124R_T178R
13224-13428	A139W_L143I_S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13229-13428	A139W_S186K	K129T_V133D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13226-13434	**A139W_L143K**	**K129T_V133D**	**L143E_K145T_Q179E**	**Q124R_L135W_T178R**
13305-13448	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
13273-13441	L124K_L143K	K129T_T131E_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R
13271-13439	L124K_L143K	K129T_T131D_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R
13300-13441	L143K	K129T_T131E_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R
13298-13439	L143K	K129T_T131D_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160R_T178R

【０５９４】

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13234-13432	A139W_S188K	K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R
13236-13433	A139W_S188K	K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R
13334-13449	S188K	K129T_Y178D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
12944-13471	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R
13327-13446	S188K	K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
13331-13447	S188K	K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
13276-13462	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R
12944-13108	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188L	Q124R_T178R
13316-13451	**Q179K**	**K129T_Y178E_S180E**	**L143E_K145T_Q179E**	**Q124R_T178R**
13322-13443	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_Q160K_T178R
13310-13444	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_T178R
13323-13444	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_T178R
12958-13079	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_Q160K_T178R
12961-13093	S186R	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
13317-13423	Q179K_V190K	K129T_V133D_L135S_S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
13308-13340	Q179K	K129T_S180E	F122C_L143E_K145T	Q124C_Q160K_T178R
13276-13472	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_T178R
13275-13470	L143A_Q179K	K129T_V133W_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R
13309-13443	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T129K_Q160K_T178R

【０５９５】

表 10-A9 クラスター9 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13182-13458	A125R_L143K	S122D_K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R
13206-13454	A125R_S188K	S122D_K129T_S176D_Y178T	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R
13197-13353	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_T129K_S131K
13188-13430	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13192-13452	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R
13200-13421	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13202-13426	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R
13203-13427	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_T178R
13204-13351	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_S131K

【0596】

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13205-13353	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_T129K_S131K
13188-13421	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13190-13422	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T	Q124R_L135W_T178R
13192-13426	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R
13194-13427	**A125R_Q179K**	**S122D_K129T_S180E**	**L143E_K145T_K228D**	**S121K_Q124R_T178R**
13200-13430	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_Q160K_T178R
13194-13456	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R
13202-13452	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_Q160K_T178R
13203-13456	A125R_S186R	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R
13208-13455	**A125R_S188K**	**S122D_K129T_S176E_Y178E**	**L143E_K145T_Q179E_K228D**	**S121K_Q124R_T178R**
13196-13351	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	K145T_Q179E_K228D	S121K_S131K

表 10-A10 クラスター10 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13304-13466	**L143K_F174G**	**T116F_K129T_V133D_S176F**	**L143E_K145T_Q179E_V190F**	**Q124R_L135A_T178R**
13238-13459	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188F_V190F	Q124K_L135A_T178R
10780-11417	F174G	S176F	V190F	
10781-11300	F174G	S176F	L143I_V190F	L135A
10781-11419	F174G	S176F	V190F	L135A
10786-11299	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	-
10786-11418	F174G	T116F_S176F	V190F	-
10787-11301	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	L135A
10787-11420	F174G	T116F_S176F	V190F	L135A
10788-11422	F174G	T116F_S176F	V190F	L135A_T178F
10792-11305	F174G	T116F_S176F	L143I_V190F	T178F
10792-11424	F174G	T116F_S176F	V190F	T178F
10793-11375	F174G	T116F_S176F	S188F	V133A
10684-10706	S186R	K129T_S180E	K145T_Q179E	S131K
13248-13475	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R
13250-13355	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	K145T_Q179E_S188F_V190F	S131K_L135A
13242-13475	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R

10 20 30 40 50

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13246-13463	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124K_L135A_T178R
13238-13463	**F174G_Q179K**	**T116F_K129T_S176F_S180E**	**L143E_K145T_Q179E_V190F**	**Q124K_L135A_T178R**
13248-13465	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R
13246-13459	F174G_S186R	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_S188F_V190F	Q124K_L135A_T178R
13242-13465	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124R_L135A_Q160K_T178R

表 10-A11 クラスター11 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13185-13374	A125R_L143K_V190K	S122D_K129T_V133D_L135S	L124E_A139I_K145T_V190I_K228D	S121K_S131K_L135K
13306-13373	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L124E_A139I_K145T_V190I	S131K_L135K
13306-13375	**L143K_V190K**	**K129T_V133D_L135S**	**L124E_K145T**	**S131K_L135K**

表 10-A12 クラスター12 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異 (Kabat)	L1 突然変異 (Kabat)	H2 突然変異 (Kabat)	L2 突然変異 (Kabat)
13303-13496	L143K	K129T_V133D	Q39E_L124E_K145T_Q179E	Q38R_S131R_V133G_S176R
13302-13367	L143K	K129T_V133D	L45P_L124E_K145T_Q179E	P44F_S131R_V133G_S176R
11033-11209	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11033-11215	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131K_V133G_S176R_T178A
11034-11204	**L143K**	**K129T_V133D**	**L124E_K145T_Q179E**	**S131R_V133G_S176R**
11035-11212	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S186I_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11035-11218	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_S188W	S131R_V133G_S176R_T178A
11036-11221	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_S186E	S131R_V133S_L135K
11039-11224	L143K	K129T_V133D	L124E_L143E_K145T	S131R_V133T_L135K_T178S
11064-11201	S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
11065-11206	**S186K_S188T**	**V133D_Y178T**	**L124E_K145T_Q179E**	**S131R_V133G_S176R**
13299-13379	L143K	K129T_T131D_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
13301-13381	L143K	K129T_T131E_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
13272-13379	L124K_L143K	K129T_T131D_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
13274-13381	L124K_L143K	K129T_T131E_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R
13227-13383	**A139W_L143K**	**K129T_V133D**	**L124E_K145T_Q179E**	**S131R_V133G_L135W_S176R**
13184-13388	A125R_L143K	S122D_K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
13231-13386	A139W_S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R
13199-13391	A125R_S186K_S188T	S122D_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R
13230-13384	A139W_S186K	K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R
13198-13389	A125R_S186K	S122D_K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R
13225-13384	A139W_L143I_S186K	K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R
13181-13389	A125R_L143I_S186K	S122D_K129T_V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E_K228D	S121K_S131R_V133G_S176R
11032-11199	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131K_V133G_S176R

表 10-A1～10-A12 では、H1L1 Fab は、CAT-2200 であり、H2L2 Fab は、ペルツズマブである

【０５９７】

【０５９８】

表 10-B1 クラスター1 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10657-10760	**L143E_K145T_Q179E**	**E124K_Y178R**	**S186R**	**T178E_T180E**
10656-10758	L143E_K145T_Q179E	E124K_Y178R	S186R	Q160E_T180E

表 10-B2 クラスター2 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10652-10755	L143E_K145T	E124R	S186R	Q124E_Q160E_T180E
10652-10734	**L143E_K145T**	**E124R**	**Q179K**	**Q124E_Q160E_T180E**
10652-10702	L143E_K145T	E124R	D146G_Q179K	Q124E_Q160E_T180E

表 10-B3 クラスター3 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10690-10727	S186R	Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R
10689-10707	S186R	S180E	K145T_Q179E	S131K
10685-10726	**S186R**	**S180E**	**L143E_K145T_Q179E**	**Q124K_T178R**
10685-10719	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124K_T178R

表 10-B4 クラスター4 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10665-10724	**Q179K**	**S180E**	**L143E_K145T**	**Q124R_Q160K_T178R**
10664-10722	Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R
10632-10724	D146G_Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
10631-10722	D146G_Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R

表 10-B5 クラスター5 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10688-10724	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
10687-10722	S186R	S180E	L143E_K145T	Q124R
10683-10720	S186R		L143E_K145T	Q124R
10682-10718	S186R		L143E_K145T	Q124K_T178R
10659-10720	L143R		L143E_K145T	Q124R

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10658-10720	L143K		L143E_K145T	Q124R

表 10-B6 クラスター6 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10681-10747	Q39R	Q38E	Q39E	Q38R
10681-10741	**Q39R**	**Q38E**	**Q39D**	**Q38R**
10680-10746	Q39R	Q38D	Q39E	Q38R
10680-10740	Q39R	Q38D	Q39D	Q38R
10679-10738	Q39K	Q38E	Q39D	Q38K
10678-10743	Q39K	Q38D	Q39E	Q38K
10677-10751	Q39E	Q38R	Q39R	Q38E
10676-10750	Q39E	Q38R	Q39R	Q38D
10671-10751	Q39D	Q38R	Q39R	Q38E
10623-10745	-	-	Q39E	Q38R
10623-10739	-	-	Q39D	Q38R
10622-10742	-	-	Q39E	Q38K
10622-10736	-	-	Q39D	Q38K
10679-10744	Q39K	Q38E	Q39E	Q38K
10678-10737	Q39K	Q38D	Q39D	Q38K
10674-10749	Q39E	Q38K	Q39K	Q38E

表 10-B7 クラスター7 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10625-10701	-	L135W	A139W	F116A_L135V
10624-10700	-	L135W	A139W	F116A

表 10-B8 クラスター8 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10662-10733	L45F	-	L45P	P44F
10662-10731	L45F	-	L45A	P44F
10621-10733	-	-	**L45P**	**P44F**

【０５９９】

【0600】

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10621-10731	-	-	L45A	P44F

表 10-B9 クラスター9 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10629-10695	A139W	T116A		L135W

表 10-B10 クラスター10 K-K 由来 K-L 設計

固有識別子	H1 突然変異（Kabat）	L1 突然変異（Kabat）	H2 突然変異（Kabat）	L2 突然変異（Kabat）
10640-10713	**L124E**	**V133G_S176R**	**L124R**	**V133G_S176D**

表 10-B1～10-B10 では、H1L1 Fab は、CAT-2200 であり、H2L2 Fab は、ペルツズマブである

表 11A：SMCA 形式で試験した K-L 設計の H1、L1、H2 及び L2 の Fab 領域におけるアミノ酸突然変異（Kabat 番号付け）。

クラスター	設計	H1 突然変異（ラムダ）	L1 突然変異（ラムダ）	H2 突然変異（カッパ）	L2 突然変異（カッパ）
kl-6	2892	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L143K	Q124E_V133D
kl-6	2901	K145T_V177D_S188D	S176K_Y178K	L124R	V133G_S176D
kl-4	2979	S188K	S176E_Y178E	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
kl-3	2994	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L143K	Q124E_V133D
kl-3	3008	L143E_K145T_Q179E	E124Q_T131K	L124R_S186K	V133G_S176D_T178E
kl-3	3018	L143D_K145T	E124Q_T131K	L124R_S186R	V133G_S176D_T180E
kl-2	3025	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S131D_V133G_T178F
kl-3	3041	L143D_K145T	E124Q_T131R	S188K	S176E_T178E
kl-12	3102	L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
kl-8	3109	L143K	K129T_V133D	L124W_L143E_K145T_Q179E	Q124K_V133A_T178R
kl-12	3113	S186K_S188T	V133D_Y178T	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_S176R
kl-5	3122	S186K_S188T	V133D_Y178T	K145T_V177D_S188D	S176K_T178K
kl-8	3878	Q179K	K129T_S180E	L143E_K145T_S188L	Q124R_Q160K_T178R
kl-9	3890	A125R_Q179K	S122D_K129T_S180E	L143E_K145T_K228D	S121K_Q124R_T178R
kl-8	3898	Q179K	K129T_Y178E_S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124R_T178R
kl-10	3910	F174G_Q179K	T116F_K129T_S176F_S180E	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124K_L135A_T178R
kl-7	3931	K145T_S188E	Y178K	L124R	V133G_S176D
kl-4	3947	S188K	K129T_Y178D	K145T_S186E	S131K_S176K
kl-4	3951	A125R_S188K	S122D_K129T_S176E_Y178E	K145T_S186E_K228D	S121K_S131K_S176K
kl-7	3954	A125R_K145T_S188E	S122D_Y178K	S188K_K228D	S121K_S176E_T178E
kl-7	3957	K145T_S188E	Y178K	L143R_S188K	Q124E_V133D_T178E
kl-9	3967	A125R_S188K	S122D_K129T_S176E_Y178E	L143E_K145T_Q179E_K228D	S121K_Q124R_T178R
kl-2	3971	L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_T180D
kl-2	3972	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L143R	Q124E_V133D_L135W
kl-1	3974	A125R_L143D_K145T	S122D_E124Q_T131R	L143R_K228D	S121K_Q124E_V133D
kl-2	3980	L143D_K145T_F174G	T116F_E124Q_T131R_S176F	L143R_V190F	Q124E_V133D_L135A
kl-3	3987	A139W_L143D_K145T	E124Q_T131R	L124R_S186K	V133G_L135W_S176D_T180E
kl-1	3997	A125R_L143E_K145T_Q179E	S122D_E124Q_T131R	S188K_K228D	S121K_V133I_S176D_T178E
kl-8	4008	A139W_L143K	K129T_V133D	L143E_K145T_Q179E	Q124R_L135W_T178R
kl-12	4010	A139W_L143K	K129T_V133D	L124E_K145T_Q179E	S131R_V133G_L135W_S176R
kl-11	4022	L143K_V190K	K129T_V133D_L135S	L124E_K145T	S131K_L135K
kl-8	4040	S186R	K129T_S180E	L45P_L143E_K145T_Q179E	P44F_Q124K_T178R

クラスター	設計	H1 突然変異（ラムダ）	L1 突然変異（ラムダ）	H2 突然変異（カッパ）	L2 突然変異（カッパ）
kl-10	4320	L143K_F174G	T116F_K129T_V133D_S176F	L143E_K145T_Q179E_V190F	Q124K_L135A_T178R

表 11B：SMCA 形式で試験した K-K 由来 K-L 設計の H1、L1、H2 及び L2 の Fab 領域におけるアミノ酸突然変異（Kabat 番号付け）。

クラスター	設計	H1 突然変異（ラムダ）	L1 突然変異（ラムダ）	H2 突然変異（カッパ）	L2 突然変異（カッパ）
kk-6	34	Q39R	Q38E	Q39D	Q38R
kk-10	2188	L124E	V133G_S176R	L124R	V133G_S176D
kk-8	2798	-	-	L45P	P44F
kk-4	2816	Q179K	S180E	L143E_K145T	Q124R_Q160K_T178R
kk-2	2826	L143E_K145T	E124R	Q179K	Q124E_Q160E_T180E
kk-3	2827	S186R	S180E	L143E_K145T_Q179E	Q124K_T178R
kk-1	2830	L143E_K145T_Q179E	E124K_Y178R	S186R	T178E_T180E

【０６０１】

表 12：選択された野生型系の、LC-MS によって評価された、抗体種のパーセンテージの DNA 比滴定の効果

系*	タグ	H1：H2：L1：L2 DNA 比	所望 H1L1_H2L2	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
A	L2 FLAG	10:20:24:46	40	0.2	0.3	0.1	0.5	0.4	0.6	20.3	26.2	0.8	0.5	3.9	6.1
A	L2 FLAG	8:22:17:53	36.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5	1.4	7.6	38.4	0.2	0.1	3.7	11.1
A	L2 FLAG	8:22:13:57	33.8	0.1	0.3	0.1	0.3	0.4	1.9	5.1	39.9	0.3	0.1	3.8	13.9
A	L2 FLAG	10:20:35:35	30.4	0.3	0.1	0.1	0.5	0.2	0.3	50.9	6.7	1.4	0	6	2.9
A	L2 FLAG	15:15:35:35	19.5	1.8	1.8	0.9	0.1	0	0	7.5	18.2	32.9	16.5	0.2	0.5
A	L2 FLAG	8:22:35:35	16.7	0.2	0.1	0.1	0.7	0.2	0.2	61.9	3.2	0.8	0.1	11.6	4.3
A	L2 FLAG	10:20:46:24	11	0.8	0.1	0	0.3	0.1	0.1	78.6	1.3	4	0.1	3	0.4
A	L2 FLAG	8:22:53:17	3.2	0.5	0.1	0	1.3	0.1	0.1	79.6	0.4	1.9	0	11.8	1
B†	L2 FLAG	20:10:37:33	36.8	0.5	1.1	1.6	0.1	0.2	0	19.6	22.4	8	9.5	0.3	0.1
B†	L2 FLAG	20:10:24:46	34.7	0.1	0.5	1.6	0.2	0.1	0.1	12.2	33.9	6.2	9.9	0.3	0.3
B†	L2 FLAG	20:10:46:24	33	1.1	0.8	0.6	0.1	0	0.1	40.6	9	9.3	5.2	0.2	0.1
B†	L2 FLAG	22:8:35:35	31.1	0.8	1.5	2.2	0.1	0	0	20.1	21.5	9.6	13	0	0
B†	L2 FLAG	20:10:35:35	29	0.3	2	2.1	0.1	0	0.1	14.5	20.4	13.5	17.5	0.3	0.1
B†	L2 FLAG	22:8:53:17	26.8	2.4	2.1	0.8	0.1	0.1	0	39.7	7.5	13.3	6.8	0.2	0.1
B†	L2 FLAG	15:15:35:35	43.7	0	0	0.5	0.2	0.5	0.3	22.6	24.8	0.4	0.4	2.9	3.7
B†	L2 FLAG	22:8:17:53	13.3	0.0	1.0	5.7	0.3	0.1	0.0	1.7	36.8	8.4	32.5	0.1	0.1
C†	タグ無し	17:13:35:35	45.4	0.2	0.8	0.3	0	0	0	24.7	16.1	5.8	5.8	0.5	0.2
C†	タグ無し	15:15:35:35	47.8	0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	28.1	17.1	1.9	2.2	1.4	0.8

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びヘルツズマブ H2/L2；系 B：SGN-CD19a H1/L1 及び CAT-2200 H2/L2；系 C：SGN-CD19a H1/L1 及び CR8071 H2/L2

†野生型対照の系 B†及び C†は、H1L1 対 H2L2 薬頭の配向における設計の系 B 及び C で異なる。

【０６０２】

表 13：野生型抗体構築物の LC-MS 対合データ及びポスト pA 収率（mg/L）、並びに対合に対するタグの効果

系*	タグ	ポスト pA 収率（mg/L A280）	%H1L1 対合（全ての H1 種における）	%H2L2 対合（全ての H2 種における）	%H1L1 及び%H2L2 対合（全ての種における）	H1L1_H2L2 and H1L2_H2L1**	H1L1_H2L2 and H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2	
A	L2 FLAG	41	57.4	79.9	70.6	47	36.5	0.3	0.3	0.1	0.2	0.3	0.6	14.6	1.7	1.9	4.3	12.3	
A	L1 HA	45	19.1	93.1	61	16.9	14.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.4	1.4	0.1	0.7	3	11.1	
B†	L2 FLAG	44	64.1	64.8	60	34.4	26.3	0	0	0.5	0.3	0.6	1.1	15.9	24.8	0.4	4.9	14.1	
B†	L1 FLAG	58	37.6	92	71.2	32.1	23.5	0.2	0	0	0.1	0.4	2.1	3.1	43.7	2	3.1	20.9	
B†	L2 HA	72	54.2	70.1	66.7	35.1	17	0	0	0	1	2.2	3.1	5.8	19.2	0.2	18.5	32.7	
C†	タグ無し	38	71.3	68.1	68.9	51.9	45.2	0	0	0	0.2	0.2	0.1	15.2	18.9	1.5	7.3	4.1	
C†	L1 FLAG	56	59.9	82.3	71.8	48.1	43.7	0.1	0	0.1	0.3	0.2	0.3	11.4	34.8	1.4	3.2	4	
C†	L2 FLAG	63	79.6	48.4	57.5	46.8	30.1	0	0	0.1	3.2	2.6	0.8	16.3	11.2	0.3	23.8	11.4	

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びベルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：SGN-CD19a H1/L1 及び CAT-2200 H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）：
系 C：SGN-CD19a H1/L1 及び CR8071 H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）
多数の LCMS SMCA 実験をいくつかの構築物について行った。これらの場合、各 SMCA 種の平均対合値及び中央値量を報告する。
**完全 Ab 種のみを考慮する
†野生型対照の系 B†及び C†は、H1L1 対 H2L2 弾頭の配向における設計の系 B 及び C で異なる。

【０６０３】

表 14：K-L 設計（総対合）の LC-MS 対合データ及びポスト pA 収率（mg/L）

設計§		クラスター		系*	ポスト pA 収率（mg/L 発現）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L1_H2L2**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L1_H2L2 の変化**	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H2L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																									
2892	kl-6		A	28	81.3	62.2	98.3	5.2	94.1	**33.1**	71.8	54.9	39.1	0.1	0.2	0.2	0.3	1	5	0.2	8.3	0.4	0.2	0.3	44.6
			B	34	84.7	14.6	94.3	40.1	88.7	**22**	84.2	49.1	63.4	0.6	0.1	0.5	0.3	0.2	0.1	3.2	7	15.8	4.9	0.3	3.7
			C	32	41.5	-6.9	99.6	20	69.9	**12.4**	41	-5.8	34.3	0.1	0.6	0.8	0	0	0.1	0.2	47.5	3.6	5.1	0	7.6
2901	kl-6		A	20	94.3	75.2	97.9	4.8	96.6	**35.6**	87	70.2	64.1	0.2	0.3	0.1	0.3	1.5	3.5	0.4	3.4	2.3	0.2	0.1	23.7
			B	18	85.7	15.6	94.6	40.4	88.8	**22.1**	79.2	44.1	48.2	1.6	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	2.2	7.7	29	5	0.4	4.7
			C	19	62.6	14.2	99.5	19.9	78.7	**21.2**	60.6	13.8	46.6	1.4	1.2	1.4	0.1	0	0.5	0	25.7	10	6.3	0.1	6.7
2979	kl-4		A	20	99.4	47.6‡	98.3	27.2‡	98.8	**31.5‡**	95.7	63.8‡	83.8	1.5	0	0.2	0.9	0	1	0	0.2	5.4	0	0	7.1
			B	30	98	6	77.3	39.7	86.7	**15.5**	72.4	40.3	63.7	0.2	0.1	0.8	0.1	0	0.8	22.1	0	1.2	0	1.2	9.6
			C	14	94.5	12.2	99.5	39.6	98.5	**26.7**	79.9	31.8	34.3	0	0.7	0	0.1	0	6	0.5	1.3	0	0	0.1	56.9
3008	kl-3		A	27	98.8	79.7	98.3	5.2	98.5	**37.5**	96.7	79.8	75.9	0	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	1.3	0.5	2.1	0.1	0.1	19.3
			B	26	98.3	28.2	98.8	44.6	98.4	**31.7**	93.2	58.1	57	2.1	0	0.2	0.1	0	0.1	0.2	1.4	35.8	0.3	0.1	2.7
			C	17	84.7	36.3	99.6	20	90.1	**32.6**	78.2	31.4	56.5	2.9	3.8	0.5	0	0.1	0.3	0.1	8.1	20.8	3.4	0	3.5
3018	kl-3		A	23	97.1	78	98.7	5.6	98	**37**	95.3	78.4	72.4	0	0	0.1	0.1	0	1	0.6	1.7	3.1	0.2	0.4	20.3
			B	33	96	25.9	98.6	44.4	96.5	**29.8**	77.9	42.8	33.9	7.1	0.1	0.2	0.1	0	0	0.2	1.8	52.9	2.1	0.1	1.4
			C	18	79.7	11.6	99.5	28.2	84.3	**15.4**	70	18.1	34.3	3.4	0.8	0.3	0	0	0	0.2	10.1	40.4	9.8	0	0.8

設計§	クラスター	系*	ポストpA収率（mg/L発現）	%H1L1対合	野生型に対する%H1L1対合の変化	%H2L2対合	野生型に対する%H2L2対合の変化	%H1L1及び%H2L2対合	**野生型に対する%H1L1及び%H2L2対合の変化**	H1L1_H2L2及びH1L2_H2L1**	野生型に対するH1L1_H2L2及びH1L2_H2L1の変化**	H1L1_H2L2及びH1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3系において移動可能：																								
3025	kl-2	A	35	83.6	64.5	99.1	6	93.9	**33**	72.7	55.9	54.9	0.1	0	0	0.1	0.4	8.9	0.4	10.7	0.1	0.1	0.1	24.1
		B	30	80.2	10.1	87.9	33.7	85.5	**18.8**	71.4	36.3	44.9	0	0	0.1	0.1	0.1	2	3.6	12	0.6	0	6.4	30.1
		C	37	43.9	-4.5	99.7	20.1	70.1	**12.6**	41.1	-5.7	40.4	1.8	1.4	2.3	0.1	0	0.2	0.1	52.1	0.6	0.7	0	0.3
3102	kl-12	A	28	96.5	44.7‡	97.6	26.5‡	97.1	**29.8‡**	93.1	61.2‡	81.3	0.1	0	0.5	1.2	0.2	1.8	0	2.1	2.8	0	0	9.9
		B	33	96.6	4.6	92.8	55.2	94.4	**23.2**	86.9	54.8	74.7	0.2	0.1	1.3	0.1	0	2	7.4	0	0.1	0	0.3	13.7
		C	27	88.7	6.4	99.8	39.9	98.1	**26.3**	65.2	17.1	27.1	0.1	0.4	0	0.1	0	11	0.1	2.9	0	0.1	0	58.2
3109	kl-8	A	16	99.7	47.9‡	97.4	26.3‡	98.6	**31.3‡**	96.4	64.5‡	81.3	0.8	0.1	0	0.5	1.2	0.3	0	0.2	10.7	0	0.1	4.8
		B	35	99.1	29‡	97.1	42.9‡	98	**31.3‡**	94.1	59‡	78.4	0.3	0.1	0	0	0	1.1	2.8	0.6	0.2	0	0.2	16.2
		C	21	84	15.9‡	99.6	28.3‡	97.9	**29‡**	66.8	18.7‡	17.6	0.1	0.3	0.1	0.1	0	5.6	0	2.6	0.1	0.2	0.2	73.1
3113	kl-12	A	33	97	45.2‡	98.4	27.3‡	97.8	**30.5‡**	93.8	61.9‡	74.7	0.2	0	0	0.9	0	1.3	0.1	2.4	2.1	0	0	18.2
		B	43	98.9	6.9	90.9	53.3	94.3	**23.1**	85.6	53.5	72.8	0.3	0.2	0.1	0	0	1.7	9.5	0.4	1.1	0	0.4	13.4
		C	28	76.7	-5.6	99.6	39.7	95.2	**23.4**	64	15.9	28.3	0	0.6	0.1	0.2	0	7.8	0.3	7	0.1	0.6	0	55
3122	kl-5	A	16	85.9	34.1‡	23.4	-47.7‡	85.8	**18.5‡**	0	-31.9‡	0	10.4	2.5	0.5	0	0	0	0.2	0	74	12.3	0	0
		B	38	96.9	4.9	89.7	52.1	92.9	**21.7**	84.7	52.6	72.7	0.2	0.2	0.5	0.1	0	0.8	10.2	1	1.6	0.3	0.5	11.8
		C	45	65.8	-16.5	99.8	39.9	91.1	**19.3**	61.5	13.4	32.6	0.1	0.4	0.5	0.1	0	3.4	0.2	15.9	0.2	0.1	0	46.7

設計[§]	クラスター	系*	ポスト pA 収率 (mg/L 発現)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																							
3878	kl-8	A	21	99.7	47.9‡	89.7	18.6‡	94.6	**27.3‡**	87.6	55.7‡	78.1	0.6	0	0.2	0.3	1	8.7	0.2	4.7	0	0.6	5.5
		B	31	97.7	5.7	28.7	-8.9	71.8	**0.6**	24.2	-7.9	17.3	3.6	0.7	0.9	0.1	0.2	47.8	0.1	24.5	0	2	1.9
		C	30	99.3	17	67.4	7.5	88.2	**16.4**	61.3	13.2	42.6	6	0.6	0	0.2	0.1	19.7	0.1	27.3	0	1.4	1.9
3890	kl-9	A	29	99.8	48‡	87.5	16.4‡	93.3	**26‡**	85.1	53.2‡	70.7	1.7	0	0	0	1.2	9.2	0.1	5.4	0	1.9	9.5
		B	24	99.7	29.6‡	51.3	-2.9‡	73.7	**7‡**	47.7	12.6‡	41.4	1.1	0	0	0.1	0.4	43.4	0.1	2.7	0	4.2	6.4
		C	27	98.4	30.3	88.5	17.2	92.8	**23.9**	86.3	34.4	72.3	0.7	0.3	0.3	0.2	0.9	8.5	0.5	2.1	0	2	12.1
3898	kl-8	A	15	98.7	46.9‡	98.7	27.6‡	98.7	**31.4‡**	93.9	62‡	81.4	2.3	0	0	0.6	0	0	1.3	9.1	0	0	4.3
		B	21	97.3	5.3	74.5	36.9	85.9	**14.7**	71.1	39	68.7	0.5	0.3	1	0	0	25	0.2	1.1	0	0.2	2.1
		C	11	97.4	15.1	95.2	35.3	96.3	**24.5**	91.4	43.3	87.4	0.4	0.8	0	0	0.1	4.8	1.6	1	0.1	0	3.2
3931	kl-7	A	30	92.2	73.1	94.9	1.8	93.6	**32.6**	83.9	67.1	70.7	0.5	0.2	0	0.2	1.7	3	6.5	7.2	0.4	0.1	8
		B	39	85.5	15.4	83.6	29.4	85	**18.3**	60.7	25.6	35.4	6.8	1.7	0.2	0.2	0	0	0	7.9	6.4	0.3	2.3
		C	40	57.1	8.7	99.5	19.9	68.6	**11.1**	45.7	-1.1	27.3	4.6	3.5	2.2	0	0	0.1	22	21.6	16.3	0.1	2.2
3947	kl-4	A	16	99.6	47.8‡	92.8	21.7‡	96.3	**29‡**	89.1	57.2‡	73.2	2.3	0	0	0.1	0.1	5	0.4	9.5	0	0.9	7.4
		B	24	98.8	28.7‡	70.3	16.1‡	81.7	**15‡**	66.1	31‡	53.4	0.2	0.3	0	0.3	0.5	23.6	0.6	0.7	0	5.5	13
		C	11	91.3	23.2	94.5	23.2	94	**25.1**	65.7	13.8	23.4	0.2	0.2	0.1	0	0.1	1.7	2	2.4	0.3	3.7	57.9
3951	kl-4	A	14	98.7	46.9‡	89.5	18.4‡	93.2	**25.9‡**	83.5	51.6‡	63.3	0.2	0	0.3	1.7	0	6.8	0.3	4.2	0	1.1	18.8
		B	23	99.8	29.7‡	77.5	23.3‡	85.6	**18.9‡**	72.8	37.7‡	52.5	0.1	0	0	0.1	0.2	17.7	0.1	0.9	0	5.3	21.6
		C	23	97.5	29.4	97.1	25.8	97.3	**28.4**	92.2	40.3	73.6	0	0.2	0	0	0	1.6	1.8	0.5	0	0.9	18.8

設計§	クラスター	系*	ガスト pA 収率 (mg/L 発現)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																								
3954	kl-7	A	35	99.1	47.3‡	97.7	26.6‡	98.3	**31‡**	92.7	60.8‡	71.9	1	0	0	0.5	0	2.1	1.2	0.8	4.2	0	0.2	18
		B	38	98.4	28.3‡	61.8	7.6‡	88.6	**21.9‡**	46	10.9‡	27.3	12.9	0.1	0.1	0	0	0.1	17.6	1.1	36.6	0.4	1.4	2.2
		C	39	89	40.6	98.7	19.1	92.4	**34.9**	78.1	31.3	55.4	8.9	1.1	0.1	0	0.1	0.2	0.6	4.6	20.5	4.2	0.1	4.3
3957	kl-7	A	32	90.2	71.1	90.6	-2.5	90.4	**29.5**	78.8	61.9	66.8	0.6	0.1	0	0.1	0.1	0.4	7.9	8.6	8.9	0.7	0.4	5.3
		B	34	99	28.9	85.4	31.2	95.6	**28.9**	70.9	35.8	36.5	7.9	0.1	0.1	0.1	0	0	6.4	0.3	44.4	0.4	0.4	3.3
		C	41	87.2	38.8	99.7	20.1	90.8	**33.3**	75.5	28.7	45.7	8	0.9	0.2	0	0	0.2	0	5.5	31.2	5.8	0.1	2.4
3967	kl-9	A	12	100	42.6	99.9	20	99.9	**29.3**	97.2	50.2	68.3	1.8	0	0	0	0	0	0	0	21.8	0	0	7.9
		B	18	97.1	27‡	98.6	44.4‡	98	**31.3‡**	91.8	56.7‡	69.4	0.3	0.1	0	0	0.1	2	1.7	2.1	1.1	0	0	23.3
		C	14	96.7	28.6	100	28.7	98.6	**29.7**	95.2	43.3	80	0.8	1.3	0	0	0	0.7	0	1.3	0.6	0.2	0	15.3
3971	kl-2	A	27	98.9	79.8	99.1	6	99.1	**38.1**	87.4	70.6	45.6	0.2	0	0	0.1	0	0.3	0.7	0.1	0.2	0.2	0.1	47.4
		B	27	97.9	27.8	99.3	45.1	98.9	**32.2**	93.2	58.1	62.3	0	0	0.2	0.1	0	3	0.3	1	0.7	0	0.2	32.2
		C	30	89	40.6	99.8	20.2	92.5	**35**	82.6	35.8	54.2	3.9	0.7	0.2	0	0	0.1	0.1	6.5	28.4	3.6	0	2.3
3972	kl-2	A	25	99.9	48.1‡	99.5	28.4‡	99.7	**32.4‡**	96.9	65‡	79.4	1.2	0	0	0.1	0	0.9	0.2	0.1	12.1	0	0	6
		B	36	98.1	28‡	99.7	45.5‡	98.5	**31.8‡**	84	48.9‡	46.5	8.1	0.1	0.1	0	0	0.3	0.1	0.2	40	1.1	0	3.5
		C	38	92.8	44.4	99.8	20.2	95.2	**37.7**	81.3	34.5	57.4	5.7	1.1	0	0	0	0.2	0.1	6	25.2	1.1	0	3.1
3974	kl-1	A	22	91.8	72.7	94.7	1.6	93.5	**32.5**	83.7	66.8	62.3	0.4	4.4	0	0.3	0.4	1.9	2.8	2	4.1	0.3	1.1	20
		B	38	97.6	27.5	92.6	38.4	96.5	**29.8**	72.9	37.8	34	8.3	0.3	0.2	0.2	0	0	2.7	1	49.3	1.1	0.1	3
		C	36	59.9	11.5	99.8	20.2	71	**13.5**	49.5	2.7	31.4	5.6	4.5	1.8	0	0	0.1	0	20.1	19.7	14.9	0	1.9

設計[5]		クラスター	系*	ボスト pA 収率（mg/L 発現）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の変化**	3/3 系において移動可能：	H1L1_H2L2	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3980↑	kl-2		A	26	99.7	47.9‡	74.8	3.7‡	86.9	**19.6‡**	71.4	39.5‡	59	1.9	0.1	0	1.1	0.1	1.4	18.9	0.1	7.8	0.1	2.3	7.2
			B	37	99.8	29.7‡	82.6	28.4‡	95.1	**28.4‡**	69.6	34.5‡	39.6	8.3	0	0	0.1	0.1	0.2	8.6	0.1	40.2	0.1	0.3	2.4
3987	kl-3		A	25	99.7	47.9‡	83	11.9‡	93.9	**26.6‡**	80.7	48.8‡	51.6	2.7	0	0.1	1.2	0.4	0.1	7.7	0.1	33	0.1	0.6	2.3
			B	27	97.5	27.4‡	98.1	43.9‡	97.6	**30.9‡**	66.4	31.3‡	24.8	11.1	0.3	0.2	0	0	0.1	0.4	0.4	60.4	1.6	0	0.7
			C	21	99.2	50.8	99.3	19.7	99.2	**41.7**	78.9	32.1	37.4	9.2	0.4	0	0	0	0.1	0	0.2	51.8	0.3	0.1	0.4
3997	kl-1		A	14	99.8	48‡	90.7	19.6‡	94.9	**27.6‡**	85.9	54‡	69	0.6	0	0.1	0.4	0	1.1	9.1	0.1	6.6	0	0	13
			B	25	98.8	28.7‡	53	-1.2‡	90.6	**23.9‡**	38	2.9‡	16	12.2	0.2	0.1	0	0	0	13.6	0	54	0.8	1.6	1.4
			C	6	96	27.9	99.9	28.6	96	**27.1**	2.9	-49	0.4	11.2	0.7	0.1	0	0	0	0	0.4	83.8	3.3	0	0.1
4008	kl-8		A	22	100	42.6	99.3	19.4	99.7	**29.1**	96.5	49.5	81.6	1.2	0	0	0	0	1	0.6	0	8.7	0	0	6.9
			B	30	99.6	7.6	70.9	33.3	84.6	**13.4**	68.7	36.6	60.2	0.6	0	0.1	0	0.1	0.7	25.7	0.1	4.1	0	2.2	6.1
			C	26	99.6	17.3	98.3	38.4	98.9	**27.1**	96.8	48.7	85.5	0.1	0.3	0	0	0	0.7	1.7	0	1.3	0	0.1	10.3
4010	kl-12		A	29	99.9	42.5	98.9	19	99.5	**28.9**	98.1	51.1	76.7	0.2	0	0	0.1	0.1	0.4	0.7	0	15.3	0	0	6.6
			B	27	99.5	7.5	71.5	33.9	84.8	**13.6**	67.1	35	59.9	0.5	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	27.7	0.1	3	0	0.9	6.9
			C	23	99.3	17	98.6	38.7	98.9	**27.1**	96.7	48.6	83.6	0.2	0.4	0	0	0	0.8	1.4	0	0.8	0	0.1	12.6
4040	kl-8		A	29	99.8	48‡	97.7	26.6‡	98.7	**31.4‡**	94.6	62.7‡	85.8	1.2	0	0	0.9	0	2	0.7	0.1	3.7	0	0	5.5
			B	41	99.2	29.1‡	75.8	21.6‡	86	**19.3‡**	73.7	38.6‡	62.7	0.6	0	0	0.1	0.1	0.6	20.4	0.6	1.3	0	3.3	10.3
			C	19	98.7	30.6	98.6	27.3	98.7	**29.8**	81.8	29.9	51.2	1.2	0.1	0	0	0.3	8.2	1	0.5	0.5	0	0.3	36.7

設計§	クラスター	系*	ポスト pA 収率（mg/L 発現）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																								
4320	kl-10	A	14	99.7	47.9‡	91.4	20.3‡	95.4	**28.1‡**	89.1	57.2‡	77.7	0.6	0	0	0.1	0.1	1.3	7.3	0.2	5	0	0.7	7.1
		B	35	99.8	7.8	55.5	17.9	73.4	**2.2**	47.9	15.8	38.9	0.3	0.1	0	1	0.3	0.7	39.8	0.1	0.8	0	5.4	12.6
		C	22	96.6	14.3	81.4	21.5	89	**17.2**	77.1	29	75	0.6	3.2	0	0.1	0.7	0.9	16.8	0.1	0.2	0.1	0.5	2
2/3 系において移動可能：																								
2994	kl-3	A	35	78.3	59.2	98.9	5.8	92	**31**	70.1	53.2	50	0.7	0	0	0.2	1	5.1	0.1	14.2	0.6	0.1	0	28
		B	42	84.8	14.7	99.2	45	90.9	**24.2**	80.9	45.8	64.6	3.5	0.3	0.3	0.2	0	0.1	0.2	10.6	12.9	3	0	4.2
		C	33	26.3	-22.1	99.7	20.1	57.4	**-0.1**	25.5	-21.3	19.9	0.3	1.6	3.1	0	0	0.1	0	53.1	4.1	12	0.1	5.7
3041	kl-3	A	8	66.7	47.6	23.5	-69.6	66.6	**5.6**	0	-16.9	0	5.4	2.1	1.4	0	0	0	0	0	60.2	30.7	0.2	0.1
		B	29	75.6	5.5	99.6	45.4	92.2	**25.5**	71	35.9	46.3	0.1	0	0.3	0.2	0	3.8	0.1	14.5	0.1	0	0.1	34.6
		C	26	27.2	-21.2	99.9	20.3	54.4	**-3.1**	29	-17.8	20.9	0.8	1.9	4	0	0	0.1	0	44.3	4.8	18.5	0	4.6
3910	kl-10	A	20	99.6	47.8‡	57	-14.1‡	79.1	**11.8‡**	54.1	22.2‡	43.9	1.8	0	0	0	0.2	0.4	34.6	0.4	10.6	0	3.3	4.8
		B	41	99.6	7.6	39.7	2.1	66.9	**-4.3**	34	1.9	29.9	0.5	0.1	0	0.9	0.4	0.5	55.4	0.3	2	0	4.1	6
		C	52	99.3	17	81	21.1	89.5	**17.7**	78.7	30.6	73.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.7	0.7	17.4	0	0.1	0.1	0.9	5.9

| | | |

表 15：K-L 設計（総二重特異性）の LC-MS 対合データ及びポストプロテイン A 収率（mg/L）

設計[§]	クラスター	系*	ポスト pA 収率（mg/L A280）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																							
2901	kl-6	A	20	94.3	75.2	97.9	4.8	96.6	35.6	87	**70.2**	64.1	0.2	0.3	0.1	1.5	3.5	0.4	3.4	2.3	0.2	0.1	23.7
		B	18	85.7	15.6	94.6	40.4	88.8	22.1	79.2	**44.1**	48.2	1.6	0.3	0.3	0.2	0.2	2.2	7.7	29	5	0.4	4.7
		C	19	62.6	14.2	99.5	19.9	78.7	21.2	60.6	**13.8**	46.6	1.4	1.2	1.4	0	0.5	0	25.7	10	6.3	0.1	6.7
2979	kl-4	A	20	99.4	47.6‡	98.3	27.2‡	98.8	31.5‡	95.7	**63.8‡**	83.8	1.5	0	0.2	0.9	1	0	0.2	5.4	0	0	7.1
		B	30	98	6	77.3	39.7	86.7	15.5	72.4	**40.3**	63.7	0.2	0.1	0.8	0.1	0.8	22.1	0	1.2	0	1.2	9.6
		C	14	94.5	12.2	99.5	39.6	98.5	26.7	79.9	**31.8**	34.3	0	0.7	0	0.1	6	0.5	1.3	0	0	0.1	56.9
3008	kl-3	A	27	98.8	79.7	98.3	5.2	98.5	37.5	96.7	**79.8**	75.9	0	0.1	0.2	0.1	0.2	1.3	0.5	2.1	0.1	0.1	19.3
		B	26	98.3	28.2	98.8	44.6	98.4	31.7	93.2	**58.1**	57	2.1	0	0.2	0.1	0	0.1	1.4	35.8	0.3	0.1	2.7
		C	17	84.7	36.3	99.6	20	90.1	32.6	78.2	**31.4**	56.5	2.9	3.8	0.5	0	0.3	0.1	8.1	20.8	3.4	0	3.5
3018	kl-3	A	23	97.1	78	98.7	5.6	98	37	95.3	**78.4**	72.4	0	0	0.1	0.1	1	0.6	1.7	3.1	0.2	0.4	20.3
		B	33	96	25.9	98.6	44.4	96.5	29.8	77.9	**42.8**	33.9	7.1	0.1	0.2	0.1	0	0.2	1.8	52.9	2.1	0.1	1.4
		C	18	79.7	11.6	99.5	28.2	84.3	15.4	70	**18.1**	34.3	3.4	0.8	0.3	0	0	0.2	10.1	40.4	9.8	0	0.8
3102	kl-12	A	28	96.5	44.7‡	97.6	26.5‡	97.1	29.8‡	93.1	**61.2‡**	81.3	0.1	0	0.5	1.2	0.2	1.8	0	2.1	2.8	0	9.9
		B	33	96.6	4.6	92.8	55.2	94.4	23.2	86.9	**54.8**	74.7	0.2	0.1	1.3	0.1	0	7.4	0	0.1	0	0.3	13.7
		C	27	88.7	6.4	99.8	39.9	98.1	26.3	65.2	**17.1**	27.1	0.1	0.4	0	0.1	0	11	2.9	0	0.1	0	58.2

試料[5]	クラスター	系*	ポスト pA 収率 (mg/L A280)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	**野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																								
3109	kl-8	A	16	99.7	47.9‡	97.4	26.3‡	98.6	31.3‡	96.4	**64.5‡**	81.3	0.8	0.1	0	0.5	1.2	0.3	0	0.2	10.7	0	0.1	4.8
		B	35	99.1	29‡	97.1	42.9‡	98	31.3‡	94.1	**59‡**	78.4	0.3	0.1	0	0	0	1.1	2.8	0.6	0.2	0	0.2	16.2
		C	21	84	15.9‡	99.6	28.3‡	97.9	29‡	66.8	**18.7‡**	17.6	0.1	0.3	0.1	0.1	0	5.6	0	2.6	0.1	0.2	0.2	73.1
3113	kl-12	A	33	97	45.2‡	98.4	27.3‡	97.8	30.5‡	93.8	**61.9‡**	74.7	0.2	0	0	0.9	0	1.3	0.1	2.4	2.1	0	0	18.2
		B	43	98.9	6.9	90.9	53.3	94.3	23.1	85.6	**53.5**	72.8	0.3	0.2	0.1	0	0	1.7	9.5	0.4	1.1	0	0.4	13.4
		C	28	76.7	-5.6	99.6	39.7	95.2	23.4	64	**15.9**	28.3	0	0.6	0.1	0.2	0	7.8	0.3	7	0.1	0.6	0	55
3890	kl-9	A	29	99.8	48‡	87.5	16.4‡	93.3	26‡	85.1	**53.2‡**	70.7	1.7	0	0	0	0	1.2	9.2	0.1	5.4	0	1.9	9.5
		B	24	99.7	29.6‡	51.3	-2.9‡	73.7	7‡	47.7	**12.6‡**	41.4	1.1	0	0	0.2	0.1	0.4	43.4	0.1	2.7	0	4.2	6.4
		C	27	98.4	30.3	88.5	17.2	92.8	23.9	86.3	**34.4**	72.3	0.7	0.3	0.3	0	0.2	0.9	8.5	0.5	2.1	0	2	12.1
3898	kl-8	A	15	98.7	46.9‡	98.7	27.6‡	98.7	31.4‡	93.9	**62‡**	81.4	2.3	0	0	0.6	0	1	0	1.3	9.1	0	0	4.3
		B	21	97.3	5.3	74.5	36.9	85.9	14.7	71.1	**39**	68.7	0.5	0.3	1	0	0	0.8	25	0.2	1.1	0	0.2	2.1
		C	11	97.4	15.1	95.2	35.3	96.3	24.5	91.4	**43.3**	87.4	0.4	0.8	0	0	0.1	0.6	4.8	1.6	1	0.1	0	3.2
3910	kl-10	A	20	99.6	47.8‡	57	-14.1‡	79.1	11.8‡	54.1	**22.2‡**	43.9	1.8	0	0	0	0.2	0.4	34.6	0.4	10.6	0	3.3	4.8
		B	41	99.6	7.6	39.7	2.1	66.9	-4.3	34	**1.9**	29.9	0.5	0.1	0	0.9	0.4	0.5	55.4	0.3	2	0	4.1	6
		C	52	99.3	17	81	21.1	89.5	17.7	78.7	**30.6**	73.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.7	0.7	17.4	0	0.1	0.1	0.9	5.9
3947	kl-4	A	16	99.6	47.8‡	92.8	21.7‡	96.3	29‡	89.1	**57.2‡**	73.2	2.3	0	0	0.1	0.1	1.2	5	0.4	9.5	0	0.9	7.4
		B	24	98.8	28.7‡	70.3	16.1‡	81.7	15‡	66.1	**31‡**	53.4	0.2	0.3	0	0.3	0.5	1.9	23.6	0.6	0.7	0	5.5	13
		C	11	91.3	23.2	94.5	23.2	94	25.1	65.7	**13.8**	23.4	0.2	0.2	0.1	0	0.1	8	1.7	2	2.4	0.3	3.7	57.9

設計[§]	クラスター	系*	ポストpA収率（mgL A280）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	**野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																								
3951	kl-4	A	14	98.7	46.9‡	89.5	18.4‡	93.2	25.9‡	83.5	**51.6‡**	63.3	0.2	0	0.3	1.7	0	3	6.8	0.3	4.2	0	1.1	18.8
		B	23	99.8	29.7‡	77.5	23.3‡	85.6	18.9‡	72.8	**37.7‡**	52.5	0.1	0	0	0.1	0.2	1.5	17.7	0.1	0.9	0	5.3	21.6
		C	23	97.5	29.4	97.1	25.8	97.3	28.4	92.2	**40.3**	73.6	0	0.2	0	0	0	2.6	1.6	1.8	0.5	0	0.9	18.8
3954	kl-7	A	35	99.1	47.3‡	97.7	26.6‡	98.3	31‡	92.7	**60.8‡**	71.9	1	0	0	0.5	0	2.1	1.2	0.8	4.2	0	0.2	18
		B	38	98.4	28.3‡	61.8	7.6‡	88.6	21.9‡	46	**10.9‡**	27.3	12.9	0.1	0.1	0	0	0.1	17.6	1.1	36.6	0.4	1.4	2.2
		C	39	89	40.6	98.7	19.1	92.4	34.9	78.1	**31.3**	55.4	8.9	1.1	0.1	0	0	0.2	0.6	4.6	20.5	4.2	0.1	4.3
3957	kl-7	A	32	90.2	71.1	90.6	-2.5	90.4	29.5	78.8	**61.9**	66.8	0.6	0.1	0	0.1	0.1	0.4	7.9	8.6	8.9	0.7	0.4	5.3
		B	34	99	28.9	85.4	31.2	95.6	28.9	70.9	**35.8**	36.5	7.9	0.1	0.1	0.1	0	0	6.4	0.3	44.4	0.4	0.4	3.3
		C	41	87.2	38.8	99.7	20.1	90.8	33.3	75.5	**28.7**	45.7	8	0.9	0.2	0	0	0.2	0	5.5	31.2	5.8	0.1	2.4
3967	kl-9	A	12	100	42.6	99.9	20	99.9	29.3	97.2	**50.2**	68.3	1.8	0	0	0	0	0	0	0	21.8	0	0	7.9
		B	18	97.1	27‡	98.6	44.4‡	98	31.3‡	91.8	**56.7‡**	69.4	0.3	0.1	0	0	0.1	2	1.7	2.1	1.1	0	0	23.3
		C	14	96.7	28.6	100	28.7	98.6	29.7	95.2	**43.3**	80	0.8	1.3	0	0	0	0.7	0	1.3	0.6	0.2	0	15.3
3971	kl-2	A	27	98.9	79.8	99.1	6	99.1	38.1	87.4	**70.6**	45.6	0.2	0	0	0.1	0.3	5.1	0.7	0.1	0.2	0.2	0.1	47.4
		B	27	97.9	27.8	99.3	45.1	98.9	32.2	93.2	**58.1**	62.3	0	0	0.2	0.1	0	3	0.3	1	0.7	0	0.2	32.2
		C	30	89	40.6	99.8	20.2	92.5	35	82.6	**35.8**	54.2	3.9	0.7	0.2	0	0	0.1	0.1	6.5	28.4	3.6	0	2.3
3972	kl-2	A	25	99.9	48.1‡	99.5	28.4‡	99.7	32.4‡	96.9	**65‡**	79.4	1.2	0	0	0.1	0	0.9	0.2	0.1	12.1	0	0	6
		B	36	98.1	28‡	99.7	45.5‡	98.5	31.8‡	84	**48.9‡**	46.5	8.1	0.1	0.1	0	0	0.3	0.1	0.2	40	1.1	0	3.5
		C	38	92.8	44.4	99.8	20.2	95.2	37.7	81.3	**34.5**	57.4	5.7	1.1	0	0	0	0.2	0.1	6	25.2	1.1	0	3.1

設計§	クラスター	系*	ボスト pA 収率 (mgL A280)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化	H1L_H2L2 a 及び H1L2_H2L1	H1L_H1L1	H1L_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2	
3/3 系において移動可能：																								
3974	kl-1	A	22	91.8	72.7	94.7	1.6	93.5	32.5	83.7	**66.8**	62.3	0.4	4.4	0	0.3	0.4	1.9	2.8	2	4.1	0.3	1.1	20
		B	38	97.6	27.5	92.6	38.4	96.5	29.8	72.9	**37.8**	34	8.3	0.3	0.2	0.2	0	0	2.7	1	49.3	1.1	0.1	3
		C	36	59.9	11.5	99.8	20.2	71	13.5	49.5	**2.7**	31.4	5.6	4.5	1.8	0	0.1	1.4	0	20.1	19.7	14.9	0	1.9
3980†	kl-2	A	26	99.7	47.9‡	74.8	3.7‡	86.9	19.6‡	71.4	**39.5‡**	59	1.9	0.1	0	0.1	0.1	0.2	18.9	0.1	7.8	0.1	2.3	7.2
		B	37	99.8	29.7‡	82.6	28.4‡	95.1	28.4‡	69.6	**34.5‡**	39.6	8.3	0	0	0.1	0.1	0.2	8.6	0.1	40.2	0.1	0.3	2.4
		C	25	99.7	47.9‡	83	11.9‡	93.9	26.6‡	80.7	**48.8‡**	51.6	2.7	0	0.1	1.2	0.4	0.1	7.7	0.1	33	0.1	0.6	2.3
3987	kl-3	A	27	97.5	27.4‡	98.1	43.9‡	97.6	30.9‡	66.4	**31.3‡**	24.8	11.1	0.3	0.2	0	0	0.1	0.4	0.4	60.4	1.6	0	0.7
		B	21	99.2	50.8	99.3	19.7	99.2	41.7	78.9	**32.1**	37.4	9.2	0.4	0	0	0	0.1	0	0.2	51.8	0.3	0.1	0.4
		C	22	100	42.6	99.3	19.4	99.7	29.1	96.5	**49.5**	81.6	1.2	0	0	0	0	1	0.6	0	8.7	0	0	6.9
4008	kl-8	A	30	99.6	7.6	70.9	33.3	84.6	13.4	68.7	**36.6**	60.2	0.6	0	0.1	0.1	0.1	0.7	25.7	0.1	4.1	0	2.2	6.1
		B	26	99.6	17.3	98.3	38.4	98.9	27.1	96.8	**48.7**	85.5	0.1	0.3	0	0	0	0.7	1.7	0	1.3	0	0.1	10.3
		C	29	99.9	42.5	98.9	19	99.5	28.9	98.1	**51.1**	76.7	0.2	0	0	0.1	0.1	0.4	0.7	0	15.3	0	0	6.6
4010	kl-12	A	27	99.5	7.5	71.5	33.9	84.8	13.6	67.1	**35**	59.9	0.5	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	27.7	0.1	3	0	0.9	6.9
		C	23	99.3	17	98.6	38.7	98.9	27.1	96.7	**48.6**	83.6	0.2	0.4	0	0	0	0.8	1.4	0	0.8	0	0.1	12.6
4040	kl-8	A	29	99.8	48‡	97.7	26.6‡	98.7	31.4‡	94.6	**62.7‡**	85.8	1.2	0	0	0.9	0	2	0.7	0.1	3.7	0	0	5.5
		B	41	99.2	29.1‡	75.8	21.6‡	86	19.3‡	73.7	**38.6‡**	62.7	0.6	0	0	0.1	0.1	0.6	20.4	0.6	1.3	0	3.3	10.3
		C	19	98.7	30.6	98.6	27.3	98.7	29.8	81.8	**29.9**	51.2	1.2	0.1	0	0	0.3	8.2	1	0.5	0.5	0	0.3	36.7

設計[§]		クラスター		系*		ホスト pA 収率 (mg/L A280)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2	
3/3 系において移動可能：																										
4320	kI-10		A	14	99.7	47.9[‡]	91.4	20.3[‡]	95.4	28.1[‡]	89.1	**57.2[‡]**	77.7	0.6	0	0	0.1	0.1	1.3	7.3	0.2	5	0	0.7	7.1	
			B	35	99.8	7.8	55.5	17.9	73.4	2.2	47.9	**15.8**	38.9	0.3	0.1	0	1	0.3	0.7	39.8	0.1	0.8	0	5.4	12.6	
			C	22	96.6	14.3	81.4	21.5	89	17.2	77.1	**29**	75	0.6	3.2	0	0.1	0.7	0.9	16.8	0.1	0.2	0.1	0.5	2	
2/3 系において移動可能：																										
2892	kI-6		A	28	81.3	62.2	98.3	5.2	94.1	33.1	71.8	**54.9**	39.1	0.1	0.2	0.2	0.3	1	5	0.2	8.3	0.4	0.2	0.3	44.6	
			B	34	84.7	14.6	94.3	40.1	88.7	22	84.2	**49.1**	63.4	0.6	0.1	0.5	0.3	0.2	0.1	3.2	7	15.8	4.9	0.3	3.7	
			C	32	41.5	-6.9	99.6	20	69.9	12.4	41	**-5.8**	34.3	0.1	0.6	0.8	0	0	0.1	0.2	47.5	3.6	5.1	0	7.6	
2994	kI-3		A	35	78.3	59.2	98.9	5.8	92	31	70.1	**53.2**	50	0.7	0	0	0.2	1	5.1	0.1	14.2	0.6	0.1	0	28	
			B	42	84.8	14.7	99.2	45	90.9	24.2	80.9	**45.8**	64.6	3.5	0.3	0.3	0.2	0	0.1	0.2	10.6	12.9	3	0	4.2	
			C	33	26.3	-22.1	99.7	20.1	57.4	-0.1	25.5	**-21.3**	19.9	0.3	1.6	3.1	0	0	0.1	0	53.1	4.1	12	0.1	5.7	
3025	kI-2		A	35	83.6	64.5	99.1	6	93.9	33	72.7	**55.9**	54.9	0.1	0	0	0.1	0.4	8.9	0.4	10.7	0.1	0.1	0.1	24.1	
			B	30	80.2	10.1	87.9	33.7	85.5	18.8	71.4	**36.3**	44.9	0	0	0.1	0.1	0.1	2	3.6	12	0.6	0	6.4	30.1	
			C	37	43.9	-4.5	99.7	20.1	70.1	12.6	41.1	**-5.7**	40.4	1.8	1.4	2.3	0.1	0	0.2	0.1	52.1	0.6	0.7	0	0.3	
3122	kI-5		A	16	85.9	34.1[‡]	23.4	-47.7[‡]	85.8	18.5[‡]	0	**-31.9[‡]**	0	10.4	2.5	0.5	0	0	0	0.2	0	74	12.3	0	0	
			B	38	96.9	4.9	89.7	52.1	92.9	21.7	84.7	**52.6**	72.7	0.2	0.2	0.5	0.1	0	0.8	10.2	1	1.6	0.3	0.5	11.8	
			C	45	65.8	-16.5	99.8	39.9	91.1	19.3	61.5	**13.4**	32.6	0.1	0.4	0.5	0.1	0	3.4	0.2	15.9	0.2	0.1	0	46.7	

設計§	クラスター	系*	ホスト PA 収率 (mg/L A280)	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する %H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1"の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
2/3 系において移動可能：																								
3878	kl-8	A	21	99.7	47.9‡	89.7	18.6‡	94.6	27.3‡	87.6	**55.7‡**	78.1	0.6	0	0	0.2	0.3	1	8.7	0.2	4.7	0	0.6	5.5
		B	31	97.7	5.7	28.7	-8.9	71.8	0.6	24.2	**-7.9**	17.3	3.6	0.7	1	0.9	0.1	0.2	47.8	0.1	24.5	0	2	1.9
		C	30	99.3	17	67.4	7.5	88.2	16.4	61.3	**13.2**	42.6	6	0.6	0.1	0.2	0	0.2	19.7	0.1	27.3	0	1.4	1.9
3931	kl-7	A	30	92.2	73.1	94.9	1.8	93.6	32.6	83.9	**67.1**	70.7	0.5	0.2	0	0.2	1.7	1.5	3	6.5	7.2	0.4	0.1	8
		B	39	85.5	15.4	83.6	29.4	85	18.3	60.7	**25.6**	35.4	6.8	1.7	0.2	0.2	0	0	7.9	6	32.6	6.4	0.3	2.3
		C	40	57.1	8.7	99.5	19.9	68.6	11.1	45.7	**-1.1**	27.3	4.6	3.5	2.2	0	0	0	0.1	22	21.6	16.3	0.1	2.2
3997	kl-1	A	14	99.8	48‡	90.7	19.6‡	94.9	27.6‡	85.9	**54‡**	69	0.6	0	0.1	0.4	0	1.1	9.1	0.1	6.6	0	0	13
		B	25	98.8	28.7‡	53	-1.2‡	90.6	23.9‡	38	**2.9‡**	16	12.2	0.2	0.1	0	0	0	13.6	0	54	0.8	1.6	1.4
		C	6	96	27.9	99.9	28.6	96	27.1	2.9	**-49**	0.4	11.2	0.7	0.1	0	0	0	0.4	83.8	3.3	0	0.1	
4022	kl-11	A	10	70.4	18.6‡	90.4	19.3‡	80.6	13.3‡	62.9	**31‡**	57.3	1.3	0.2	0.1	1.5	0.8	0.4	4.8	24.7	2	1.9	0.6	4.5
		B	20	35.4	-34.7‡	90.4	36.2‡	61.3	-5.4‡	40.6	**5.5‡**	27	0.4	0.5	1.2	0.6	4.1	1.1	0.4	31.3	4.4	17.1	1.6	10.3
		C	21	10	-38.4	87.6	8	48	-9.5	7.7	**-39.1**	7	0.5	1	1.7	2.7	6	0.9	0.7	70.9	0.3	8.3	0	0.1
1/3 系において移動可能：																								
3041	kl-3	A	8	66.7	47.6	23.5	-69.6	66.6	5.6	0	**-16.9**	0	5.4	2.1	1.4	0	0	0	0	0	60.2	30.7	0.2	0.1
		B	29	75.6	5.5	99.6	45.4	92.2	25.5	71	**35.9**	46.3	0.1	0	0.3	0.2	0	3.8	0.1	14.5	0.1	0	0.1	34.6
		C	26	27.2	-21.2	99.9	20.3	54.4	-3.1	29	**-17.8**	20.9	0.8	1.9	4	0	0	0.1	0	44.3	4.8	18.5	0	4.6

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びベルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：CAT-2200 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）；系 C：CR8071 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）

** 完全 Ab 種のみを考慮する

§ 設計は、野生型に対する **H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の正の変化"**に基づいて、3/3（陰影無し）または 2/3（薄灰色）系における移動可能性に従って陰影を付ける

‡ 野生型に対して推定された変化

† 設計 3980 は、2 系においてのみ評価した

【０６０５】

表 16：K-K 由来 K-L 設計（総対合）の LC-MS 対合データ及びポスト pA 収率（mg/L）

設計[5]		プラスター	系*	ポスト pA 収率（mg/L A280）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化	H1L1_H2L2	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																									
34	kk-6		A	37	85.9	34.1‡	98.8	27.7‡	92.8	**25.5‡**	82.3	50.4‡	71.9	0	0.6	0.2	0	0.1	0.2	1.9	0.6	11.8	2.5	0.5	0.1	9.5
			B	56	94.6	24.5‡	93.8	39.6‡	94.1	**27.4‡**	90.1	55‡	73.3	0	0.1	0.1	0	0.1	0.1	2	1.6	4.1	0.4	0.1	2.8	15.4
			C	45	92.6	24.5	99.1	27.8	96.6	**27.7**	86.4	34.5	66.1	1	1.1	0	0	0.1	0.1	3.4	0.3	4.4	0	0.4	0.4	23
2826	kk-2		A	38	23.1	4	99.6	6.5	67.8	**6.8**	20.5	3.6	16.5	0.4	0.1	0	0.1	0.1	0.1	2.4	0	61	0.9	1.4	0	17
			B	44	53.7	-16.4	89.7	35.5	75.3	**8.6**	48.3	13.2	38.8	0	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	1.3	3.6	35.9	0.2	0.4	4	15.1
			C	28	27.8	-40.3	98	26.7	69.6	**0.7**	25.9	-26	20.4	0.2	0.7	1	0	0	0	1.3	0.2	55.1	0.4	0.4	1.1	19.3
2/3 系において移動可能：																									
2188	kk-10		A	19	28.5	9.4	98	4.9	69.8	**8.8**	27.3	10.4	22	0	0.1	0.1	0.2	0.6	3.5	0.3	53.6	0.4	2.1	0.5	16.6
			B	21	31	-39.1	92.9	38.7	54	**-12.7**	31.2	-3.9	21.1	0.4	0.9	1.8	0.1	0	0.1	3.1	40.3	6.6	20.9	0.9	3.7
			C	16	24.9	-23.5	99.5	19.9	66.2	**8.7**	24.6	-22.2	21.3	0.1	0.4	1.5	0	0	1	0.1	62.2	0.1	0.7	0.2	12.3
2816	kk-4		A	37	99.6	47.8‡	63.1	-8‡	72.1	**4.8‡**	58	26.1‡	32.2	0	0	0.1	1	1.8	3.6	16.8	0	0.1	0	17.5	26.8
			B	41	94.4	2.4	25.1	-12.5	55.6	**-15.6**	23.1	-9	19.5	0.4	1.4	1.7	1.3	0.2	0.2	59.7	0.2	0.9	0	10.6	3.8
			C	47	99.3	17	79.7	19.8	88.5	**16.7**	78.5	30.4	69.4	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.6	17.4	0.2	0.7	0	2.3	8.5
2827	kk-3		A	37	97.9	46.1‡	93.6	22.5‡	95.5	**28.2‡**	90.8	58.9‡	75	0.3	0	0	0.8	0	2.2	4	0.4	2.5	0.7	0.8	13.4
			B	43	98.9	6.9	22.3	-15.3	56	**-15.2**	19.1	-13	15.9	0.5	0.5	0.1	0.3	0.1	0.4	65.3	0.2	2.2	0	10.5	3.9
			C	41	98.2	15.9	85	25.1	88.5	**16.7**	76.2	28.1	44.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.8	5.2	7.3	0.2	0.1	0.2	6.9	34.6

【0606】

設計§	クラスター	系*	ポストpA収率（mg/L A280）	%H1L1対合	野生型に対する%H1L1対合の変化	%H2L2対合	野生型に対する%H2L2対合の変化	%H1L1及び%H2L2対合	野生型に対する%H1L1及び%H2L2対合の変化	H1L1_H2L2及びH1L2_H2L1**	野生型に対するH1L1_H2L2及びH1L2_H2L1**の変化	H1L1_H2L2及びH1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
2/3系において移動可能：																								
2830	kk-1	A	24	76.8	25‡	99.6	28.5‡	90.9	**23.6‡**	72.2	40.3‡	56.6	0.1	0.1	0	0.2	0.1	4.2	0	17.1	0.7	0.2	0	20.6
		B	23	83.8	13.7‡	98.5	44.3‡	88.7	**22‡**	74.7	39.6‡	49.7	3.7	1.5	1.4	0.1	0	0.2	0.7	9.2	26	4	0.1	3.4
		C	25	28	-20.4	99.6	20	46.5	**-11**	22	-24.8	12.8	0.7	3.7	5.7	0	0	0	0	35.2	11.8	28.3	0.1	1.7
1/3系において移動可能：																								
2798	kk-8	A	64	89.5	37.7‡	88	16.9‡	88.3	**21‡**	61.6	29.7‡	36.1	0	0	0	0.5	1.7	10.9	4.6	4.8	0.1	0	5.6	35.6
		B	54	94	2	37.8	0.2	61.4	**-9.8**	33.8	1.7	28	0.2	0.9	0.9	1.6	0.2	0.5	48.2	2.3	0.7	0	10.3	6.2
		C	51	97.6	15.3	34.5	-25.4	66.1	**-5.7**	32.4	-15.7	30.6	1.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	60	1.4	2.3	0.2	2.3	0.9

*系A：CAT-2200 H1/L1及びペルツズマブH2/L2（H1：H2：L1：L2 DNAが、10：20：24：46の比で）；系B：CAT-2200 H1/L1及びSGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNAが、15：15：35：35の比で）；系C：CR8071 H1/L1及びSGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNAが、15：15：35：35の比で）

** 完全Ab種のみを考慮する

§ 設計は、**野生型に対する%H1L1及び%H2L2対合の正の変化**に基づいて、3/3（陰影無し）、2/3、または1/3系におけるそれらの移動可能性に従って灰色で陰影を付ける

‡ 野生型に対して推定された変化

表 17：K-K 由来 K-L 設計（総二重特異性）の LC-MS 対合データ及びポスト pA 収率（mg/L）

設計[§]		プラスミド		系*	ポスト pA 収率（mg/L A280）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1_H2L2 及び%H1L2_H2L1** 対合	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
3/3 系において移動可能：																								
34	kk-6		A		37	85.9	34.1‡	98.8	27.7‡	92.8	25.5‡	82.3	**50.4‡**	71.9	0.6	0.2	0	0.1	0.2	1.9	0.6	11.8	2.5	0.5	0.1	9.5
			B		56	94.6	24.5‡	93.8	39.6‡	94.1	27.4‡	90.1	**55‡**	73.3	0.1	0.1	0	0.1	0.1	2	1.6	4.1	0.4	0.1	2.8	15.4
			C		45	92.6	24.5	99.1	27.8	96.6	27.7	86.4	**34.5**	66.1	1	1.1	0	0	0.1	3.4	0.3	4.4	0	0	0.4	23
2/3 系において移動可能：																								
2798	kk-8		A		64	89.5	37.7‡	88	16.9‡	88.3	21‡	61.6	**29.7‡**	36.1	0	0	0	0.5	1.7	10.9	4.6	4.8	0.1	0	5.6	35.6
			B		54	94	2	37.8	0.2	61.4	-9.8	33.8	**1.7**	28	0.2	0.9	0.9	1.6	0.2	0.5	48.2	2.3	0.7	0	10.3	6.2
			C		51	97.6	15.3	34.5	-25.4	66.1	-5.7	32.4	**-15.7**	30.6	1.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	60	1.4	2.3	0.2	2.3	0.9
2816	kk-4		A		37	99.6	47.8‡	63.1	-8‡	72.1	4.8‡	58	**26.1‡**	32.2	0	0	0.1	1	1.8	3.6	16.8	0	0.1	0	17.5	26.8
			B		41	94.4	2.4	25.1	-12.5	55.6	-15.6	23.1	**-9**	19.5	0.4	1.4	1.7	1.3	0.2	0.2	59.7	0.2	0.9	0	10.6	3.8
			C		47	99.3	17	79.7	19.8	88.5	16.7	78.5	**30.4**	69.4	0.2	0.3	0	0.1	0.2	0.6	17.4	0.2	0.7	0	2.3	8.5
2826	kk-2		A		38	23.1	4	99.6	6.5	67.8	6.8	20.5	**3.6**	16.5	0.4	0.1	0	0.1	0.1	2.4	0	61	0.9	1.4	0	17
			B		44	53.7	-16.4	89.7	35.5	75.3	8.6	48.3	**13.2**	38.8	0	0.1	0.1	0.4	0.2	1.3	3.6	35.9	0.2	0.4	4	15.1
			C		28	27.8	-40.3	98	26.7	69.6	0.7	25.9	**-26**	20.4	0.2	0.7	1	0	0	1.3	0.2	55.1	0.4	0.4	1.1	19.3
2827	kk-3		A		37	97.9	46.1‡	93.6	22.5‡	95.5	28.2‡	90.8	**58.9‡**	75	0.3	0	0	0.8	0	2.2	4	0.4	2.5	0.7	0.8	13.4
			B		43	98.9	6.9	22.3	-15.3	56	-15.2	19.1	**-13**	15.9	0.5	0.5	0.1	0.3	0.1	0.4	65.3	0.2	2.2	0	10.5	3.9
			C		41	98.2	15.9	85	25.1	88.5	16.7	76.2	**28.1**	44.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.8	5.2	7.3	0.2	0.1	0.2	6.9	34.6

【0607】

設計§	クラスター	系*	ポスト pA 収率（mg/L A280）	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**	野生型に対する **H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1**の変化**	H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H1L2_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H2L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
2/3 系において移動可能：																								
2830	kk-1	A	24	76.8	25‡	99.6	28.5‡	90.9	23.6‡	72.2	**40.3‡**	56.6	0.1	0.1	0	0.2	0.1	4.2	0	17.1	0.7	0.2	0	20.6
		B	23	83.8	13.7‡	98.5	44.3‡	88.7	22‡	74.7	**39.6‡**	49.7	3.7	1.5	1.4	0.1	0	0.2	0.7	9.2	26	4	0.1	3.4
		C	25	28	-20.4	99.6	20	46.5	-11	22	**-24.8**	12.8	0.7	3.7	5.7	0	0	0	0	35.2	11.8	28.3	0.1	1.7
1/3 系において移動可能：																								
2188	kk-10	A	19	28.5	9.4	98	4.9	69.8	8.8	27.3	**10.4**	22	0	0.1	0.1	0.2	0.6	3.5	0.3	53.6	0.4	2.1	0.5	16.6
		B	21	31	-39.1	92.9	38.7	54	-12.7	31.2	**-3.9**	21.1	0.4	0.9	1.8	0.1	0	0.1	3.1	40.3	6.6	20.9	0.9	3.7
		C	16	24.9	-23.5	99.5	19.9	66.2	8.7	24.6	**-22.2**	21.3	0.1	0.4	1.5	0	0	1	0.1	62.2	0.1	0.7	0.2	12.3

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びペルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：CAT-2200 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）；系 C：CR8071 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）

** 完全 Ab 種のみを考慮する

§ 設計は、**野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1 の正の変化**に基づいて、3/3（陰影無し）、2/3、または 1/3 系におけるそれらの移動可能性に従って灰色で陰影を付ける

‡ 野生型に対して推定された変化

表 18：３つの系における選択された設計のポスト分取 SEC LC-MS 対合データ

設計	クラスター	系*	%H1L1 対合	野生型に対する%H1L1 対合の変化	%H2L2 対合	野生型に対する%H2L2 対合の変化	%H1L1 及び%H2L2 対合	野生型に対する%H1L1 及び%H2L2 対合の変化	及び H1L1_H2L2**	野生型に対する H1L1_H2L2 及び H1L2_H2L1"の変化	H1L1_H1L2 及び H1L2_H2L1	H1L1_H1L1	H1L1_H1L2	H2L1_H2L1	H2L1_H2L2	H1L2_H2L2	H1L1_H2L1	H1L2_H2L2	H1L1	H1L2	H2L1	H2L2
2901	kl-6	A	95.4	76.3	98.6	5.5	97.3	36.3	90.8	73.9	74.1	0	0.1	0.1	1.2	2.3	0.2	3.5	2.7	0.1	0	15.5
		B	88.1	18	95.7	41.5	92.1	25.4	84.7	49.6	76.1	0.3	0.3	0.2	0	0	2.8	9.8	2.3	0.5	0.6	6.9
		C	63.3	14.9	99.8	20.2	81.9	24.4	62.9	16.1	56.5	0.3	1	0	0	0	0	30.9	2	1.1	0	7.1
3972	kl-2	A	100	48.2‡	98.4	27.3‡	99.2	31.9‡	98.7	66.8‡	86.5	0.2	0	0.8	0.1	0.1	0	0	0	0	0	6.5
		B	99.2	29.1‡	97.7	43.5‡	98.5	31.8‡	92.7	57.6‡	83.7	4.9	0.1	0	0.1	0	0	0.6	3.3	0	0.6	5.7
		C	92.3	43.9	99.9	20.3	96.1	38.6	88.5	41.7	82.3	3.2	1	0.1	0	0	0	6.2	1.7	0.2	0	5.2

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びベルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：CAT-2200 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）；系 C：CR8071 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）

** 完全 Ab 種のみを考慮する

‡ 野生型に対して推定された変化

【０６０８】

【0609】

表 19：OAA 形式における野生型パラトープの抗原結合データ

弾頭	タグ	抗原	計数	中央値 KD（nM）	平均 KD（nM）	標準偏差（nM）
CAT-2200	タグ無し	IL-17A	6	0.282	0.287	0.040
CAT-2200	/FLAG	IL-17A	6	0.375	0.366	0.063
CAT-2200	/HA	IL-17A	6	0.373	0.350	0.061
CR8071	タグ無し	HEMAGGLUTININ	3	0.385	0.379	0.013
CR8071	/FLAG	HEMAGGLUTININ	3	0.332	0.332	0.007
ペルツズマブ	/FLAG	HER2	1	7.010		NA
ペルツズマブ	タグ無し	HER2	1	3.710		NA
SGN-CD19a	タグ無し	CD19	2	67.535		6.951
SGN-CD19a*	タグ無し	CD19	1	71.280		NA
SGN-CD19a*	/HA	CD19	1	137.000		NA
SGN-CD19a	/HA	CD19	2	150.100		1.273
SGN-CD19a	/FLAG	CD19	2	224.550		22.981
SGN-CD19a*	/FLAG	CD19	1	321.500		NA

*は、異なる捕捉法を示す

表 20：選択された K-L 設計の抗原結合親和性及び熱安定性評価

設計§	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1 Fab（℃）††	Tm H2L2 Fab（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
2979	kl-4	A	0.31	-0.03	3.06	0.08	70.4	74.0	-0.4
		B	0.39	-0.14	148.80	0.18	70.1	91.4	
		C	0.93	-0.38	45.06	0.70	68.5	91.5	
3018	kl-3	A	0.53	-0.16	2.89	0.11	69.9	74.3	-1.4
		B	0.35	0.03	47.97	0.15	69.5	88.8	
		C	0.16	0.39	93.89	-0.14	67.1	89.2	
3041	kl-3	A	ND†	ND	ND	ND	ND	ND	-0.5
		B	0.42	-0.06	MVB‡、62.0**	MVB、0.11**	69.6	91.7	
		C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3102	kl-12	A	0.37	-0.12	3.14	0.07	71.1	71.1	-1.0
		B	0.41	-0.16	215.20	0.17	70.4	91.8	
		C	0.87	-0.35	MVB	MVB	67.8	91.7	
3898	kl-8	A	0.33	-0.06	2.87	0.11	72.2	74.0	-0.4
		B	0.44	-0.19	188.10	0.23	71.6	89.6	
		C	0.50	-0.12	220.60	0.16	68.3	89.8	
3947	kl-4	A	0.31	-0.04	3.28	0.05	70.9	73.1	-1.4
		B	0.36	-0.10	MVB、65.4**	MVB、0.09**	70.4	88.0	
		C	1.14	-0.47	MVB、65.4**	MVB、0.09**	68.3	87.8	
3025	kl-2	A	0.47	-0.10	3.28	0.05	70.6	72.1	-2.6
		B	0.45	-0.08	MVB	MVB	69.4	83.8	
		C	0.68	-0.31	61.05	0.07	68.9	84.4	

設計[§]	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1 Fab（℃）††	Tm H2L2 Fab（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
3109	kl-8	A	0.37	-0.12	2.96	0.10	71.6	71.6	-3.0
		B	0.47	-0.22	MVB、140**	MVB、0.06**	70.5	83.5	
		C	1.50	-0.59	MVB、140**	MVB、0.06**	67.4	83.7	
3113	kl-12	A	0.39	-0.14	3.05	0.09	70.6	70.6	-1.6
		B	0.44	-0.20	216.00	0.02	70.0	91.7	
		C	0.99	-0.41	MVB	MVB	66.8	91.6	
3878	kl-8	A	0.36	-0.10	3.03	0.09	73.5	73.5	-1.6
		B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		C	0.32	0.08	306.30	-0.14	68.3	83.9	
3890	kl-9	A	0.44	-0.19	2.80	0.12	73.2	73.2	-1.9
		B	0.44	-0.19	54.83	0.09	71.4	83.7	
		C	0.44	-0.06	40.94	0.22	68.5	84.3	
3910	kl-10	A	0.37	-0.11	2.88	0.11	71.3	71.3	-2.7
		B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		C	0.47	-0.09	294.00	-0.12	68.2	83.9	
3931	kl-7	A	0.44	-0.07	2.90	0.11	69.7	73.7	-1.6
		B	0.29	0.11	54.93	0.09	69.5	87.2	
		C	0.45	-0.13	64.37	0.04	68.6	87.1	
3954	kl-7	A	0.34	-0.09	3.10	0.08	71.8	72.9	-2.2
		B	0.26	0.04	76.38	-0.03	70.6	83.6	
		C	0.30	0.04	70.76	0.00	68.4	84.8	

設計§	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差 野生型	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1 Fab（℃）††	Tm H2L2 Fab（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
3967	kl-9	A	0.37	-0.11	5.29	0.12	70.0	70.0	-2.9
		B	0.38	-0.13	36.12	0.27	69.8	86.1	
		C	0.52	-0.13	43.33	0.19	68.0	86.6	
4010	kl-12	A	0.42	-0.17	5.41	0.11	71.4	71.4	-2.9
		B	0.36	-0.11	131.70	0.23	70.3	83.2	
		C	0.49	-0.10	227.50	-0.01	68.2	84.1	
4040	kl-8	A	0.33	-0.06	2.30	0.21	71.5	72.5	-2.0
		B	0.31	-0.04	16.97、22.4**	0.62、0.55**	70.7	84.0	
		C	0.66	-0.24	3.53、22.4**	1.30、0.55**	69.1	86.2	
2892	kl-6	A	0.65	-0.24	3.24	0.06	67.7	74.8	-3.6
		B	0.53	-0.15	49.74	0.13	65.8	84.1	
		C	0.95	-0.46	39.69	0.25	65.6	84.3	
2901	kl-6	A	0.54	-0.16	3.12	0.08	67.1	71.5	-3.4
		B	0.52	-0.14	47.05	0.16	66.2	88.1	
		C	0.64	-0.29	41.91	0.21	66.1	87.6	
2994	kl-3	A	0.45	-0.08	3.20	0.06	69.0	73.5	-4.3
		B	0.28	0.12	49.69	0.16	68.3	83.7	
		C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3008	kl-3	A	0.35	0.02	3.10	0.08	69.4	69.4	-4.0
		B	0.31	0.08	41.12	0.21	68.8	83.7	
		C	0.47	-0.15	48.01	0.15	67.5	83.9	

設計[§]	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1 Fab（℃）††	Tm H2L2 Fab（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
3122	kl-5	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-4.1
		B	0.43	-0.19	195.60	0.06	69.9	80.1	
		C	0.84	-0.34	MVB	MVB	67.0	79.8	
3951	kl-4	A	0.36	-0.11	2.98	0.10	69.9	69.9	-3.4
		B	0.34	-0.08	42.33	0.20	69.7	84.2	
		C	0.55	-0.16	38.35	0.24	68.1	84.3	
3957	kl-7	A	0.37	0.00	2.83	0.12	69.4	69.4	-3.8
		B	0.24	0.19	54.58	0.09	69.0	82.8	
		C	0.32	0.02	56.65	0.08	68.4	83.8	
3971	kl-2	A	0.47	-0.10	3.02	0.09	70.8	70.8	-4.4
		B	0.47	-0.10	37.65	0.25	70.1	78.8	
		C	0.40	-0.08	53.08	0.10	68.5	78.3	
3972	kl-2	A	0.32	-0.05	3.11	0.08	71.9	71.9	-3.3
		B	0.29	-0.02	53.63	0.12	70.9	80.2	
		C	0.38	-0.06	30.18	0.37	68.6	80.6	
3974	kl-1	A	0.46	-0.09	2.92	0.10	70.9	70.9	-3.9
		B	0.27	0.13	50.95	0.12	69.9	81.6	
		C	0.44	-0.12	62.40	0.03	67.5	81.0	
3980	kl-2	A	0.32	-0.05	2.82	0.12	71.1	71.1	-4.9
		B	0.25	0.05	55.39	0.08	70.9	82.0	
		C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

【０６１０】

設計§	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1 Fab（℃）††	Tm H2L2 Fab（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
3987	kl-3	A	0.30	-0.02	3.22	0.06	70.9	70.9	-3.9
		B	0.23	0.08	48.45	0.17	70.6	80.1	
		C	0.23	0.16	63.74	0.05	68.4	80.3	
3997	kl-1	A	0.33	-0.07	2.95	0.10	69.7	69.7	-4.2
		B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
4008	kl-8	A	0.43	-0.18	5.57	0.10	70.7	70.7	-3.2
		B	0.39	-0.14	217.50	0.01	69.8	83.5	
		C	0.48	-0.09	272.90	-0.09	68.0	84.6	
4320	kl-10	A	0.36	-0.10	2.90	0.11	69.9	69.9	-3.5
		B	0.38	-0.13	306.70	-0.14	69.9	83.3	
		C	0.49	-0.11	257.90	-0.06	67.9	84.2	

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びペルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：CAT-2200 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）；系 C：CR8071 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）

§ 設計は、0～-1.5、-1.5～-3.0、及び-3 未満の「野生型からの Fab Tm の平均差（℃）」で３つのビンにグループ分けし、陰影を付ける。

†ND = 未決定

‡MVB = SMCA 形式における混合原子価結合

** OAA 形式で決定された KD

††抗体の DSC は、SMCA 形式で行い、各 Fab アームに起因する熱転移を与える。

‡‡野生型 Fab Tm は、Mab 形式における DSC 実験から得られた。

【０６１１】

表 21：選択された K-K 由来 K-L 設計の抗原結合親和性及び熱安定性評価

設計§	クラスター	系*	H1L1 KD（nM）	野生型からの H1L1 log（KD）の差	H2L2 KD（nM）	野生型からの H2L2 log（KD）の差	Tm H1L1（℃）††	Tm H2L2（℃）††	野生型からの Fab Tm（系にわたる）の平均差（℃）‡‡
34	kk-6	A	0.63	-0.35	2.63	0.15	69.6	72.9	-1.5
		B	0.63	-0.35	17.07	0.60	68.3	90.3	
		C	0.66	-0.23	24.18	0.44	67.2	90.9	
2827	kk-3	A	0.38	-0.13	2.93	0.10	72.0	73.1	-1.2
		B	NDŤ	ND	ND	ND	ND	ND	
		C	0.72	-0.27	111.90	0.30	68.8	86.9	
2816	kk-4	A	0.51	-0.26	3.08	0.08	72.5	72.5	-2.3
		B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		C	0.42	-0.04	281.40	0.06	68.2	83.3	
2830	kk-1	A	0.45	-0.20	3.08	0.08	70.1	73.7	-3.7
		B	0.32	-0.06	50.84	0.15	69.3	84.3	
		C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

*系 A：CAT-2200 H1/L1 及びベルツズマブ H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、10：20：24：46 の比で）；系 B：CAT-2200 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）；系 C：CR8071 H1/L1 及び SGN-CD19a H2/L2（H1：H2：L1：L2 DNA が、15：15：35：35 の比で）

§ 設計は、0～-1.5、-1.5～-3.0、及び-3 未満の「野生型からの Fab Tm の平均差（℃）」で 3 つのビンにグループ分けし、陰影を付ける。

†ND＝未決定

††抗体の DSC は、SMCA 形式で行い、各 Fab アームに起因する熱転移を与える。

‡‡野生型 Fab Tm は、Mab 形式における DSC 実験から得られた。

表 22A：IMGT、Kabat、1JPT、及びEU番号付けシステムに従ったIgG1重鎖アミノ酸残基番号付け

IMGT	Kabat	1JPT	EU
1044	39	39	適用不可
1050	45	45	適用不可
3005	122	126	126
3007	124	128	128
3008	125	129	129
3020	139	141	141
3024	143	145	145
3026	145	147	147
3027	146	148	148
3081	174	170	170
3084	177	173	173
3084B	179	175	175
3085Y	186	181	181
3086	188	183	183
3088	190	185	185
4003	228	218	218

【０６１２】

表 22B：IMGT、及び Kabat 番号付けシステムに従ったラムダ軽鎖アミノ酸残基番号付け

IMGT	Kabat
1044	38
3005	116
3011	122
3013	124
3018	129
3020	131
3022	133
3024	135
3086	176
3088	178
3090	180

【０６１３】

表 22C：IMGT、Kabat、及び 1JPT 番号付けシステムに従ったカッパ軽鎖アミノ酸残基番号付け

IMGT	Kabat	1JPT
1044	38	38
1050	44	44
3005	116	116
3010	121	121
3013	124	124
3018	129	129
3020	131	131
3022	133	133
3024	135	135
3079	160	160
3086	176	176
3088	178	178
3090	180	180

表 23：%対合/%誤対合種及び LCCA スカラー値の対応表

対合種（%）	誤対合種（%）	lcca_スカラー
99	1	4.60
98	2	3.89
97	3	3.48
96	4	3.18
95	5	2.94
94	6	2.75
93	7	2.59
92	8	2.44
91	9	2.31
90	10	2.20
89	11	2.09
88	12	1.99
87	13	1.90
86	14	1.82
85	15	1.73
84	16	1.66
83	17	1.59
82	18	1.52
81	19	1.45
80	20	1.39
79	21	1.32
78	22	1.27
77	23	1.21
76	24	1.15
75	25	1.10
74	26	1.05
73	27	0.99
72	28	0.94
71	29	0.90
70	30	0.85
69	31	0.80
68	32	0.75
67	33	0.71
66	34	0.66
65	35	0.62
64	36	0.58
63	37	0.53
62	38	0.49
61	39	0.45
60	40	0.41
59	41	0.36
58	42	0.32
57	43	0.28
56	44	0.24
55	45	0.20
54	46	0.16
53	47	0.12
52	48	0.08
51	49	0.04
50	50	0.00

対合種（%）	誤対合種（%）	lcca_スカラー
49	51	-0.04
48	52	-0.08
47	53	-0.12
46	54	-0.16
45	55	-0.20
44	56	-0.24
43	57	-0.28
42	58	-0.32
41	59	-0.36
40	60	-0.41
39	61	-0.45
38	62	-0.49
37	63	-0.53
36	64	-0.58
35	65	-0.62
34	66	-0.66
33	67	-0.71
32	68	-0.75
31	69	-0.80
30	70	-0.85
29	71	-0.90
28	72	-0.94
27	73	-0.99
26	74	-1.05
25	75	-1.10
24	76	-1.15
23	77	-1.21
22	78	-1.27
21	79	-1.32
20	80	-1.39
19	81	-1.45
18	82	-1.52
17	83	-1.59
16	84	-1.66
15	85	-1.73
14	86	-1.82
13	87	-1.90
12	88	-1.99
11	89	-2.09
10	90	-2.20
9	91	-2.31
8	92	-2.44
7	93	-2.59
6	94	-2.75
5	95	-2.94
4	96	-3.18
3	97	-3.48
2	98	-3.89
1	99	-4.60

【０６１４】

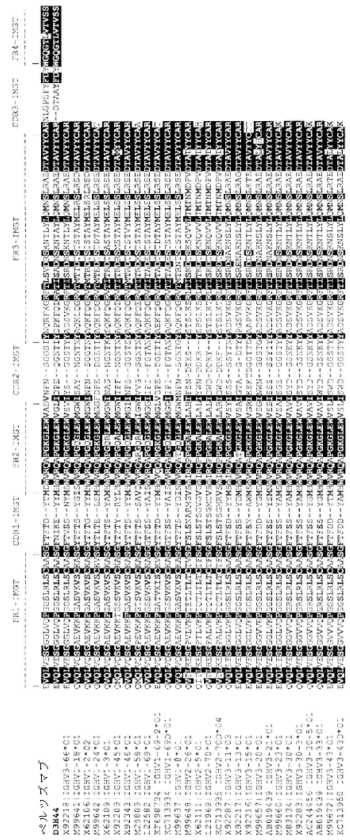
表 24：SMCA 設計番号及び対応する LCCA セット固有識別子

SMCA 設計 ID	LCCA 固有識別子
34	10681-10741
2188	10640-10713
2798	10621-10733
2816	10665-10724
2826	10652-10734
2827	10685-10726
2830	10657-10760
2892	10808-11308
2901	10814-11233
2979	11100-11205
2994	10983-11306
3008	10987-11257
3018	10931-11263
3025	10945-11377
3041	10947-11392
3102	11034-11204
3109	11026-11270
3113	11065-11206
3122	11066-11181
3878	12938-13469
3890	13194-13427
3898	13316-13451
3910	13238-13463
3931	12878-11240
3947	13335-13361
3951	13209-13364
3954	13167-13514
3957	13263-13493
3967	13208-13455
3971	13282-13484
3972	13218-13482
3974	13175-13486
3980	13287-13494
3987	13221-13411
3997	13180-13515
4008	13226-13434
4010	13227-13383
4022	13306-13375
4040	13320-13370
4320*	13304-13466

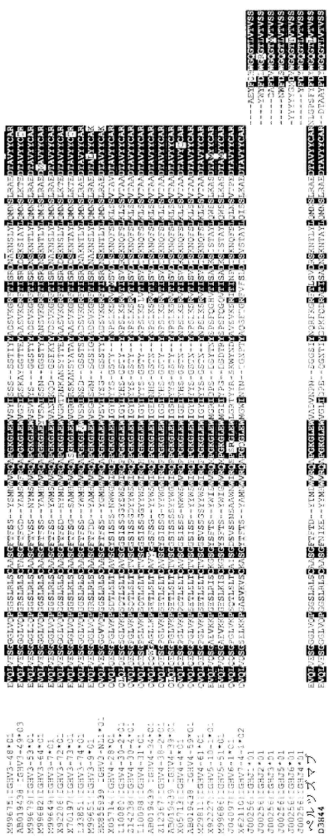
*設計は、L2 中の Q124 位を Q124K として試験した以外は、LCCA 設計 13304-13466 と同一であった。

【図面】

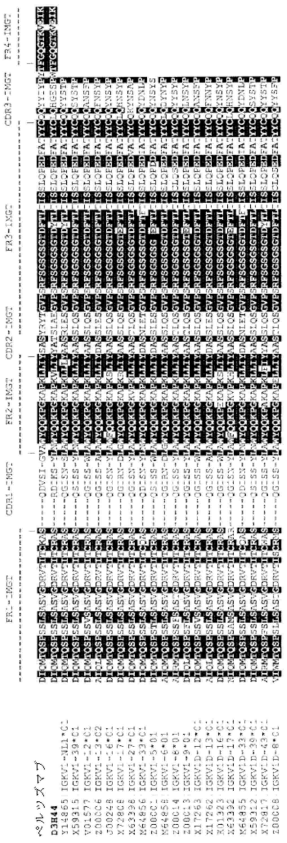
【図１Ａ】



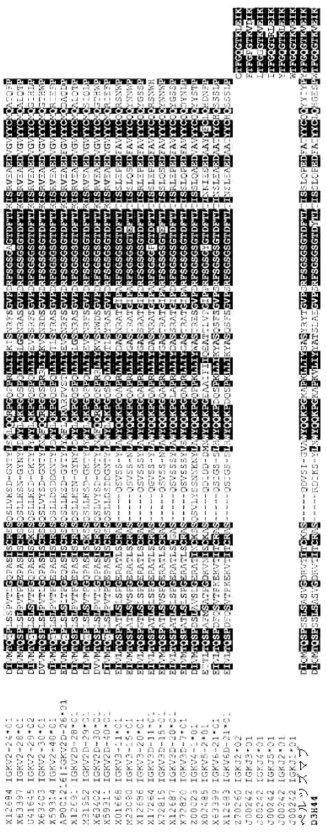
【図１Ａ－２】



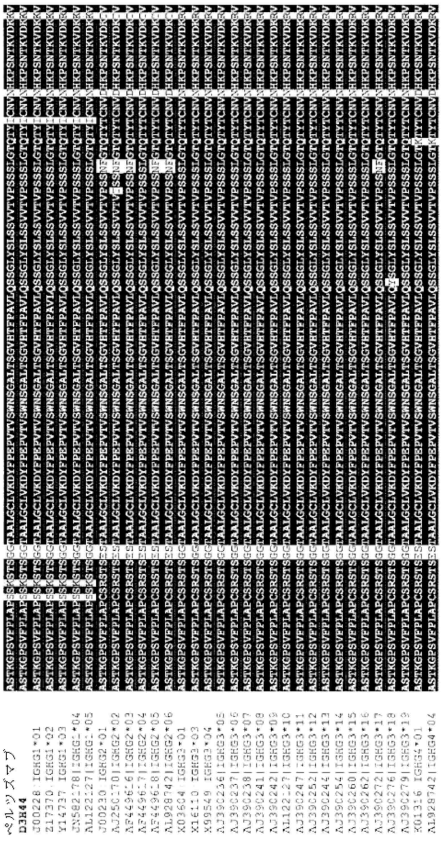
【図１Ｂ】



【図１Ｂ－２】



【図１Ｃ】



【図１Ｄ】



【図１Ｅ】

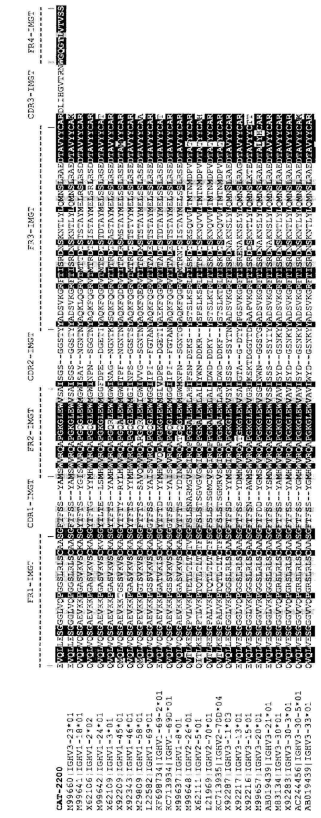


FIG. 1E

【図１Ｅ－２】

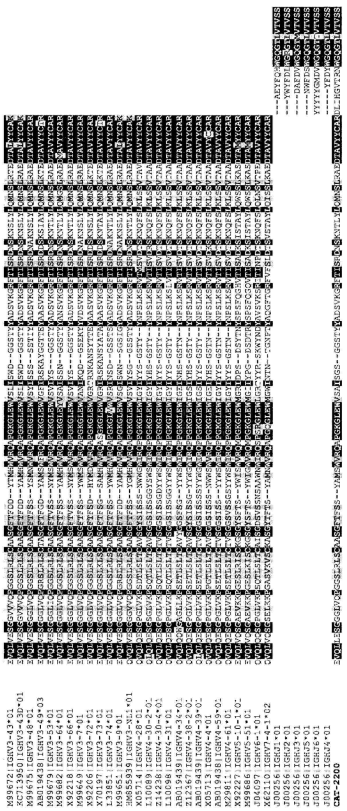


FIG. 1E (Cont'd)

【図１Ｆ】

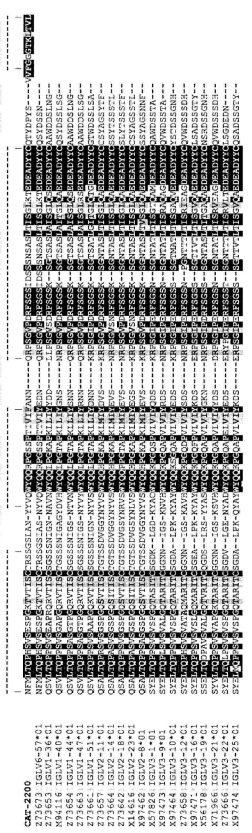


FIG. 1F

【図１Ｆ－２】

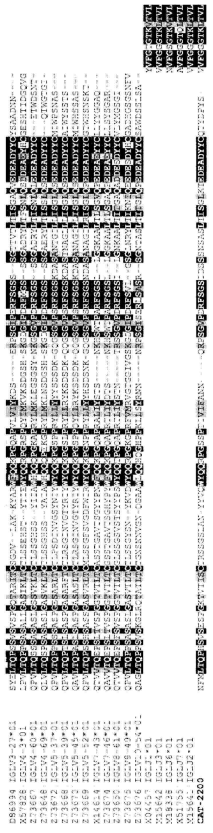


FIG. 1F Cont'd

【図１Ｇ】

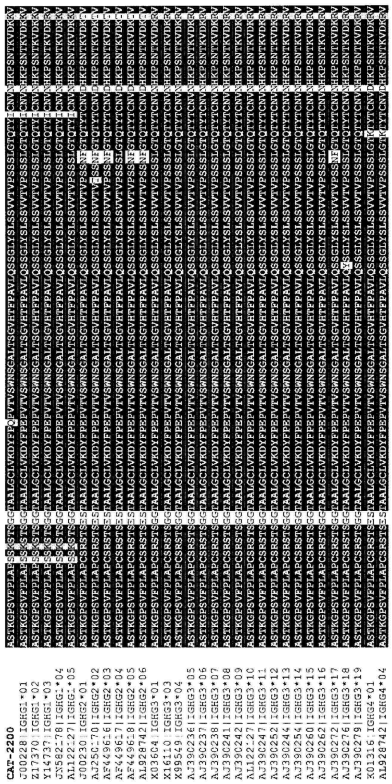


FIG. 1G

【図１Ｈ】

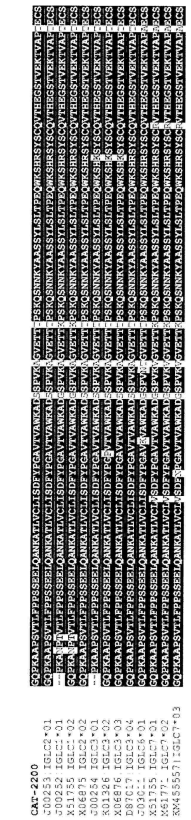
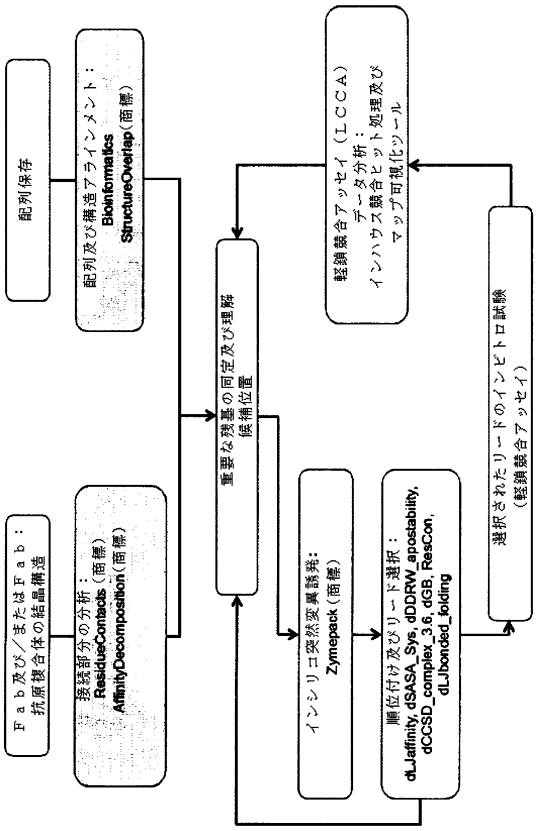


FIG. 1H

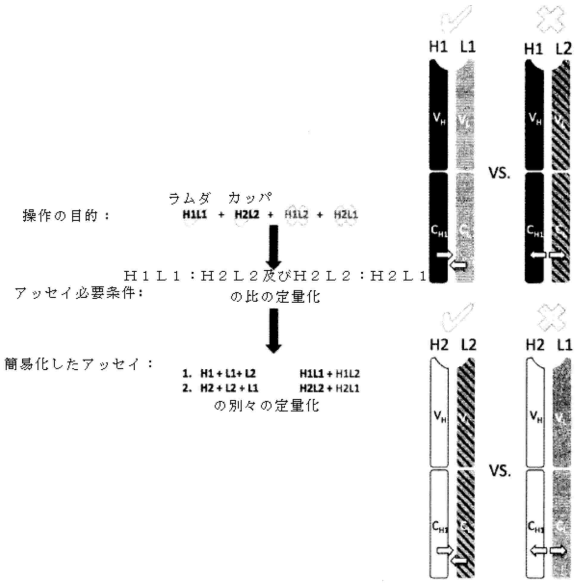
【図２】


配列保存
配列及び構造アラインメント：
BioinformaticsStructureOverlap（商標）
Ｆａｂ及び／またはＦａｂ：
抗原複合体の結晶構造
接続部分の分析：
ResidueContacts（商標）
AffinityDecomposition（商標）
重要な残基の同定及び理解
候補位置
インシリコ突然変異誘発：
Zymepack（商標）
順位付け及びリード選択：
dLJaffinity, dSASA_Sys, dDDRW_apostability,
dCCSD_complex_3.6, dGB, ResCon,
dLJbonded_folding
軽鎖競合アッセイ（ＬＣＣＡ）
データ分析：
インハウス競合ヒット処理及び
マップ可視化ツール
選択されたリードのインビトロ試験
（軽鎖競合アッセイ）

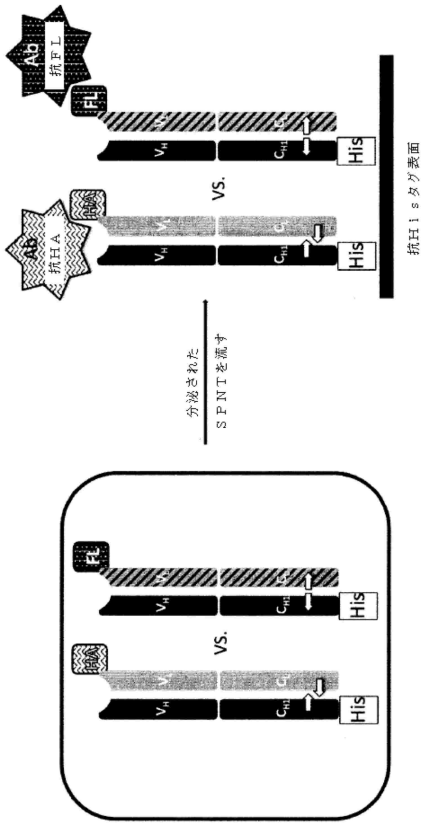
【図３】


B
A
D3H44 C-カッパ
CAT-2200 C-ラムダ
D3H44 CH1
CAT-2200 CH1

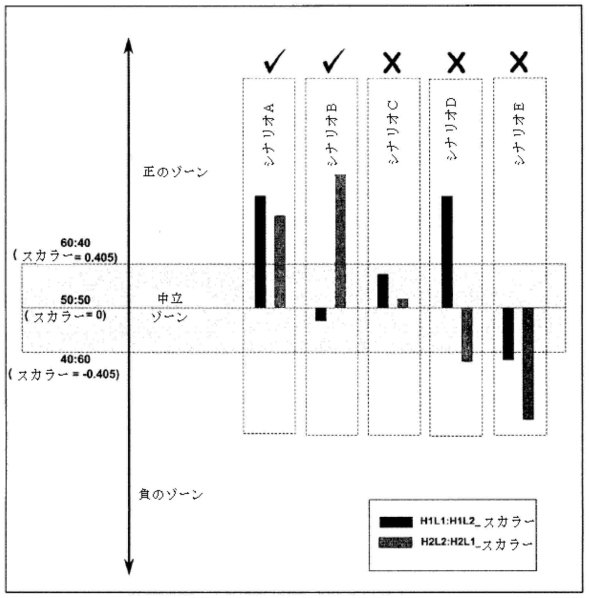
【図４】


操作の目的：
ラムダ カッパ
H1L1 + H2L2 + H1L2 + H2L1
アッセイ必要条件：
H１Ｌ１：Ｈ２Ｌ２及びＨ２Ｌ２：Ｈ２Ｌ１
の比の定量化
簡易化したアッセイ：
1. H1 + L1+ L2 H1L1 + H1L2
2. H2 + L2 + L1 H2L2 + H2L1
の別々の定量化
H1 L1
H1 L2
H2 L2
H2 L1
VS.

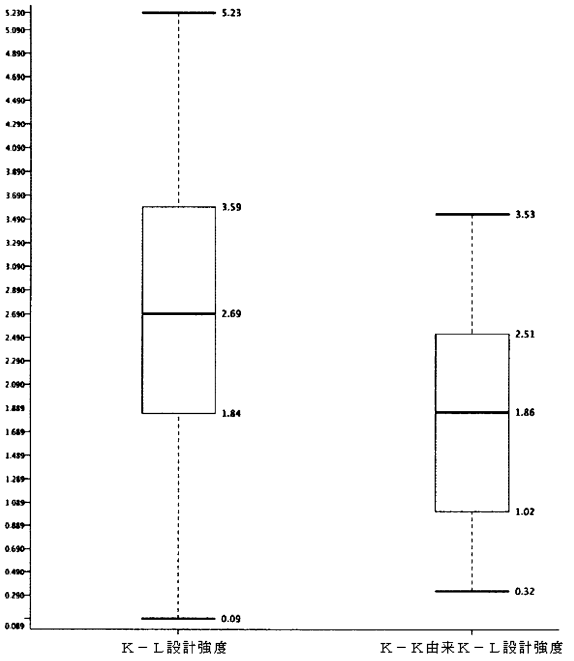
【図５】


抗ＦＬ
抗ＨＡ
His
VS.
分泌されたＳＰＮＴを流す
抗Ｈｉｓタグ表面

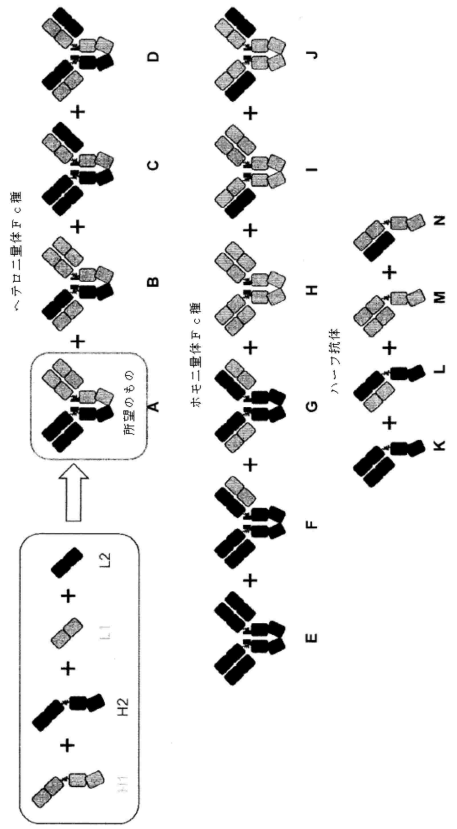
【図６】


✓
✓
×
×
×
シナリオA
シナリオB
シナリオC
シナリオD
シナリオE
正のゾーン
60:40
(スカラー= 0.405)
50:50
(スカラー= 0)
中立
ゾーン
40:60
(スカラー = -0.405)
負のゾーン
H1L1:H1L2_スカラー
H2L2:H2L1_スカラー

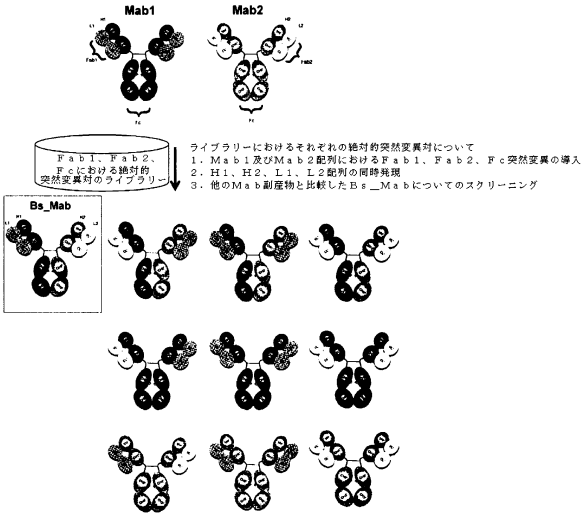
【図７】


5.23
3.59
2.69
1.84
0.09
3.53
2.51
1.86
1.02
0.32
K－L設計強度
K－K由来K－L設計強度

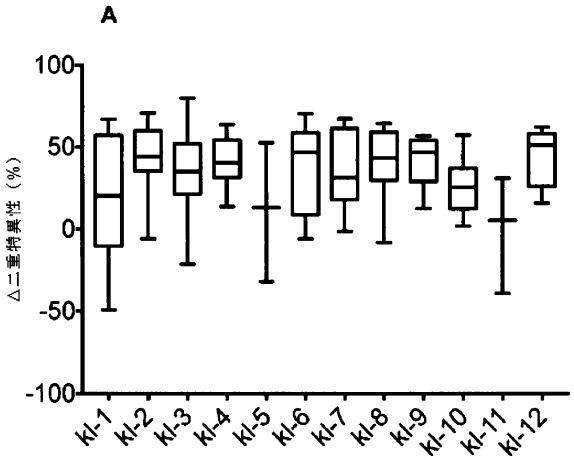
【図８】


ヘテロ二量体Fc種
ホモ二量体Fc種
ハーフ抗体
所望のもの
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
L2
L1
H2
H1

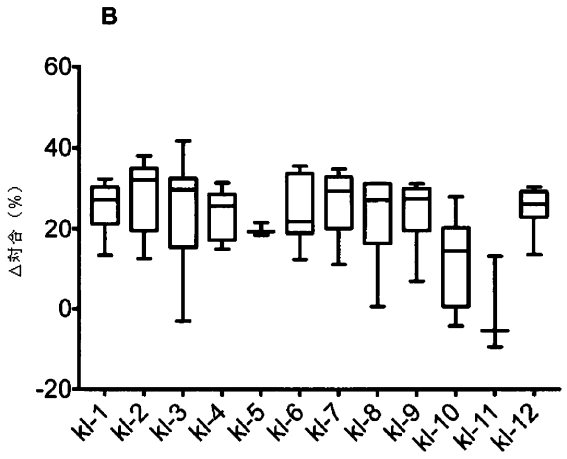
【図９】


Mab1
Mab2
Fab1、Fab2、
Fcにおける絶対的
突然変異対のライブラリー
ライブラリーにおけるそれぞれの絶対的突然変異対について
1．Mab1及びMab2配列におけるFab1、Fab2、Fc突然変異の導入
2．H1、H2、L1、L2配列の同時発現
3．他のMab副産物と比較したBs_Mabについてのスクリーニング
Bs_Mab

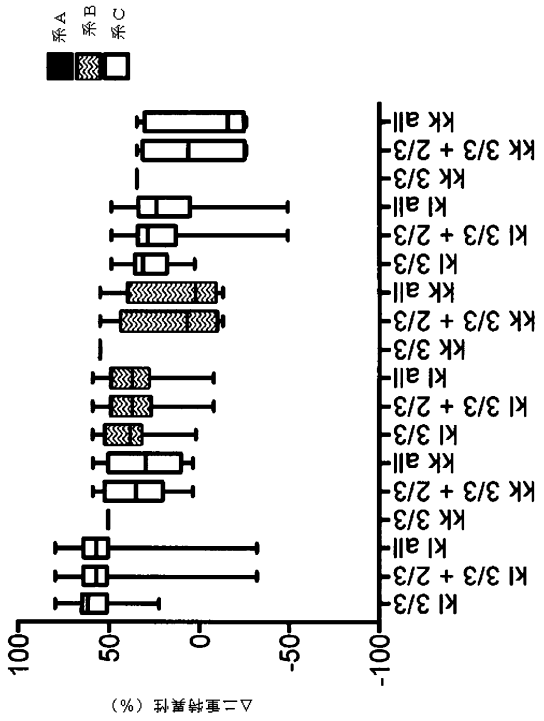
【図１０Ａ】



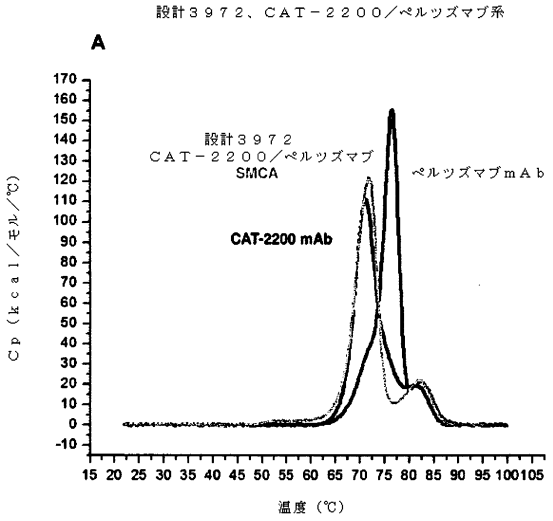
【図１０Ｂ】



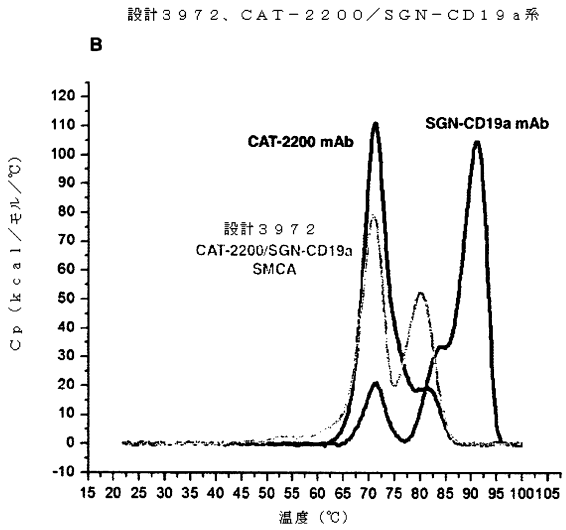
【図１１】



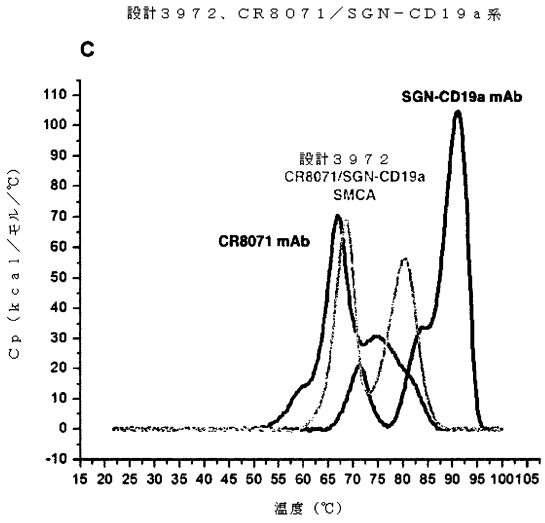
【図１２Ａ】



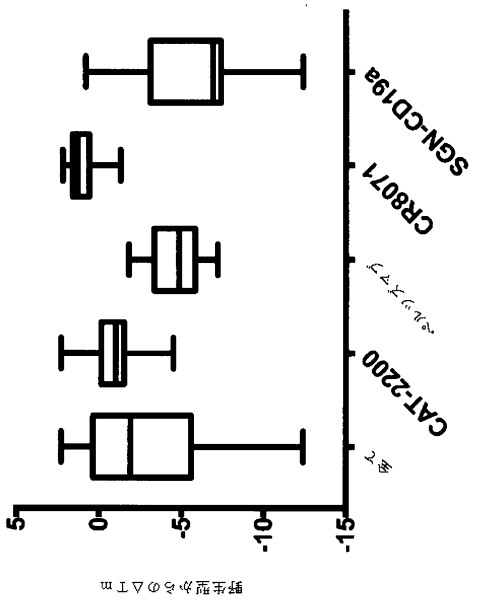
【図１２Ｂ】



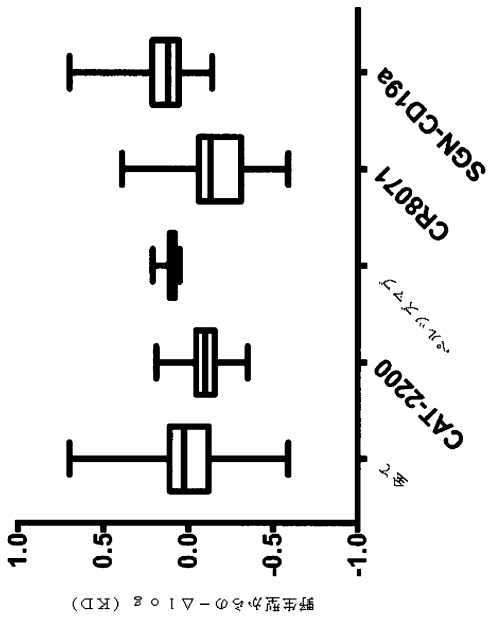
【図１２Ｃ】



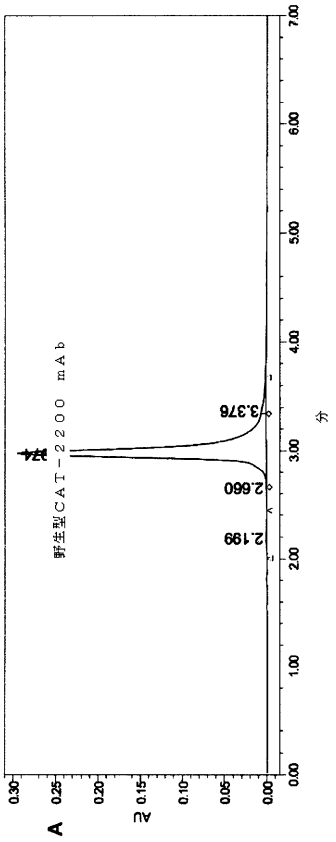
【図１３】



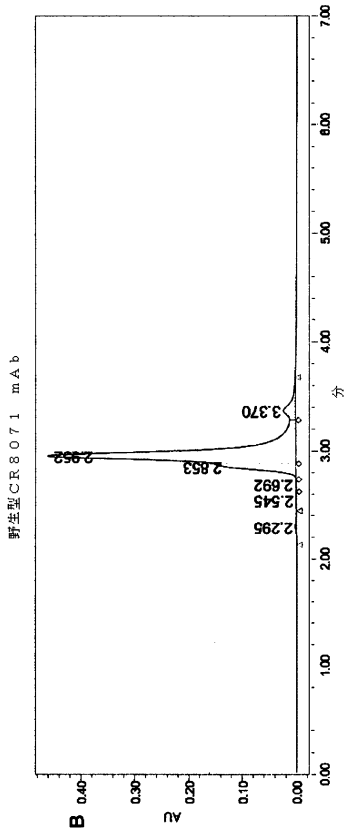
【図１４】



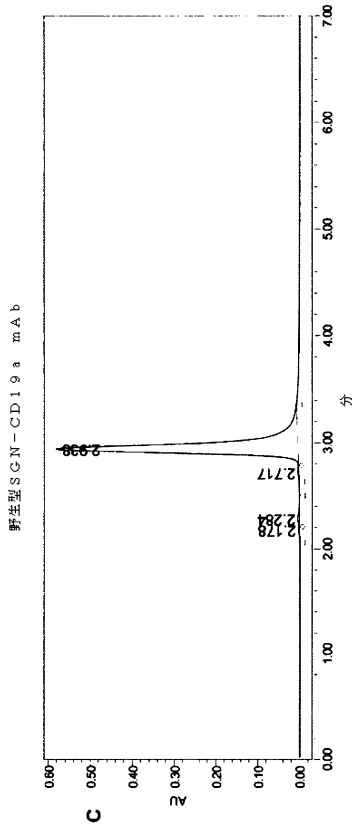
【図１５Ａ】



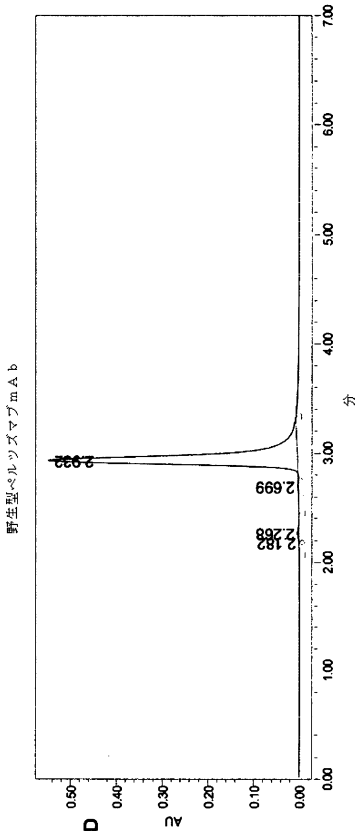
【図１５Ｂ】



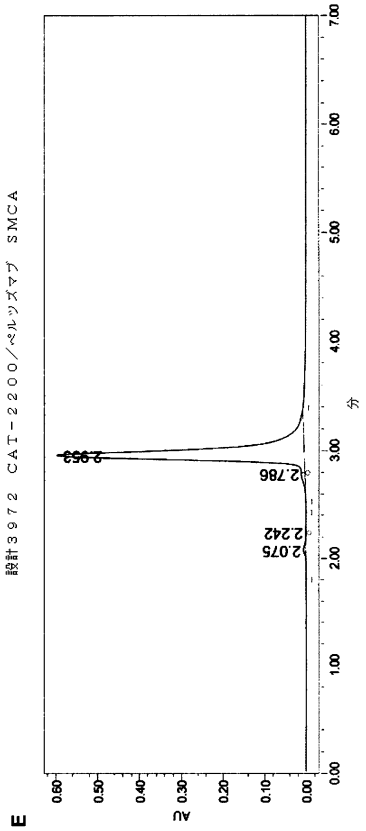
【図１５Ｃ】



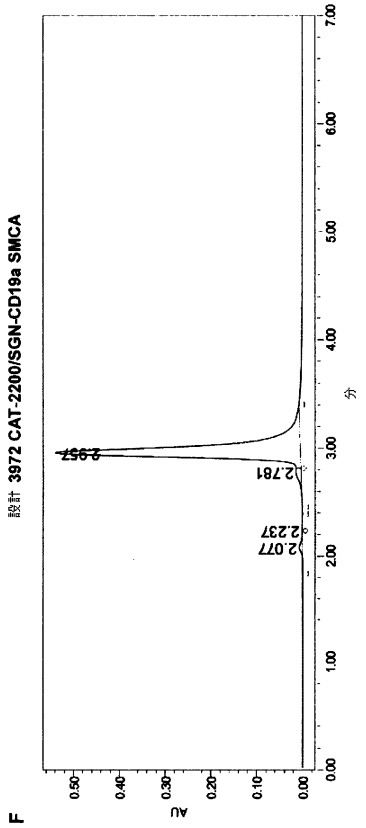
【図１５Ｄ】



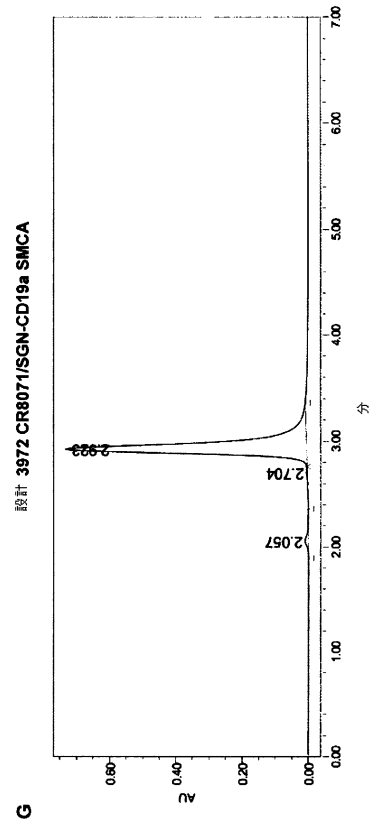
【図１５Ｅ】



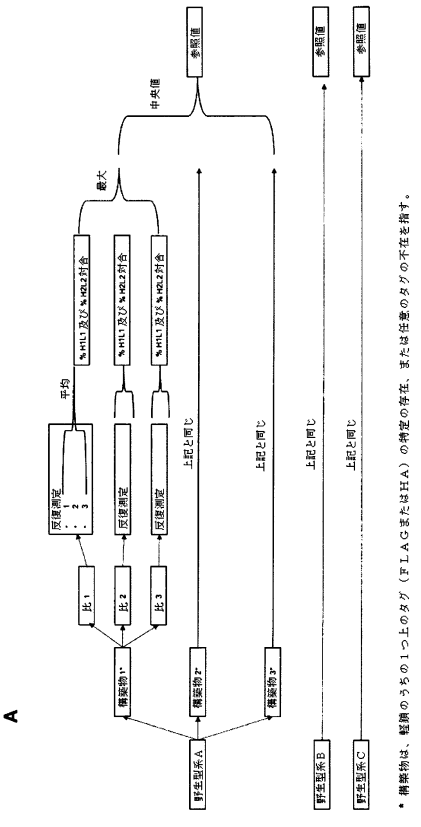
【図１５Ｆ】



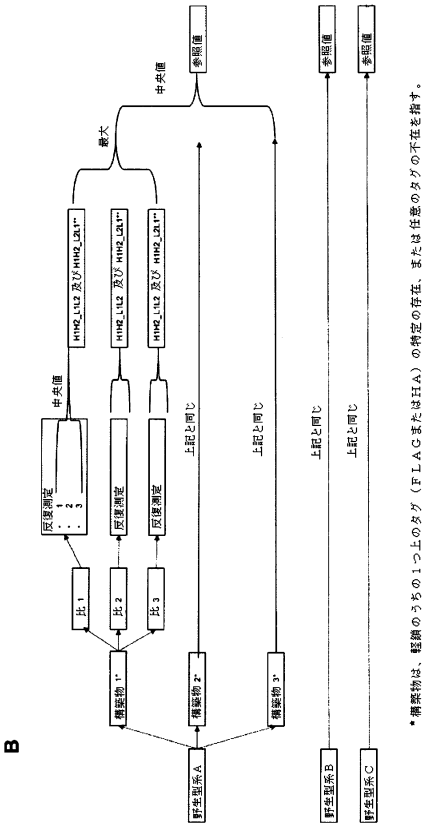
【図１５Ｇ】



【図１６Ａ】



【図１６Ｂ】



【配列表】

0007674560000001.xml

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 1/15 (2006.01)		A61P 43/00	121	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N 1/15		
C12N 1/21 (2006.01)		C12N 1/19		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N 1/21		
C12N 15/13 (2006.01)		C12N 5/10		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N 15/13		
C12N 15/63 (2006.01)		C12N 15/62		Z
C12P 21/08 (2006.01)		C12N 15/63		Z
		C12P 21/08		

米国(US)
カナダ国 ブイ６ケイ １ゼット９ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ７ス アベニュー ３１５７
(72)発明者 トム－ユー、 ステイシー エー．エル．
カナダ国 ブイ３イー ０イー４ 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 プレスタ、 レオナルド ジー．
アメリカ合衆国 ９４１０９ カリフォルニア州 サンフランシスコ ゴフ ストリート １９００ アパートメント ２０６

審査官 長谷川 強

(56)参考文献
国際公開第２０１４／１５０９７３（WO，A１）
国際公開第２０１４／０８２１７９（WO，A１）
特表２０１３－５３９４６１（ＪＰ，A）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ０７Ｋ １６／４６
Ａ６１Ｋ ３８／１７
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｋ ４５／００
Ａ６１Ｐ ４３／００
Ｃ１２Ｎ １／１５
Ｃ１２Ｎ １／１９
Ｃ１２Ｎ １／２１
Ｃ１２Ｎ ５／１０
Ｃ１２Ｎ １５／１３
Ｃ１２Ｎ １５／６２
Ｃ１２Ｎ １５／６３
Ｃ０７Ｋ １６／２４
Ｃ０７Ｋ １６／３０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）