

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6817064号
(P6817064)

(45) 発行日 令和3年1月20日(2021.1.20)

(24) 登録日 令和2年12月28日(2020.12.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 0 7 K 1 6 / 3 0 (2006.01)	C O 7 K 1 6 / 3 0 Z N A
C 0 7 K 1 6 / 4 6 (2006.01)	C O 7 K 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 1 3 (2006.01)	C 1 2 N 1 5 / 1 3
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 (2006.01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 T
A 6 1 P 3 5 / 0 0 (2006.01)	A 6 1 P 3 5 / 0 0

請求項の数 8 (全 172 頁)

(21) 出願番号	特願2016-534706 (P2016-534706)	(73) 特許権者	510214045
(86) (22) 出願日	平成26年11月27日(2014.11.27)		ザイムワークス、インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-503480 (P2017-503480A)		カナダ国 ブイ6エイチ 3ブイ9 プリ
(43) 公表日	平成29年2月2日(2017.2.2)		ティッシュ コロンビア州 パンクターバー
(86) 国際出願番号	PCT/CA2014/051140		ウエスト エイス アベニュー 138
(87) 国際公開番号	W02015/077891		5 スイート 540
(87) 国際公開日	平成27年6月4日(2015.6.4)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成29年11月24日(2017.11.24)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/910,026	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成25年11月27日(2013.11.27)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	62/000,908	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成26年5月20日(2014.5.20)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER 2 を標的とする二重特異性抗原結合性コンストラクト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a . 重鎖 1 が、SEQ ID NO : 1 0 1、SEQ ID NO : 1 0 5、および SEQ ID NO : 1 0 3 でそれぞれ示される CDR - H 1、CDR - H 2 および CDR - H 3 配列を含み；

b . 重鎖 2 が、SEQ ID NO : 2 9 9、SEQ ID NO : 3 0 3、SEQ ID NO : 3 0 1、SEQ ID NO : 3 0 7、SEQ ID NO : 3 1 1、および SEQ ID NO : 3 0 9 でそれぞれ示される CDR - L 1、CDR - L 2 および CDR - L 3、ならびに CDR - H 1、CDR - H 2 および CDR - H 3 配列を含み；および

c . 軽鎖 1 が、SEQ ID NO : 7 3、SEQ ID NO : 7 7、および SEQ ID NO : 7 5 でそれぞれ示される CDR - L 1、CDR - L 2 および CDR - L 3 配列を含み、

前記重鎖 1 および前記軽鎖 1 を含む、HER 2 ECD 2 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ポリペプチドコンストラクト、および

前記重鎖 2 を含む、HER 2 ECD 4 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ポリペプチドコンストラクト、

を含む抗原結合性コンストラクトを含む、癌を処置する際に使用するための、薬学的組成物。

【請求項 2】

HER2発現(HER2+)腫瘍を有する対象を処置するための、請求項1に記載の薬学的組成物であって、任意で、

(a)前記HER2+腫瘍が、免疫組織化学(IHC)によって判定した場合にHER2 2+/3+を発現し、遺伝子増幅されていて、かつトラスツズマブに対して中程度に感受性がある卵巣癌である、または

(b)前記HER2+腫瘍が、IHCによって判定した場合にHER2を2+レベル以下で発現する乳癌である、または

(c)前記HER2+腫瘍が、(i)HER2 3+、エストロゲン受容体陰性(ER-)、プロゲステロン受容体陰性(PR-)、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、(ii)HER2 3+、ER-、PR-、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、(iii)HER2 3+、ER-、PR-の侵襲性腺管癌、または(iv)HER2 2+、HER2遺伝子増幅、トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である、

薬学的組成物。

【請求項3】

前記処置の結果が、前記腫瘍の縮小、前記腫瘍の増殖の阻害、前記腫瘍が進行するまでの時間の増大、前記対象の無病生存期間の延長、転移の低減、前記対象の無進行生存期間の増大、または前記対象の全生存期間の増大であり、

任意で、前記腫瘍が、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌であり、さらに任意で、前記腫瘍が、腫瘍細胞1個当たり平均10,000以上のHER2のコピーを発現する細胞を含む、

請求項2に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記腫瘍が、免疫組織化学(IHC)によって判定した場合にHER2 1+、HER2 2+、またはHER2 3+であり、

任意で、前記腫瘍が、IHCによって判定した場合にHER2を2+以下のレベルで発現する、

請求項2または請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

(a)前記対象が、抗HER2抗体で以前に処置されていない、または

(b)前記腫瘍が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および/もしくはTDM1に対して抵抗性または難治性である、または

(c)前記対象が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および/もしくはTDM1で以前に処置されている、

請求項2乃至4のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

a.前記重鎖1が、SEQ ID NO:99で示されるVH配列を含み;前記重鎖2が、SEQ ID NO:297で示されるVL配列、およびSEQ ID NO:305で示されるVH配列を含み;ならびに前記軽鎖1が、SEQ ID NO:71で示されるVL配列を含むか、

b.前記重鎖1が、SEQ ID NO:97で示される配列を含み;前記重鎖2が、SEQ ID NO:295で示される配列を含み;および前記軽鎖1が、SEQ ID NO:69で示される配列を含むか、または

c.前記重鎖1が、SEQ ID NO:97で示される配列からなり;前記重鎖2が、SEQ ID NO:295で示される配列からなり;および前記軽鎖1が、SEQ ID NO:69で示される配列からなる、

請求項2乃至5のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項7】

注射または注入による投与のための、請求項2乃至6のいずれか一項に記載の薬学的組

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 8】

任意選択で化学療法薬であってもよい、追加の薬剤と組み合わせて用いられ、任意で、

i . 前記腫瘍が非小細胞肺癌である場合には、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピン、ピノレルピン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、またはペメトレキセドのうちの1種または複数種であり；

ii . 前記腫瘍が胃癌である場合には、前記追加の薬剤が、5 - フルオロウラシル（フォリン酸を含むか、または含まない）、カペシタピン、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、エピルピシン、イリノテカン、オキサリプラチン、またはパクリタキセルのうちの1種または複数種であり；

iii . 前記腫瘍が膵臓癌である場合には、前記追加の薬剤が、ゲムシタピン、フォルフィリノックス、アブラキサン、または5 - フルオロウラシルのうちの1種または複数種であり；

iv . 前記腫瘍がエストロゲンおよび/またはプロゲステロン陽性乳癌である場合には、前記追加の薬剤が、(a) ドキソルピシンおよびエピルピシンの組み合わせ、(b) パクリタキセルおよびドセタキセルの組み合わせ、または(c) フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびカルボプラチンの組み合わせのうちの1つまたは複数であり；

v . 前記腫瘍が頭頸部癌である場合には、前記追加の薬剤が、パクリタキセル、カルボプラチン、ドキソルピシン、またはシスプラチンのうちの1種または複数種であり；

vi . 前記腫瘍が卵巣癌である場合には、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルなどのタキサンの中の1種または複数種である、

請求項 2 乃至 7 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、すべて、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる2013年11月27日出願の米国特許仮出願第61/910,026号；2014年5月20日出願の米国特許仮出願第62/000,908号；および2014年6月6日出願の米国特許仮出願第62/009,125号の利益を請求する。

【0002】

配列表

本出願は、EFSウェブを介して提出され、かつその全体が参照によって本明細書に組み込まれる配列表を含む。2015年1月8日に作成された上記ASCIIコピーは、28087PCT_CRF_sequence_listing.txtと名付けられ、275,091バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

背景

現在市販されている抗体治療薬の大部分は、2つの抗原結合性ドメインによって付与される高い親和性結合および結合活性について最適化および選択された二価単一特異性抗体である。抗体Fc依存性細胞傷害性機構によって抗体をより有効にするために、変異誘発によるFcγR結合の非フコシル化（afucosylation）または増強が用いられている。非フコシル化抗体、またはFcγR結合を増強された抗体も未だ、治療において不完全な治療効力に甘んじており、薬物を市販する状況は、これらの抗体のいずれについても、まだ達成されていない。毒素にコンジュゲートされた典型的な二価抗体（抗体薬物コンジュゲート）はさらに有効であるが、より広い臨床の有用性は、用量を限定する毒性によって限定される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

治療用抗体は理想的には、対象患者への投与後の標的特異性、生体内安定性、生物学的利用能、および生体内分布、ならびに抗体依存性治療効果を最大化するために十分な標的への結合親和性および高い標的占有率を含む、ある特定の最小限の特徴を有するであろう。典型的な治療用抗体は単一特異性である。しかしながら、単一特異性標的化は、シグナル伝達および病因に関連し得る他の標的エピトープに対処せず、薬物抵抗性および逃避機構を許してしまう。現行の治療パラダイムのいくつかは、同じ標的抗原の2種の異なるエピトープを標的とする2種の治療用単一特異性抗体の組み合わせを使用することを必要とする。一例は、一部の癌細胞の表面上にあるHER2受容体タンパク質を両方とも標的とするトラスツズマブおよびペルツズマブの併用であるが、患者の疾患はなお進行し、比較的低いHER2受容体レベル（Hercept試験でHER2<3+）を有する他の癌細胞は、治療効果を示さない。HER2を標的とする治療用抗体は、GenMabに付与されたWO2012/143523（特許文献1）およびGenentechに付与されたWO2009/154651（特許文献2）において開示されている。抗体はまた、WO2009/068625（特許文献3）およびWO2009/068631（特許文献4）において記載されている。

10

【 0 0 0 5 】

共有特許出願である2011年11月4日出願のPCT/CA2011/001238（特許文献5）、2012年11月2日出願のPCT/CA2012/050780（特許文献6）、2013年5月10日出願のPCT/CA2013/00471（特許文献7）、および2013年5月8日出願のPCT/CA2013/050358（特許文献8）は、治療用抗体を記載している。それぞれ、あらゆる目的についてその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 WO 2 0 1 2 / 1 4 3 5 2 3

【 特許文献 2 】 WO 2 0 0 9 / 1 5 4 6 5 1

【 特許文献 3 】 WO 2 0 0 9 / 0 6 8 6 2 5

【 特許文献 4 】 WO 2 0 0 9 / 0 6 8 6 3 1

30

【 特許文献 5 】 P C T / C A 2 0 1 1 / 0 0 1 2 3 8

【 特許文献 6 】 P C T / C A 2 0 1 2 / 0 5 0 7 8 0

【 特許文献 7 】 P C T / C A 2 0 1 3 / 0 0 4 7 1

【 特許文献 8 】 P C T / C A 2 0 1 3 / 0 5 0 3 5 8

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

HER2に結合する二価抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。その抗原結合性コンストラクトは、HER2（ヒト上皮成長因子受容体2）発現細胞上のHER2ECD2（細胞外ドメイン2）抗原に一価で特異的に結合する第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、HER2発現細胞上のHER2ECD4（細胞外ドメイン4）抗原に一価で特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、第1および第2のリンカーポリペプチドとを含み、その第1のリンカーポリペプチドは、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、その第2のリンカーポリペプチドは、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており；それらのリンカーポリペプチドは、相互に共有結合を形成し得、ECD2またはECD4結合性ポリペプチドコンストラクトの少なくとも一方は、scFvである。ある特定の実施形態では、ECD2結合性ポリペプチドコンストラクトはscFvであり、ECD2結合性ポリペプチドコンストラクトはFabである。ある特定の実施形態では、ECD2結合性ポリペプチドコンストラクトはFabであり、ECD4結合性ポリペプチドコンストラクトはscFvである。いくつかの実施形態では、ECD2およびECD4

40

50

結合性ポリペプチドコンストラクトは両方とも s c F v である。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、C H 3 配列を含む二量体 F c を有する。いくつかの実施形態では、F c は、C H 3 配列において、野生型ホモ二量体 F c に匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する 1 つまたは複数の修飾を有するヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体 C H 3 配列は、68 以上の融解温度 (T m) を有する。抗原結合性コンストラクトをコードする核酸、ならびにベクターおよび細胞も記載する。本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを使用して、障害、例えば、癌を処置する方法も記載する。

【 0 0 0 8 】

V L 領域において Y 9 6 A の変異、および V H 領域において T 3 0 A / A 4 9 G / L 7 0 F の変異 (K a b a t に従って付番) を含む修飾ペルツズマブコンストラクトも、本明細書において提供する。一実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは一価であり、H E R 2 E C D 2 についてペルツズマブよりも 7 ~ 9 倍高い親和性を有する。ある特定の実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは、F a b / F a b、F a b / s c F v、または s c F v / s c F v 形式を有する。

[本発明1001]

H E R 2 (ヒト上皮成長因子受容体 2) 発現細胞上の H E R 2 E C D 2 (細胞外ドメイン 2) 抗原に一価で特異的に結合する第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト ;

H E R 2 発現細胞上の H E R 2 E C D 4 (細胞外ドメイン 4) 抗原に一価で特異的に結合する第 2 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト ;

第 1 および第 2 のリンカーポリペプチドを含む、抗原結合性コンストラクトであって、

第 1 のリンカーポリペプチドは第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、第 2 のリンカーポリペプチドは第 2 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、

前記リンカーポリペプチドが相互に共有結合を形成することができ、

第 1 または第 2 の抗原結合性ポリペプチドの一方または両方が s c F v である、前記抗原結合性コンストラクト。

[本発明1002]

第 1 および第 2 のリンカーポリペプチドがそれぞれ、I g G 1、I g G 2、または I g G 4 ヒンジ領域から選択される免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドを含む、本発明1001の抗原結合性コンストラクト。

[本発明1003]

第 1 および / または第 2 のリンカーポリペプチドが骨格、任意選択により F c に、機能的に連結されている、本発明1001または1002の抗原結合性コンストラクト。

[本発明1004]

第 1 および第 2 のリンカーポリペプチドが、C H 3 配列をそれぞれ含む第 1 および第 2 の F c ポリペプチドを含む二量体 F c に機能的に連結されており、第 1 の F c ポリペプチドが、第 1 のリンカーポリペプチドに機能的に連結されていて、第 2 のリンカーポリペプチドが第 2 のリンカーポリペプチドに機能的に連結されている、本発明1001または1002の抗原結合性コンストラクト。

[本発明1005]

(i) 第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、第 2 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが F a b であるか ; または (i i) 第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが F a b であり、第 2 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であるか ; または (i i i) 第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトおよび第 2 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの両方が s c F v である、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1006]

i . 第 1 の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが F a b であり、第 2 の抗原結合性

10

20

30

40

50

ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト F a b が、

a . v 5019 (S E Q I D N O : 221)、v 5020 (S E Q I D N O : 205)、v 7091 (S E Q I D N O : 221)、v 6717 (S E Q I D N O : 267)、または v 10000 (S E Q I D N O : 99) のペルツズマブアームの V H を含む第1の重鎖可変ポリペプチド V H 1 および

b . v 5019 (S E Q I D N O : 35)、v 5020 (S E Q I D N O : 35)、v 7091 (S E Q I D N O : 35)、v 6717 (S E Q I D N O : 259)、または v 10000 (S E Q I D N O : 71) のペルツズマブアームの V L を含む第1の軽鎖可変ポリペプチド V L 1

を含み、

第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト s c F v が、

(a) v 5019 (S E Q I D N O : 179)、v 5020 (S E Q I D N O : 157)、v 7091 (S E Q I D N O : 305)、v 6717 (S E Q I D N O : 179)、または v 10000 (S E Q I D N O : 305) のトラスツズマブアームの V H を含む第2の重鎖可変ポリペプチド V H 2 および

(b) v 5019 (S E Q I D N O : 171)、v 5020 (S E Q I D N O : 149)、v 7091 (S E Q I D N O : 297)、v 6717 (S E Q I D N O : 171)、または v 10000 (S E Q I D N O : 297) のトラスツズマブアームの V L を含む第2の軽鎖可変ポリペプチド V L 2

を含むか；または

i i . 第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが F a b であり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト s c F v が、

(a) v 5019 (S E Q I D N O : 221)、v 5020 (S E Q I D N O : 205)、v 7091 (S E Q I D N O : 221)、v 6717 (S E Q I D N O : 267)、または v 10000 (S E Q I D N O : 99) のペルツズマブアームの V H を含む第1の重鎖可変ポリペプチド V H 1 および

(b) v 5019 (S E Q I D N O : 35)、v 5020 (S E Q I D N O : 35)、v 7091 (S E Q I D N O : 35)、v 6717 (S E Q I D N O : 259)、または v 10000 (S E Q I D N O : 71) のペルツズマブアームの V L を含む第1の軽鎖可変ポリペプチド V L 1

を含み；

第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト F a b が、

(a) v 5019 (S E Q I D N O : 179)、v 5020 (S E Q I D N O : 157)、v 7091 (S E Q I D N O : 305)、v 6717 (S E Q I D N O : 179)、または v 10000 (S E Q I D N O : 305) のトラスツズマブアームの V H を含む第2の重鎖可変ポリペプチド V H 2 および

(b) v 5019 (S E Q I D N O : 171)、v 5020 (S E Q I D N O : 149)、v 7091 (S E Q I D N O : 297)、v 6717 (S E Q I D N O : 171)、または v 10000 (S E Q I D N O : 297) のトラスツズマブアームの V L を含む第2の軽鎖可変ポリペプチド V L 2

を含むか；または

i i i . 第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト s c F v が、

(a) v 5019 (S E Q I D N O : 221)、v 5020 (S E Q I D N O : 205)、v 7091 (S E Q I D N O : 221)、v 6717 (S E Q I D N O : 267)、または v 10000 (S E Q I D N O : 99) のペルツズマブアームの V H を含む第1の重鎖可変ポリペプチド V H 1 および

10

20

30

40

50

(b) v5019 (SEQ ID NO:35)、v5020 (SEQ ID NO:35)、v7091 (SEQ ID NO:35)、v6717 (SEQ ID NO:259)、またはv10000 (SEQ ID NO:71)のペルツズマブアームのVLを含む第1の軽鎖可変ポリペプチドVL1

を含み;

第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトscFvが、

(a) v5019 (SEQ ID NO:179)、v5020 (SEQ ID NO:157)、v7091 (SEQ ID NO:305)、v6717 (SEQ ID NO:179)、またはv10000 (SEQ ID NO:305)のトラスツズマブアームのVHを含む第2の重鎖可変ポリペプチドVH2および

(b) v5019 (SEQ ID NO:171)、v5020 (SEQ ID NO:149)、v7091 (SEQ ID NO:297)、v6717 (SEQ ID NO:171)、またはv10000 (SEQ ID NO:297)のトラスツズマブアームのVLを含む第2の軽鎖可変ポリペプチドVL2

を含む、

前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1007]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、

i. アミノ酸配列SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、およびSEQ ID NO:337か、またはSEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、およびSEQ ID NO:348を含む3つのVH CDR配列を含むポリペプチドコンストラクト;

ii. SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、およびSEQ ID NO:337か、またはSEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、およびSEQ ID NO:348の3つのVH CDR配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む3つのVH CDR配列を含むポリペプチドコンストラクト;

iii. SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、およびSEQ ID NO:340か、またはSEQ ID NO:338、SEQ ID NO:347、およびSEQ ID NO:340の3つのVL CDR配列のアミノ酸配列を含む3つのVL CDR配列を含むポリペプチドコンストラクト;

iv. SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、およびSEQ ID NO:340か、またはSEQ ID NO:338、SEQ ID NO:347、およびSEQ ID NO:340と少なくとも90%同一である3つのVL CDR配列のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である3つのVL CDR配列を含むポリペプチドコンストラクト;

v. SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、SEQ ID NO:337、SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、およびSEQ ID NO:340か;またはSEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:347、およびSEQ ID NO:340の6つのCDR配列のアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチドコンストラクト;または

vi. SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、SEQ ID NO:337、SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、およびSEQ ID NO:340か;またはSEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:347、およびSEQ ID NO:340の6つのCDR配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチドコンストラクト

から選択され、かつ、

第2の抗原結合性ポリペプチドが、

vii. SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342、およびSEQ ID NO:343の3つのVH CDR配列のアミノ酸配列を含む3つのVH CDR配列を含む

10

20

30

40

50

ポリペプチドコンストラクト；

v i i i . S E Q I D N O : 341, S E Q I D N O : 342, および S E Q I D N O : 343 の 3 つ の V H C D R 配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む3つのVH CDR配列を含むポリペプチドコンストラクト；

i x . S E Q I D N O : 344, S E Q I D N O : 345, および S E Q I D N O : 346 の 3 つ の V L C D R 配列のアミノ酸配列を含む3つのV L C D R 配列を含むポリペプチドコンストラクト；

x . S E Q I D N O : 344, S E Q I D N O : 345, および S E Q I D N O : 346 の 3 つ の V L C D R 配列のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である3つのV L C D R 配列を含むポリペプチドコンストラクト；

x i . S E Q I D N O : 341, S E Q I D N O : 342, S E Q I D N O : 343, S E Q I D N O : 344, S E Q I D N O : 345, および S E Q I D N O : 346 の 6 つ の C D R 配列のアミノ酸配列を含む6つのC D R 配列を含むポリペプチドコンストラクト；または

x i i . S E Q I D N O : 341, S E Q I D N O : 342, S E Q I D N O : 343, S E Q I D N O : 344, S E Q I D N O : 345, および S E Q I D N O : 346 の 6 つ の C D R 配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む6つのC D R 配列を含むポリペプチドコンストラクト

から選択される、

前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1008]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが (i) E C D 2 へのペルツズマブの結合を50%以上遮断し、かつ/または (i i) 第2の抗原結合性ポリペプチドが E C D 4 へのトラツズマブの結合を50%以上遮断する、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1009]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、H E R 2 E C D 2 に特異的な前記 v 5 019, v 10000, v 7091, v 5020, または v 6717 抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つを含み、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、H E R 2 E C D 4 に特異的な前記 v 5019, v 10000, v 7091, v 5020, または v 6717 抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つを含む、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1010]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、H E R 2 E C D 2 に特異的な前記 v 5 019, v 10000, v 7091, v 5020, または v 6717 抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含み、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、H E R 2 E C D 4 に特異的な前記 v 5 019, v 10000, v 7091, v 5020, または v 6717 抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含む、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1011]

v 5019, v 10000, v 7091, v 5020, および v 6717 から選択される、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1012]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが F a b であり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、前記抗原結合性コンストラクトが、2つの F a b を有する基準二重パラトピック抗原結合性コンストラクトと比較して、

(i) H E R 2 3+ 細胞において受容体内部移行の増大を誘導し、かつ/または

(i i) A D C C (antibody directed cellular cytotoxicity) アッセイにおいて、H E R 2 1+ 細胞に対して、より高い効力を示す、

前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

10

20

30

40

50

[本発明1013]

第1および第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが s c F v であり、前記抗原結合性コンストラクトが、2つの F a b を有する基準抗原結合性コンストラクトと比較して、H E R 2 1+、2+、および3+細胞において受容体内部移行の増大を誘導する、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1014]

H E R 2 E C D 2 に一価で特異的に結合する1つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含み、各ポリペプチドコンストラクトが V H および V L を含み、該 V H が、S E Q I D N O : 335、S E Q I D N O : 336、および S E Q I D N O : 348 の3つの V H C D R 配列のアミノ酸配列を含む3つの C D R 配列を含み、該 V L が、S E Q I D N O : 338、S E Q I D N O : 347、および S E Q I D N O : 340 の3つの V L C D R 配列のアミノ酸配列を含む3つの C D R 配列を含む、修飾ペルツズマブコンストラクト。

10

[本発明1015]

前記 V H が v 9996 の V H を含み、前記 V L が v 9996 の V L を含む、本発明1014の修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1016]

前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、v 9996 の V H および v 9996 の V L と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含む、本発明1014または1015の修飾ペルツズマブコンストラクト。

20

[本発明1017]

一価、二価、または多価である、本発明1014から1016のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1018]

(i) 一価であり、F a b または s c F v を含むか、(i i) 二価であり、F a b および s c F v を含むか、または (i i i) 二価であり、2つの s c F v を含む、本発明1014から1017のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1019]

一価であり、H E R 2 E C D 2 について、ペルツズマブと比較して7~9倍の親和性の増大を示す、本発明1014から1017のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

30

[本発明1020]

リンカーを用いてまたは用いずに前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに連結されている二量体 F c を含む、本発明1014から1019のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1021]

第1および第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト、ならびにそれぞれ C H 3 配列を含む第1および第2の F c ポリペプチドを含み、第1の F c ポリペプチドが、第1のリンカーを用いてまたは用いずに第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されていて、第2の単量体 F c ポリペプチドが、第2のリンカーを用いてまたは用いずに第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されている、本発明1014から1020のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

40

[本発明1022]

ポリペプチドリンカーを含む、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1023]

前記リンカーが I g G 1 ヒンジ領域を含む、本発明1022の修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1024]

前記 F c が ヒト F c である、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。

50

[本発明1025]

前記 F c がヒト I g G1 F c である、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツ
ズマブコンストラクト。

[本発明1026]

ヘテロ二量体 F c を含み、二量体化された C H3配列が、約68、69、70、71、72、73、7
4、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84、または85 以上の融解温度 (T m
) を有する、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1027]

発現させた場合に、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89
、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成されるヘテロ二量体
F c を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

10

[本発明1028]

単一の細胞によって発現させた場合に、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、
85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成
されるヘテロ二量体 F c を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1029]

前記 C H3配列の少なくとも1つにおいて、1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体 F
c を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1030]

前記 C H3配列の少なくとも1つにおいて、野生型ホモ二量体 F c に匹敵する安定性を有
するヘテロ二量体の形成を促進する1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体 F c を含む
、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

20

[本発明1031]

野生型ホモ二量体 F c と比較して、E U付番に従うと、

i . 第1の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ L 351 Y __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、お
よび第2の F c ポリペプチドにおいて T 366 I __ N 390 R __ K 392 M __ T 394 W の修飾を有す
るヘテロ二量体 I g G1 F c ; または

i i . 第1の F c ポリペプチドにおいて L 351 Y __ S 400 E __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、
および第2の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ T 366 L __ K 392 L __ T 394 W の修飾を有
するヘテロ二量体 I g G1 F c 、

30

i i i . 第1の F c ポリペプチドにおいて L 351 Y __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、および第
2のポリペプチドにおいて T 366 L __ K 392 M __ T 394 W の修飾を有するヘテロ二量体 I g G
1 F c ;

i v . 第1の F c ポリペプチドにおいて L 351 Y __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、および第2
の F c ポリペプチドにおいて T 366 L __ K 392 L __ T 394 W の修飾を有するヘテロ二量体 I
g G1 F c ;

v . 第1の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ L 351 Y __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、お
よび第2の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ T 366 L __ K 392 L __ T 394 W の修飾を有す
るヘテロ二量体 I g G1 F c ;

v i . 第1の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ L 351 Y __ F 405 A __ Y 407 V の修飾、
および第2の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ T 366 L __ K 392 M __ T 394 W の修飾を有
するヘテロ二量体 I g G1 F c ; または

40

v i i . 第1の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ L 351 Y __ S 400 E __ F 405 A __ Y 407
V の修飾、および第2の F c ポリペプチドにおいて T 350 V __ T 366 L __ N 390 R __ K 392 M
__ T 394 W の修飾を有するヘテロ二量体 I g G1 F c

を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1032]

少なくとも1つの C H2ドメインを含むヘテロ二量体 F c を含む、前記本発明のいずれか
のコンストラクト。

[本発明1033]

50

前記ヘテロ二量体 F c の前記 C H 2 ドメインが1つまたは複数の修飾を含む、本発明1032のコンストラクト。

[本発明1034]

F c - ガンマ受容体の選択的結合を促進する1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体 F c を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1035]

グリコシル化されている、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1036]

薬物にコンジュゲートされている、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1037]

前記薬物がメイタンシン (D M 1) である、本発明1036のコンストラクト。

[本発明1038]

S M C C リンカーで D M 1 にコンジュゲートされている、本発明1036のコンストラクト。

[本発明1039]

前記本発明のいずれかのコンストラクトと薬学的担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1040]

前記薬学的担体が、緩衝剤、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、キレート化剤、安定剤、または添加剤を含む、本発明1039の薬学的組成物。

[本発明1041]

本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトを含む、医療において使用するための薬学的組成物。

[本発明1042]

本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトを含む、癌を処置する際に使用するための薬学的組成物。

[本発明1043]

本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトまたは本発明1039から1042のいずれかの薬学的組成物の有効量を対象に投与することを含む、H E R 2 発現 (H E R 2 +) 腫瘍を有する対象を処置する方法。

[本発明1044]

前記処置の結果が、前記腫瘍の縮小、前記腫瘍の増殖の阻害、前記腫瘍が進行するまでの時間の増大、前記対象の無病生存期間の延長、転移の低減、前記対象の無進行生存期間の増大、または前記対象の全生存期間の増大である、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記腫瘍が、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌である、本発明1043または1044の方法。

[本発明1046]

前記腫瘍が、腫瘍細胞1個当たり平均10,000以上のH E R 2 のコピーを発現する細胞を含む、本発明1043から1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

前記腫瘍が、免疫組織化学 (I H C) によって判定した場合にH E R 2 1 + 、 H E R 2 2 + 、またはH E R 2 3 + である、本発明1043から1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

前記腫瘍がH E R 2 を、I H C によって判定した場合に2 + 以下のレベルで発現する、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記H E R 2 + 腫瘍が、I H C によって判定した場合にH E R 2 2 + / 3 + を発現し、遺伝子増幅されていて、かつトラスツズマブに対して中程度に感受性がある卵巣癌である、

10

20

30

40

50

本発明1043の方法。

[本発明1050]

前記HER2+腫瘍が、免疫組織化学(IHC)によって判定した場合にHER2を2+レベル以下で発現する乳癌である、本発明1043の方法。

[本発明1051]

前記HER2+腫瘍が、(i)HER2 3+、エストロゲン受容体陰性(ER-)、プロゲステロン受容体陰性(PR-)、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、(ii)HER2 3+、ER-、PR-、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、(iii)HER2 3+、ER-、PR-の侵襲性腺管癌、または(iv)HER2 2+、HER2遺伝子増幅、トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である、本発明1043の方法。

10

[本発明1052]

前記対象が、抗HER2抗体で以前に処置されていない、本発明1043から1051のいずれかの方法。

[本発明1053]

前記腫瘍が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および/またはTDM1に対して抵抗性または難治性である、本発明1043から1051のいずれかの方法。

[本発明1054]

前記対象が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および/またはTDM1で以前に処置されている、本発明1043から1051のいずれかの方法。

20

[本発明1055]

前記コンストラクトが、v5019、v10000、v7091、v5020、またはv6717から選択される、本発明1043から1054のいずれかの方法。

[本発明1056]

投与を注射または注入によって行う、本発明1043から1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

前記対象に、追加の薬剤、任意選択で化学療法薬を投与することをさらに含む、本発明1043から1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

i. 前記腫瘍が非小細胞肺癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルピン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、またはペメトレキセドのうちの1種または複数種であり；

30

ii. 前記腫瘍が胃癌であり、前記追加の薬剤が、5-フルオロウラシル(フォリン酸を含むか、または含まない)、カペシタビン、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、エピルピシン、イリノテカン、オキサリプラチン、またはパクリタキセルのうちの1種または複数種であり；

iii. 前記腫瘍が膵臓癌であり、前記追加の薬剤が、ゲムシタビン、フォルフィリノックス、アブラキサソ、または5-フルオロウラシルのうちの1種または複数種であり；

iv. 前記腫瘍がエストロゲンおよび/またはプロゲステロン陽性乳癌であり、前記追加の薬剤が、(a)ドキシソルピシンおよびエピルピシンの組み合わせ、(b)パクリタキセルおよびドセタキセルの組み合わせ、または(c)フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびカルボプラチンの組み合わせのうちの1つまたは複数であり；

40

v. 前記腫瘍が頭頸部癌であり、前記追加の薬剤が、パクリタキセル、カルボプラチン、ドキシソルピシン、またはシスプラチンのうちの1種または複数種であり；

vi. 前記腫瘍が卵巣癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルなどのタキサンのうちの1種または複数種である、

本発明1057の方法。

[本発明1059]

50

前記対象がヒトである、本発明1043から1058のいずれかの方法。

[本発明1060]

本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトに試料を接触させ、結合した複合体を検出または測定することを含む、試料中のHER2を検出または測定する方法。

[本発明1061]

本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトの有効量を細胞に投与することを含む、細胞においてHER2シグナル伝達を阻害、低減、または遮断する方法。

[本発明1062]

HER2発現腫瘍細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトと接触させることを含む、前記方法。

10

[本発明1063]

前記腫瘍細胞が、HER2 1+もしくは2+ヒト膵臓癌細胞、HER2 3+ヒト肺癌細胞、HER2 2+白色人種気管支肺癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、HER2 2+ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のHER2 2+扁平上皮細胞癌細胞、HER2 1+または2+ヒト結腸直腸癌細胞、HER2 3+ヒト胃癌細胞、HER2 1+ヒト乳房腺管ER+(エストロゲン受容体陽性)癌細胞、HER2 2+/3+ヒトER+、HER2増幅乳癌細胞、HER2 0+/1+ヒト三重陰性乳癌細胞、HER2 2+ヒト子宮内膜様癌細胞、HER2 1+肺転移悪性黒色腫細胞、HER2 1+ヒト子宮頸癌細胞、Her2 1+ヒト腎細胞癌細胞、またはHER2 1+ヒト卵巣癌細胞である、本発明1062の方法。

20

[本発明1064]

前記腫瘍細胞が、HER2 1+もしくは2+もしくは3+ヒト膵臓癌細胞、HER2 2+転移性膵臓癌細胞、HER2 0+/1+、+3+ヒト肺癌細胞、HER2 2+白色人種気管支肺癌細胞、HER2 0+未分化肺癌、ヒト非小細胞肺癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、HER2 2+ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のHER2 2+扁平上皮細胞癌細胞、HER2 1+もしくは2+ヒト結腸直腸癌細胞、HER2 0+、1+、もしくは3+ヒト胃癌細胞、HER2 1+ヒト乳房腺管ER+(エストロゲン受容体陽性)癌細胞、HER2 2+/3+ヒトER+、HER2増幅乳癌細胞、HER2 0+/1+ヒト三重陰性乳癌細胞、HER2 0+ヒト乳房腺管癌(Basal B、間葉状三重陰性)細胞、HER2 2+ER+乳癌、HER2 0+ヒト転移性乳癌細胞(ER-、HER2増幅、ルミナルA、TN)、ヒト子宮中胚葉腫瘍(混合グレードIII)細胞、2+ヒト子宮内膜様癌細胞、HER2 1+ヒト皮膚類表皮癌細胞、HER2 1+肺転移悪性黒色腫細胞、HER2 1+悪性黒色腫細胞、ヒト子宮頸類表皮癌細胞、HER2 1+ヒト膀胱癌細胞、HER2 1+ヒト子宮頸癌細胞、Her2 1+ヒト腎細胞癌細胞、またはHER2 1+、2+、もしくは3+ヒト卵巣癌細胞であり、前記抗原結合性コンストラクトがメイタンシン(DM1)にコンジュゲートされている、本発明1062の方法。

30

[本発明1065]

前記腫瘍細胞が、膵臓腫瘍細胞系のBxPC3、Capan-1、MiaPaca2;肺腫瘍細胞系のCalu-3、NCI-H322;頭頸部腫瘍細胞系のDetroit 562、SCC-25、Fadu;結腸直腸腫瘍細胞系のHT29、SNU-C2B;胃腫瘍細胞系のNCI-N87;乳房腫瘍細胞系のMCF-7、MDAMB175、MDAMB361、MDAMB-231、BT-20、JIMT-1、SkBr3、BT-474;子宮腫瘍細胞系のTOV-112D;皮膚腫瘍細胞系のMalme-3M;子宮頸部腫瘍細胞系のCaski、MS751;膀胱腫瘍細胞系のT24、卵巣腫瘍細胞系のCaOV3、およびSKOV3から選択される細胞である、本発明1062の方法。

40

[本発明1066]

前記腫瘍細胞が、膵臓腫瘍細胞系のBxPC3、Capan-1、MiaPaca2、SW1990、Panc1;肺腫瘍細胞系のA549、Calu-3、Calu-6、NCI-H2126、NCI-H322;頭頸部腫瘍細胞系のDetroit562、SCC-15、SCC-25、F

50

a D u ; 結腸直腸腫瘍細胞系の C o l o 201、D L D - 1、H C T 116、H T 29、S N U - C 2 B ; 胃腫瘍細胞系の S N U - 1、S N U - 16、N C I - N 87 ; 乳房腫瘍細胞系の S k B r 3、M C F - 7、M D A M B 175、M D A M B 361、M D A - M B - 231、Z R - 75 - 1、B T - 20、B T 549、B T - 474、C A M A - 1、M D A M B 453、J I M T - 1、T 47 D ; 子宮腫瘍細胞系の S K - U T - 1、T O V - 112 D ; 皮膚腫瘍細胞系の A 431、M a l m e - 3 M、S K E M E L 28 ; 子宮頸部腫瘍細胞系の C a s k i、M S 751 ; 膀胱腫瘍細胞系の T 2 4、腎臓腫瘍細胞系の A C H N ; 卵巣腫瘍細胞系の C a O V 3、O v a r - 3、および S K O V 3 から選択される細胞であり、前記抗原結合性コンストラクトがメイタンシンにコンジュゲートされている、本発明1062の方法。

[本発明1067]

前記腫瘍細胞が、H E R 2 2 / 3 + 遺伝子増幅卵巣癌細胞、H E R 2 0 + / 1 + 三重陰性乳癌細胞 ; E R +、H E R 2 1 + 乳癌細胞 ; トラスツズマブ抵抗性 H E R 2 2 + 乳癌細胞 ; E R +、H E R 2 + 乳癌細胞 ; または H E R 2 3 + 乳癌細胞から選択される、本発明1062の方法。

[本発明1068]

本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトを製造する方法であって、前記抗原結合性コンストラクトを発現させるために適した条件下で、本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養し、前記コンストラクトを精製することを含む、前記方法。

[本発明1069]

本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトの少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチドのセット。

[本発明1070]

前記ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが c D N A である、本発明1069のポリヌクレオチド。

[本発明1071]

v 5019、v 7091、v 10000、v 5020、または v 6717 をコードするポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチドのセット。

[本発明1072]

本発明1069から1071のいずれかのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの1つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。

[本発明1073]

プラスミド、ウイルスベクター、非エピソード哺乳動物ベクター、発現ベクター、および組換え発現ベクターからなる群から選択される、本発明1072のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの1つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。

[本発明1074]

本発明1069から1071のいずれかのポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または本発明1072もしくは1073のベクターもしくはベクターのセットを含む、単離細胞。

[本発明1075]

ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、または H E K 293 細胞である、本発明1074の単離細胞。

[本発明1076]

本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトと使用説明書とを含むキット。

[本発明1077]

非フコシル化されている、本発明1035のコンストラクト。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

【図1】図1Aは、Fab-Fab形式の二重パラトピック(biparatoptic)抗体の構造を図示する。図1B~1Eは、scFv-Fab形式の二重パラトピック抗体の考えられ得るバージョンの構造を図示する。図1Bでは、抗原結合性ドメイン1は、鎖Aに融合しているscFvであり、抗原結合性ドメイン2は、鎖Bに融合しているFabである。図1Cでは、抗原結合性ドメイン1は、鎖Aに融合しているFabであり、抗原結合性ドメイン2は、鎖Bに融合しているscFvである。図1Dでは、抗原結合性ドメイン2は、鎖Aに融合しているFabであり、抗原結合性ドメイン1は、鎖Bに融合しているscFvである。図1Eでは、抗原結合性ドメイン2は、鎖Aに融合しているscFvであり、抗原結合性ドメイン1は、鎖Bに融合しているFabである。図1Fでは、抗原結合性ドメインは両方ともscFvである。

10

【図2A】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図2Aは、プロテインA精製抗体のSECクロマトグラフを図示する。

【図2B】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図2Bは、v5019の10L発現および精製の非還元SDS-PAGE分析を図示する。

【図2C】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図2Cは、v10000の25L発現および精製のSDS-PAGE分析を図示する。

【図3A】プロテインAおよびSECによって精製された例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のUPLC-SEC分析の結果を図示する。図3Aは、v5019についての結果を示しており、上部のパネルは、精製結果を示しており、下部のパネルは、y軸のスケールを拡大した同じ結果を示している。得られたデータの概要が、UPLC-SECの結果の下に提示されている。

20

【図3B】プロテインAおよびSECによって精製された例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のUPLC-SEC分析の結果を図示する。図3Bは、v10000についての結果を示している。

【図4A】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のヘテロ二量体純度のLCMS分析を図示する。図4Aは、v5019の貯留SEC画分のLC-MS分析からの結果を図示する。

【図4B】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のヘテロ二量体純度のLCMS分析を図示する。図4Bは、v10000の貯留プロテインA画分のLC-MS分析からの結果を図示する。

30

【図5A】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の25L規模調製物の分析を図示する。図5Aは、MabSelect(商標)およびHiTrap(商標)SPFF精製後の例示的な抗HER2二重パラトピックのSDS-PAGEプロファイルを図示する。

【図5B】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の25L規模調製物の分析を図示する。図5Bは、精製抗体のLCMS分析を図示する。

【図6A】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2+全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Aは、SKOV3細胞への結合を図示する。

40

【図6B】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2+全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Bは、JIMT1細胞への結合を図示する。

【図6C】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2+全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Cは、MCF7細胞への結合を図示する。

【図6D】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2+全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Dは、MDA-MB-231細胞への結合を図示する。

【図6E】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を

50

示すHER2 + 全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Eは、SKOV3細胞への結合を図示する。

【図6F】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2 + 全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Fは、MCF7細胞への結合を図示する。

【図6G】FACSによって測定し、対照抗体と比較して、異なるHER2受容体密度を示すHER2 + 全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を比較する。図6Gは、WI-38細胞への結合を図示する。

【図7A】HER2 + 細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図7Aは、SKOV3細胞における増殖阻害を示している。

【図7B】HER2 + 細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図7Bは、BT-474細胞における増殖阻害を示している。

【図7C】HER2 + 細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図7Cは、SKBR3細胞における増殖阻害を示している。

【図7D】HER2 + 細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図7Dは、SKOV3細胞における増殖阻害を示している。

【図7E】HER2 + 細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図7Eは、JIMT-1細胞における増殖阻害を示している。

【図8】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のパラトープに関するSPR結合データを図示する。図8Aは、固定化Her2 ECDまたは二量体Her2 - Fcへの結合についての一価抗Her2抗体(v1040; 例示的な抗Her2二重パラトピック抗体のCH-B上の抗原結合性ドメインを表す)の K_D 値(nM)を図示する。図8Bは、固定化Her2 ECDまたは二量体Her2 - Fcへの結合についての一価抗Her2抗体(v4182; 例示的な抗Her2二重パラトピック抗体のCH-A上の抗原結合性ドメインを表す)の K_D 値(nM)を図示する。

【図9】HER2 + 細胞内へ内部移行する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図9Aは、BT-474細胞への内部移行を図示しており、図9bは、JIMT-1細胞への内部移行を図示する。

【図10A】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10A(v5019)は、BT-474細胞における結果を図示する。

【図10B】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10B(v5019)は、JIMT1細胞における結果を図示する。

【図10C】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10C(v5019)は、SKOV3細胞における結果を図示する。

【図10D】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10D(v5019)は、MCF7細胞における結果を図示する。

【図10E】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10E(v5019およびv10000)は、SKOV3細胞における結果を図示する。

【図10F】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図10F(v5019およびv10000)は、JIMT1細胞における結果を図示する。

【図11】SKOV3細胞におけるADCCを媒介する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図11Aでは、アッセイを、5:1のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施し; 図11Bでは、アッセイを、3:1のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施し; 図11Cでは、アッセイを、1:1のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施した。

【図12】組換えヒトHER2に対する一価抗HER2(v630およびv4182)および例示的な二重パラトピック抗Her2抗体(v5019)の親和性および結合反応速度の特性決定を図示する。図12Aは、 k_a (1/Ms)の測定値を示している。図12

10

20

30

40

50

Bは、 k_d (1/s) の測定値を示している。図12Cは、 K_D (M) の測定値を示している。

【図13】抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトHER2に対する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の親和性および結合特性を図示する。図13Aは、例示的な二重パラトピック抗Her2抗体(v5019)について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたHER2 ECDに対する k_d (1/s) の測定値を図示する。図13Bは、一価抗Her2抗体(v4182)について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたHER2 ECDに対する k_d (1/s) の測定値を図示する。図13Cは、一価抗Her2抗体(v630)について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたHER2 ECDに対する k_d (1/s) の測定値を図示する。

10

【図14】単一特異性抗ECD4 HER2抗体(左側)およびFab-scFv二重パラトピック抗ECD2×ECD4 HER2抗体(右側)の結合機構の比較を示す。単一特異性抗ECD4 HER2抗体は、1個の抗体分子を2個のHER2分子に結合させ得るが;二重パラトピック抗ECD2×ECD4 HER2抗体は、1個の抗体を2個のHER2分子に、さらには、2個の抗体を1個のHER2分子に、またその組み合わせで結合させ得て、HER2受容体架橋および格子形成、続いて、矢印によって示されるとおりの内部移行および/または増殖阻害などの下流生物学的効果をもたらす。IECは、「免疫エフェクター細胞」を表す。HER2の4つの細胞外ドメインは、1、2、3、または4と付番されていて、1 = ECD1、2 = ECD2、3 = ECD3、および4 = ECD4である。

20

【図15】BT-474細胞におけるAKTリン酸化に対する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の効果を図示する。

【図16】心筋細胞生存率に対する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の効果を図示する。図16Aは、心筋細胞生存率に対するv5019および対応するADC v6363の効果を図示しており;図16Bは、心筋細胞生存率に対するv5019、v7091、およびv10000、ならびに対応するADC v6363、7148、10553の効果を図示しており、図16Cは、ドキソルビシン事前処置した心筋細胞の生存率に対するv5019、v7091、およびv10000、ならびに対応するADC v6363、7148、10553の効果を図示する。

【図17A】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Aは、JIMT1細胞の増殖を阻害するADC v6363の能力を示している。

30

【図17B】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Bは、SKOV3細胞の増殖を阻害するADC v6363の能力を示している。

【図17C】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Cは、MCF7細胞の増殖を阻害するADC v6363の能力を示している。

【図17D】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Dは、MDA-MB-231細胞の増殖を阻害するADC v6363の能力を示している。

40

【図17E】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Eは、SKOV3細胞の増殖を阻害するADC v6363、v10553、およびv1748の能力を示している。

【図17F】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Fは、JIMT-1細胞の増殖を阻害するADC v6363、v10553、およびv1748の能力を示している。

【図17G】HER2+細胞の増殖を阻害する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの能力を図示する。図17Gは、NCI-N87細胞の増殖を阻害するADC v6363、v10553、およびv1748の能力を示している。

50

【図18A】ヒト卵巣癌系異種移植片モデル(SKOV3)における二重パラトピック抗HER2抗体の効果を図示する。図18Aは、平均腫瘍体積に対する抗体の効果を示している。

【図18B】ヒト卵巣癌系異種移植片モデル(SKOV3)における二重パラトピック抗HER2抗体の効果を図示する。図18Bは、動物の生存率に対する抗体の効果を示している。

【図19A】ヒト卵巣癌系異種移植片モデル(SKOV3)における二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。図19Aは、平均腫瘍体積に対する抗体の効果を示している。

【図19B】ヒト卵巣癌系異種移植片モデル(SKOV3)における二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。図19Bは、動物の生存率に対する抗体の効果を示している。

【図20】ヒト乳房一次細胞異種移植片モデル(HBCx-13b)における平均腫瘍体積に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。

【図21】ヒト乳房一次細胞異種移植片モデル(T226)における平均腫瘍体積に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。

【図22】ヒト乳房一次細胞異種移植片モデル(HBCx-5)における平均腫瘍体積に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。

【図23】ヒト細胞系異種移植片モデル(SKOV3)における抗HER2処置抵抗性腫瘍に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。

【図24】ヒト一次細胞異種移植片モデル(HBCx-13b)における抗HER2処置抵抗性腫瘍に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果を図示する。

【図25】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の熱安定性を図示する。図25Aは、v5019の熱安定性を図示する。図25Bは、v10000の熱安定性を図示する。図25Cは、v7091の熱安定性を図示する。

【図26】例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの熱安定性を図示する。図26Aは、v6363の熱安定性を図示する。図26Bは、v10553の熱安定性を図示する。図26Cは、v7148の熱安定性を図示する。

【図27A】HER2+細胞においてADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図27Cにおける注釈は、図27Aおよび図27Bにも適用される。図27Aは、SKBR3細胞におけるこの能力を図示する。

【図27B】HER2+細胞においてADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図27Cにおける注釈は、図27Aおよび図27Bにも適用される。図27Bは、JIMT-1細胞におけるこの能力を図示する。

【図27C】HER2+細胞においてADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図27Cは、MDA-MB-231細胞におけるこの能力を図示する。

【図27D】HER2+細胞においてADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図27Dは、WI-38細胞におけるこの能力を図示する。

【図28A】ADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図28Bにおいて示されている注釈は、図28Aにも適用される。図28Aは、SKOV3細胞において、ADCCを媒介するv5019の非フコシル化バージョンの能力をHerceptin(商標)の能力と比較している。

【図28B】ADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図28Bは、MDA-MB-231細胞において、ADCCを媒介するv5019の非フコシル化バージョンの能力をHerceptin(商標)の能

10

20

30

40

50

力と比較している。

【図28C】ADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図28Cは、ZR-75-1細胞において、ADCCを媒介するv10000およびv10000の非フコシル化バージョンの能力をHerceptin（商標）の能力と比較している。

【図29】増殖刺激リガンドの存在または不在でBT-474細胞の増殖を阻害するv5019の能力を図示する。

【図30】ヒト乳癌異種移植片モデル(HBCx13B)において、腫瘍体積に対するv5019(v7187)の非フコシル化バージョンの効果を図示する。

【図31A】HER2+腫瘍細胞に結合する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力を図示する。図31Aは、SKOV3細胞において、v6363の結合をT-DM1類似体、v6246と比較している。

10

【図31B】HER2+腫瘍細胞に結合する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力を図示する。図31Bは、JIMT-1細胞において、v6363の結合をT-DM1類似体、v6246と比較している。

【図31C】HER2+腫瘍細胞に結合する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力を図示する。図31Cは、SKOV3細胞において、数種の例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの結合を対照と比較している。

【図31D】HER2+腫瘍細胞に結合する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力を図示する。図31Dは、JIMT-1細胞において、数種の例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの結合を対照と比較している。

20

【図32】HER2³⁺(ER-PR陰性)患者由来異種移植片モデル(HBCx13b)において、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCの用量依存性腫瘍増殖阻害を図示する。図32Aは、腫瘍体積に対するv6363の効果を示しており、図32Bは、生存率に対する効果を示している。

【図33】トラスツズマブ抵抗性PDX HBCx-13b異種移植片モデルにおいて、二重パラトピック抗HER2-ADC v6363の効果を、標準治療の組み合わせと比較して図示する。図33Aは、腫瘍体積に対する処置の効果を図示しており、図33Bは、生存に対する処置の効果を図示する。

30

【図34】HER2+トラスツズマブ抵抗性乳癌細胞由来腫瘍異種移植片モデル(JIMT-1)において、二重パラトピック抗HER2-ADCの有効性を図示する。

【図35】トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来腫瘍異種移植片モデル(SKOV3)において、in vivoでの例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の有効性を図示する。図35Aは、腫瘍体積に対する処置の効果を図示しており、図35Bは、生存に対する処置の効果を図示する。

【図36】トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来腫瘍異種移植片モデル(SKOV3)において、in vivoでの例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の用量依存性有効性を図示する。

40

【図37】HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を3+、2+、または1+レベルで発現する細胞系の増殖を阻害する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力を図示する。図37Aは、選択された細胞系の増殖を阻害するv10000の能力を図示する。図37Bは、選択された細胞系の増殖を阻害するv10553の能力を図示する。

【図38】細胞系のパネルにおいて増殖を阻害するv10000およびv10553の能力の概要を示している。スラッシュでつながれた値(例えば、1/2)は、文献において報告されたものと矛盾したErbb受容体レベルを示しており; Erbb IHC値は、内部で、または文献から得た。値が報告されていない場合、その受容体量は不明であり、かつ/または報告されていない。* IHCレベルは、erBb2遺伝子発現データ(Cr

50

own BioSciences)に基づき推定されている。付番された参考文献は、下記において記載する。

【図39A】HER2+細胞においてADCCを媒介するv10000の能力を図示する。図39Aは、FaDu細胞における結果を図示する。

【図39B】HER2+細胞においてADCCを媒介するv10000の能力を図示する。図39Bは、A549細胞における結果を図示する。

【図39C】HER2+細胞においてADCCを媒介するv10000の能力を図示する。図39Cは、BxPC3細胞における結果を図示する。

【図39D】HER2+細胞においてADCCを媒介するv10000の能力を図示する。図39Dは、MiaPaca2細胞における結果を図示する。

【図40】HER2+細胞においてADCCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を図示する。図40Aは、A549細胞における結果を図示する。図40Bは、NCI-N87細胞における結果を図示する。図40Cは、HCT-116細胞における結果を図示する。

【図41A】HER2+細胞への結合に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図41Aは、BT-474細胞への結合に対する形式の効果を図示する。

【図41B】HER2+細胞への結合に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図41Bは、JIMT-1細胞への結合に対する形式の効果を図示する。

【図41C】HER2+細胞への結合に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図41Cは、MCF7細胞への結合に対する形式の効果を図示する。

【図41D】HER2+細胞への結合に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図41Dは、MCF7細胞への結合に対する形式の効果を図示する。

【図42】HER2+細胞において、抗体の内部移行に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図42Aは、BT-474細胞において、内部移行に対する効果を図示する。図42Bは、JIMT-1細胞において、内部移行に対する効果を図示する。図42Cは、MCF7細胞において、内部移行に対する効果を図示する。

【図43A】HER2+細胞において、ADCCを媒介する能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図43Aは、JIMT-1細胞における効果を図示する。

【図43B】HER2+細胞において、ADCCを媒介する能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図43Bは、MCF7細胞における効果を図示する。

【図43C】HER2+細胞において、ADCCを媒介する能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図43Cは、HER2 0/1+ MDA-MB-231乳房腫瘍細胞における効果を図示する。

【図44】増殖刺激リガンドの存在下または不在下でBT-474細胞において、HER2+腫瘍細胞増殖を阻害する抗体の能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。

【図45】SKBR3細胞の増殖を阻害する抗体の能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。

【図46A】HER2+腫瘍細胞の増殖を阻害する抗体の能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図46Aは、SKOV3細胞における増殖阻害を図示する。

【図46B】HER2+腫瘍細胞の増殖を阻害する抗体の能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図46Bは、JIMT-1細胞における増殖阻害を図示する。

【図46C】HER2+腫瘍細胞の増殖を阻害する抗体の能力に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図示する。図46Cは、MCF7細胞における増殖阻害を図示する。

【図47】SPRによって測定した場合の、異なる形式の抗HER2二重パラトピック抗

10

20

30

40

50

体の結合特性の比較を図示する。図47Aは、v6903およびv7091を用いて、異なる抗体捕捉レベルでの $k_d(1/s)$ のプロットおよび線形回帰分析を図示する。図47Bは、v6903およびv7091を用いて、異なる抗体捕捉レベルでの $KD(M)$ のプロットおよび線形回帰分析を図示する。

【0010】

図38に示される参照文献は次のとおりである：1. Labouret et al. 2012, Neoplasia 14:121-130; 2. Ghasemi et al. 2014, Oncogenesis doi:10.1038/oncsis.2014.31; 3. Gaborit et al. 2011 J Bi Chem, 286:1133-11345; 4. Kimura et al. 2006, Clin Cancer Res; 12:4925-4932; 5. Komoto et al. 2009, Canc Sci; 101:468-473; 6. Cretella et al. 2014, Molecular Cancer 13:143-155; 7. Bunn et al. 2001, Clin Cancer Res; 7:3239-3250; 8. Lewis Phillips et al. 2013, Clin Cancer Res, 20:456-468; 9. McDonagh et al. 2012, 11:582-593; 10. Coldren et al. 2006, Mol Cancer Res:521-528; 11. Cavazzoni et al. 2012 Mol Cancer, 11:91-115; 12. Li et al. 2014, Mol Cancer Res, doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0396; 13. Chmielewski et al. 2004, Immunology, 173:7647-7653; 14. Kuwada et al. 2004, Int J Cancer, 109:291-301; 15. Fujimoto-Ouchi et al. 2007, Clin Chemother Pharmacol, 59:795-805; 16. Chavez-Bianco et al. 2004, BMC Cancer, 4:59; 17. Campiglio et al. 2004, J Cellular Physiology. 198:259-268; 18. Lehmann et al. 2011, J Clin Investigation, 121:2750-2767; 19. Collins et al. 2011, Annals Oncology, 23:1788-1795; 20. Takai et al. 2005, Cancer, 104:2701-2708; 21. Rusnack et al. 2007, Cell Prolif, 40:580-594; 22. Ma et al. 2013, PLOS ONE, 8:e73261-e73261; 23. Meira et al. 2009, British J Cancer, 101:782-791; 24. Hayashi MP28-14 poster; 25. Wang et al. 2005 J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 25:326-8; 26. Makhja et al. 2010. J Clin Oncol 28:1215-1223。

【発明を実施するための形態】

【0011】

詳細な説明

HER2(ヒト上皮成長因子受容体2)発現細胞上のHER2 ECD2(細胞外ドメイン2)抗原に一価で特異的に結合する第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、HER2発現細胞上のHER2 ECD4(細胞外ドメイン4)抗原に一価で特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトとを含み、ECD2またはECD4結合性ポリペプチドコンストラクトの少なくとも1つがscFvである抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。ある特定の形態では、ECD2結合性ポリペプチドコンストラクトはscFvであり、ECD4結合性ポリペプチドコンストラクト

は F a b である。ある特定の実施形態では、E C D 2 結合性ポリペプチドコンストラクトは F a b であり、E C D 4 結合性ポリペプチドコンストラクトは s c F v である。いくつかの実施形態では、E C D 2 および E C D 4 結合性ポリペプチドコンストラクトは両方とも s c F v である。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、C H 3 配列を含む二量体 F c を有する。いくつかの実施形態では、F c は、C H 3 配列において、野生型ホモ二量体 F c に匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する 1 つまたは複数の修飾を有するヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体 C H 3 配列は、6 8 以上の融解温度 (T m) を有する。

【 0 0 1 2 】

抗原結合性コンストラクトは、i n v i t r o において、(i) 表皮成長因子またはヘレグリンによる刺激の存在下または不在下の両方において、癌細胞増殖を阻害する能力、(i i) 癌細胞において内部移行される能力、および (i i i) 抗体統制 (a n t i b o d y - d i r e c t e d) エフェクター細胞死滅 (A D C C) を媒介する能力などの抗腫瘍活性を示す。これらの i n v i t r o 活性は、裸の抗原結合性コンストラクト (すなわち、薬物または毒素にコンジュゲートされていない) と、メイタンシンにコンジュゲートされた抗原結合性コンストラクトとの両方で、H E R 2 発現の様々なレベル (1 + 、 2 + および 3 +) で観察される。

【 0 0 1 3 】

抗原結合性コンストラクトの形式 (s c F v / s c F v 、 s c F v / F a b 、 または F a b / F a b) が、その機能プロファイルの決定において重要であることを、本明細書において示す。ある特定の実施形態では、抗 H E R 2 結合性コンストラクトは、E C D 2 および E C D 4 結合性ポリペプチドコンストラクトの両方が F a b である基準二重パラトピック抗原結合性コンストラクトと比較して、H E R 2 発現腫瘍細胞によって内部移行される能力の増大を示す。E C D 2 および E C D 4 結合性ポリペプチドの両方が s c F v である一実施形態は、F a b / s c F v 形式を有する同等の親和性のコンストラクト (これも、F a b / F a b 形式を有する同等の親和性のコンストラクトよりは、効率的に内部移行される) よりも、1 + 、 2 + 、または 3 + のレベルで H E R 2 を発現する腫瘍細胞によって、より大規模に内部移行される。容易に内部移行される実施形態は、死滅をもたらすために腫瘍細胞による内部移行が必要な抗体 - 薬物コンジュゲートのための良好な候補物質である。

【 0 0 1 4 】

ある特定の実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、F a b / F a b 形式を有する同等の親和性のコンストラクトと比較して、低レベルの H E R 2 を発現する腫瘍細胞の A D C C 死滅において効力の増大を示す。一実施形態では、F a b / s c F v 形式を有する抗原結合性コンストラクトは、低レベルの H E R 2 (H E R 2 0 - 1 + または 1 +) を発現する腫瘍細胞の A D C C 死滅において、F a b / F a b 形式を有する抗 H E R 2 コンストラクト (これも、s c F v / s c F v 形式を有する抗原結合性コンストラクトよりは効力がある) よりも効力がある。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 抗原結合性コンストラクトは、グリコシル化されている。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 結合性コンストラクトは、非フコシル化されている。いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 結合性コンストラクトは、薬物にカップリングされている。いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 結合性コンストラクトは、S M C C リンカーを介してメイタンシン (D M 1) にカップリングされている。

【 0 0 1 7 】

その対象に抗 H E R 2 抗原結合性コンストラクトを投与することによって、H E R 2 + 腫瘍を有する対象を処置する方法も、本明細書において記載する。いくつかの実施形態では、腫瘍での H E R 2 発現のレベルは、2 + 以下である。いくつかの実施形態では、抗原

10

20

30

40

50

結合性コンストラクトは、メイタンシンにコンジュゲートされている。ある特定の実施形態では、腫瘍は、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、(i) HER2 3+、エストロゲン受容体陰性 (ER-)、プロゲステロン受容体陰性 (PR-)、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、(ii) HER2 3+、ER-、PR-、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、(iii) HER2 3+、ER-、PR-の侵襲性腺管癌、または(iv) HER2 2+、HER2 遺伝子増幅トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である。

【0018】

抗原結合性コンストラクトを投与することによって、腫瘍細胞の増殖を阻害するか、または腫瘍細胞を死滅させる方法も本明細書において提供する。

10

【0019】

VL領域においてY96Aの変異、およびVH領域においてT30A/A49G/L70Fの変異(Kabatに従って付番)を含む修飾ペルツズマブコンストラクトも、本明細書において提供する。一実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは、一価であり、HER2 ECD2についてペルツズマブよりも7~9倍高い親和性を有する。ある特定の実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは、Fab/Fab、Fab/scFv、またはscFv/scFv形式を有する。

【0020】

二重特異性抗原結合性コンストラクト

20

HER2に結合する二重特異性抗原結合性コンストラクトを、本明細書において提供する。二重特異性抗原結合性コンストラクトは、HER2の異なるエピトープにそれぞれ特異的に結合する2つの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、既知の抗体または抗原結合性コンストラクトから誘導されている。下記でより詳細に記載するとおり、抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、限定されないが、Fab(抗原結合性フラグメント)、scFv(一本鎖Fv)、およびsdab(シングルドメイン抗体)などのタンパク質コンストラクトであり得る。典型的には、抗原結合性コンストラクトはFcを含む。

【0021】

「抗原結合性コンストラクト」という用語は、抗原に結合し得る任意の作用物質、例えば、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。いくつかの態様では、抗原結合性コンストラクトは、対象抗原に特異的に結合するポリペプチドである。抗原結合性コンストラクトは、単量体、二量体、多量体、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド複合体；抗体、抗体断片、またはその抗原結合性断片；scFvなどであり得る。抗原結合性コンストラクトは、単一特異性、二重特異性、または多重特異性であるポリペプチドコンストラクトであり得る。いくつかの態様では、抗原結合性コンストラクトは、例えば、1つまたは複数のFcに連結されている1つまたは複数の抗原結合性構成要素(例えば、FabまたはscFv)を含み得る。抗原結合性コンストラクトのさらなる例を下記に記載し、実施例において提供する。

30

【0022】

「二重特異性」という用語は、特有の結合特異性をそれぞれ有する2つの抗原結合性部分(例えば、抗原結合性ポリペプチドコンストラクト)を有する任意の作用物質、例えば、抗原結合性コンストラクトを含むことが意図されている。例えば、第1の抗原結合性部分は、第1の抗原上のエピトープに結合し、第2の抗原結合性部分は、第2の抗原上のエピトープに結合する。「二重パラトピック」という用語は、本明細書において使用する場合、第1の抗原結合性部分および第2の抗原結合性部分が同じ抗原上の異なるエピトープに結合する二重特異性抗体を指す。二重パラトピック二重特異性抗体は、同じ抗原分子上の2種のエピトープに結合し得るか、または2個の異なる抗原分子上のエピトープに結合し得る。

40

【0023】

50

単一特異性抗原結合性コンストラクトは、1つの結合特異性を有する抗原結合性コンストラクトを指す。言い換えると、両方の抗原結合性部分が、同じ抗原上の同じエピトープに結合する。単一特異性抗原結合性コンストラクトの例には、例えばHER2に結合するトラスツズマブ、ペルツズマブが含まれる。

【0024】

抗原結合性コンストラクトは、抗体またはその抗原結合性部分であり得る。本明細書において使用する場合、「抗体」または「免疫グロブリン」は、分析物（例えば、抗原）に特異的に結合して、それを認識する1種の免疫グロブリン遺伝子もしくは複数種の免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされるポリペプチド、またはその断片を指す。認められている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、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、さらには、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として分類される。抗体または免疫グロブリンの「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体には5種の主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、これらのうちの数種は、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂にさらに分けられ得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 κ 、 λ 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、および μ と呼ばれる。

【0025】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造ユニットは、2対のポリペプチド鎖から構成されており、それぞれの対が、1本の「軽鎖」（約25kD）および1本の「重鎖」（約50~70kD）を有する。各鎖のN末端ドメインが、抗原認識を主に担う約100~110以上のアミノ酸からなる可変領域を画定している。軽鎖可変（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖ドメインを指す。IgG1重鎖は、N末端からC末端へとそれぞれVH、CH1、CH2、およびCH3ドメインから構成される。軽鎖は、N末端からC末端へとVLおよびCLドメインから構成される。IgG1重鎖は、CH1とCH2ドメインとの間にヒンジ部を含む。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンコンストラクトは、治療用ポリペプチドに接続しているIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEからの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書において提供する抗原結合性コンストラクトに存在する免疫グロブリンドメインは、ダイアボディまたはナノボディなどの免疫グロブリンベースのコンストラクトからなるか、またはそれから誘導されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の免疫グロブリンコンストラクトは、ラクダ科動物抗体などの重鎖抗体からの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供する免疫グロブリンコンストラクトは、ウシ抗体、ヒト抗体、ラクダ科動物抗体、マウス抗体、または任意のキメラ抗体などの哺乳動物抗体からの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。

【0026】

「超可変領域」または「HVR」という用語は、本明細書において使用する場合、配列中で超可変的で、かつ/または構造的に画定されるループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然の4本鎖抗体は、6つのHVR、すなわち、VHに3つ（H1、H2、H3）、およびVLに3つ（L1、L2、L3）を含む。HVRは一般に、超可変ループから、かつ/または相補性決定領域（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性を有し、かつ/または抗原認識に関係する。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。超可変領域（HVR）はまた、「相補性決定領域」（CDR）とも称され、これらの用語は本明細書において、抗原結合性領域を形成する可変領域の部分に言及する際には互換的に使用される。この特定の領域は、Kabata et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological I

10

20

30

40

50

nterest (1983)およびChothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)において記載されており、その定義は、相互に比較すると、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにも関わらず、抗体またはその変異体のCDRに言及するためのいずれの定義の適用も、本明細書において定義および使用するとおりの用語の範囲内であることが意図されている。上で参照した参照文献のそれぞれによって定義されるとおりのCDRを含む適切なアミノ酸残基を、比較として、下記の表1に示す。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列およびサイズに依存して変化する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮すると、どの残基が特定のCDRを構成しているかを日常的に決定することができる。

【0027】

本明細書において使用する場合、「一本鎖」という用語は、ペプチド結合によって線状に連結されたアミノ酸単量体を含む分子を指す。ある特定の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つは、一本鎖Fab分子、すなわち、Fab軽鎖およびFab重鎖がペプチドリンカーによって接続されて一本鎖ペプチド鎖を形成しているFab分子である。特定のそのような実施形態では、Fab軽鎖のC末端を、Fab重鎖のN末端に一本鎖Fab分子で接続する。ある特定の他の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つは、一本鎖Fv分子(scFv)である。本明細書においてより詳細に記載するとおり、scFvは、ポリペプチド鎖によって、そのC末端から重鎖(VH)の可変ドメインのN末端へと接続されている軽鎖(VL)の可変ドメインを有する。別法では、scFvは、VHのC末端がポリペプチド鎖によってVLのN末端に接続されているポリペプチド鎖を構成している。

【0028】

抗原結合性ポリペプチドコンストラクト

二重特異性抗原結合性コンストラクトは、HER2の特定のドメインまたはエピトープにそれぞれ結合する2つの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、各抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、HER2の細胞外ドメイン、例えば、ECD2またはECD4に結合する。抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、用途に応じて、例えば、FabまたはscFvであり得る。

【0029】

二重特異性抗原結合性コンストラクトの形式が、その二重特異性抗原結合性コンストラクトの機能的特性を決定する。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、scFv-Fab形式を有する(すなわち、一方の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがscFvであり、他方の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがFabであり、Fab-scFv形式とも称される)。別の実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、scFv-scFv形式を有する(すなわち、両方の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがscFvである)。

【0030】

「Fab断片」(抗原結合性断片とも称される)は、軽鎖の定常ドメイン(CL)および重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を、それぞれ軽鎖および重鎖上の可変ドメインVLおよびVHと共に含む。可変ドメインは、抗原結合性に関係する相補性決定ループ(CDR、超可変領域とも称される)を含む。Fab'断片は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域からの1個または複数個のシステインを含む数個の残基が付加していることによって、Fab断片とは異なる。

【0031】

「一本鎖Fv」または「scFv」は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインが、一本鎖ポリペプチド鎖で存在する。一実施形態では、Fvポリペプチドは、VHとVLドメインとの間に、そのscFvが、抗原結合について所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvの総説については、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moor

10

20

30

40

50

e eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。HER2抗体scFv断片は、WO93/16185；米国特許第5,571,894号；および米国特許第5,587,458号において記載されている。

【0032】

「シングルドメイン抗体」または「sdAb」形式は、個別の免疫グロブリンドメインである。sdAbは、かなり安定していて、抗体のFc鎖との融合パートナーとして発現が容易である(Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". Appl. Microbiol Biotechnol. 77(1): 13-22)。

10

【0033】

抗原結合性コンストラクトの形式および機能

2つの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを有し、その第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがHER2 ECD2に特異的に結合し、その第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがHER2 ECD4に特異的に結合する二重パラトピックHER2抗原結合性コンストラクトを本明細書において提供する。抗原結合性コンストラクトの形式は、第1または第2の抗原結合性ポリペプチドの少なくとも1つがscFvであるような形式である。抗原結合性コンストラクトの形式は、scFv-scFv、またはFab-scFv、またはscFv-Fabであり得る(それぞれ、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト-第2の抗原結合性ポリペプチド)。

20

【0034】

ある特定の実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、in vitroにおいて、(i)表皮成長因子またはヘレグリンによる刺激の存在下または不在下の両方において、癌細胞増殖を阻害する能力、(ii)癌細胞において内部移行される能力(HER2抗原に結合して、内部移行されることによって)、および(iii)抗体統制エフェクター細胞死滅(ADCC)を媒介する能力などの抗腫瘍活性を示す。これらのin vitro活性は、裸の抗原結合性コンストラクトと、メイタンシンにコンジュゲートされた抗原結合性コンストラクトとの両方で、HER2発現の様々なレベル(1+、2+および3+)で観察される。

30

【0035】

本明細書における例は、抗原結合性コンストラクトの形式(scFv/scFv、scFv/Fab、またはFab/Fab)が、その機能プロファイルの決定において重要であることを示している。ある特定の実施形態では、抗HER2結合性コンストラクトは、ECD2およびECD4結合性ポリペプチドコンストラクトの両方がFabである基準抗原結合性コンストラクトと比較して、HER2発現腫瘍細胞によって内部移行される能力の増大を示す。抗HER2抗原結合性コンストラクトの内部移行の程度は、ECD2またはECD4について的一方または両方の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの親和性を増大させることによってさらに改善されることが企図される。ECD2およびECD4結合性ポリペプチドの両方がscFvである一実施形態は、Fab/scFv形式を有する同等の親和性のコンストラクト(これも、Fab/Fab形式を有する同等の親和性のコンストラクトよりは効率的に内部移行される)よりも、1+、2+、または3+のレベルでHER2を発現する腫瘍細胞によって、より大規模に内部移行される。容易に内部移行される実施形態は、死滅をもたらすために腫瘍細胞による内部移行が必要な抗体-薬物コンジュゲートのための良好な候補物質である。逆に、ある特定の実施形態では、容易に内部移行されない抗原結合性コンストラクトが、Fab/Fab形式を有する同等の親和性のコンストラクトと比較して、低レベルのHER2を発現する腫瘍細胞のADCC死滅において効力の増大を示す。一実施形態では、Fab/scFv形式を有する抗原結合性コンストラクトは、低レベルのHER2(HER2 0-1+または1+)を発現する

40

50

腫瘍細胞のADCC死滅において、Fab/Fab形式を有する抗HER2コンストラクト（これも、scFv/scFv形式を有する抗原結合性コンストラクトよりは効力がある）よりも効力がある。いくつかの実施形態のADCC効力の増強は、1）低HER2受容体密度を有する細胞に積極的に結合し、続いて、ターゲット細胞表面上でHER2受容体をクラスター化し、下流の細胞媒介性死滅を媒介するそれらの能力の増大；および/または2）（内部移行をもたらすのではなく）細胞表面上に残存するそれらの能力の増大によるものであり得；したがって、それらは、細胞媒介性エフェクター死滅にさらに利用可能である。

【0036】

HER2

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、HER2のECD2およびECD4に結合する抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを有する。

【0037】

「ErbB2」および「HER2」という表現は、本明細書において互換的に使用され、例えば、Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) および Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) において記載されているヒトHER2タンパク質を指す (Genebank 受入番号 X03363)。「erbB2」および「neu」という用語は、ヒトErbB2タンパク質をコードする遺伝子を指す。p185またはp185neuは、neu遺伝子のタンパク質産生物を指す。

【0038】

HER2はHER受容体である。「HER受容体」は、ヒト上皮成長因子受容体(HER)ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、これには、EGFR、HER2、HER3、およびHER4受容体が含まれる。HER受容体は一般に、HERリガンドに結合し得る細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化され得る複数のチロシン残基を収容しているカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含むであろう。「HERリガンド」とは、HER受容体に結合し、かつ/またはそれを活性化するポリペプチドを意味する。

【0039】

HER2の細胞外(エクト)ドメインは、4つのドメイン、すなわち、ドメインI(ECD1、アミノ酸残基約1~195)、ドメインII(ECD2、アミノ酸残基約196~319)、ドメインIII(ECD3、アミノ酸残基約320~488)、およびドメインIV(ECD4、アミノ酸残基約489~630)(シグナルペプチドを除いての残基付番)を含む。Garrett et al. Mol. Cell. 11:495-505 (2003)、Cho et al. Nature 421:756-760 (2003)、Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)、Tse et al. Cancer Treat Rev. 2012 Apr;38(2):133-42 (2012)、または Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993)を参照されたい。

【0040】

HER2の配列は、次のとおりであり；ECD範囲は、ドメインI：1~165；ドメインII：166~322；ドメインIII：323~488；ドメインIV：489~607である。

10

20

30

40

```

1 tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmlrhlyqg cqvvqgnlel tylptnasls flqdiqevqg
61 yvliahnqvr qvplqrlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spggrlrelql
121 rslteilkgg vliqrnpqlc yqdtilwkdi fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmkgs
181 rcwgessedc qsltrtvacg gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc laclhfnhsg
241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpegrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhngev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehltre vravtsaniq efagckkifg slafllpesfd
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdsldpl svfqnlqvgr grilhnngays
421 ltlqglgisw lglrslrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqlfrnphqa llhtanrped
481 ecvgeglach qlcarghewg pgptqcvncs qflrgqecve ecrvlqglpr eyvnrhclp
541 chpecqpqng svtcfqpead qcvacahykd ppfcvarcps gvkpdlsymp iwkfpedega
601 cqpccpin (SEQ ID NO:349)

```

10

【 0 0 4 1 】

「エピトープ 2 C 4」は、抗体 2 C 4 が結合する H E R 2 の細胞外ドメインの領域である。エピトープ 2 C 4 は、H E R 2 の細胞外ドメインのドメイン I I からの残基を含む。2 C 4 およびペルツズマブは、ドメイン I、I I、および I I I の接続部で H E R 2 の細胞外ドメインに結合する。Franklin et al. Cancer Cell 5 : 3 1 7 - 3 2 8 (2 0 0 4)。2 C 4 エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1 9 8 8) において記載されているアッセイなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、当技術分野で公知の方法を使用して、その抗体が H E R 2 の 2 C 4 エピトープに結合するかどうかを評価するために、エピトープマッピングを行うことができ、かつ/または H E R 2 のどのドメイン (複数可) が抗体に結合するかを調べるために、抗体 - H E R 2 構造を研究することができる (Franklin et al. Cancer Cell 5 : 3 1 7 - 3 2 8 (2 0 0 4))。

20

【 0 0 4 2 】

「エピトープ 4 D 5」は、抗体 4 D 5 (A T C C C R L 1 0 4 6 3) およびトラストズマブが結合する H E R 2 の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、H E R 2 の膜貫通ドメインに近く、かつ H E R 2 のドメイン I V 内にある。4 D 5 エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1 9 8 8) において記載されているアッセイなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、その抗体が H E R 2 の 4 D 5 エピトープ (例えば、両端を含めてほぼ残基 5 2 9 からほぼ残基 6 2 5 の領域にある任意の 1 個または複数個の残基 (米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 1 8 8 9 9 号の図 1 を参照されたい)) に結合するかどうかを評価するために、エピトープマッピングを行うことができる。

30

40

【 0 0 4 3 】

「特異的に結合する」、「特異的結合」、または「選択的結合」は、その結合がその抗原について選択的であり、望ましくないか、または非特異的相互作用とは区別され得ることを意味する。特異的抗原決定基に結合する抗原結合性コンストラクトの能力は、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) または当業者が熟知する他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴 (S P R) 技術 (B I A c o r e 機器で分析) (Liljeblad et al, Glyco J 1 7 , 3 2 3 - 3 2 9 (2 0 0 0))、および従来の結合アッセイ (Heeley, Endocr Res 2 8 , 2 1 7 - 2 2 9 (2 0 0 2)) によって測定することができる。一実施形態では、例えば、S P R によって測定した

50

場合、無関係タンパク質への抗原結合性部分の結合規模は、その抗原への抗原結合性コンストラクトの結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、その抗原に結合する抗原結合性コンストラクト、またはその抗原結合性部分を含む抗原結合性分子は、 $1\ \mu\text{M}$ 未満、 $100\ \text{nM}$ 未満、 $10\ \text{nM}$ 未満、 $1\ \text{nM}$ 未満、 $0.1\ \text{nM}$ 未満、 $0.01\ \text{nM}$ 未満、または $0.001\ \text{nM}$ 未満（例えば、 $10^{-8}\ \text{M}$ 以下、例えば、 $10^{-8}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。

【0044】

「ヘレグリン」（HRG）は、本明細書において使用する場合、米国特許第5,641,869号またはMarchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)において開示されているとおりのヘレグリン遺伝子産物によってコードされるポリペプチドを指す。ヘレグリンの例には、ヘレグリン-1、ヘレグリン-2、およびヘレグリン-3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); および米国特許第5,641,869号); neu分化因子(NDF) (Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)); アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); グリア成長因子(GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); 感覚・運動ニューロン由来因子(SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); -ヘレグリン(Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997))が含まれる。この用語は、そのEGF様ドメイン断片（例えば、HRG 1177-244）など、天然の配列HRGポリペプチドの生物学的に活性な断片および/またはアミノ酸配列変異体を含む。

【0045】

「HER活性化」または「HER2活性化」は、任意の1種または複数種のHER受容体またはHER2受容体の活性化またはリン酸化を指す。一般に、HER活性化は、シグナル伝達をもたらす（例えば、HER受容体または基質ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化するHER受容体の細胞内キナーゼドメインに起因するもの）。HER活性化は、対象HER受容体を含むHER二量体へのHERリガンドの結合によって媒介され得る。HER二量体へのHERリガンドの結合は、その二量体中のHER受容体の1つまたは複数のキナーゼドメインを活性化させ得、それによって、HER受容体の1つもしくは複数中のチロシン残基のリン酸化、および/またはAktもしくはMAPK細胞内キナーゼなどの追加の基質ポリペプチド（複数可）中のチロシン残基のリン酸化をもたらす。

【0046】

誘導型抗原結合性ポリペプチドコンストラクト

抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、ドメインの種類に関わらず、公知の抗HER2抗体または抗HER2結合性ドメインから誘導され得る。ドメインの種類例には、Fab断片、scFv、およびsdAbが含まれる。さらに、公知の抗HER2抗体の抗原結合性部分または結合性ドメインがFabであるならば、そのFabを、scFvに変換することができる。同様に、公知の抗HER2抗体の抗原結合性部分または結合性ドメインがscFvであるならば、そのscFvをFabに変換することができる。抗原結合性ドメインの種類を変換する方法は、当技術分野で公知である（例えば、例えばZhou et al. (2012) Mol Cancer Ther 11:1167-1476に記載のscFvをFab形式に変換するための方法を参照されたい。そこに記載の方法は、参照によって組み込まれる）。

【0047】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、ECD2またはECD4に結合する公知の抗HER2抗体に由来し得る。本明細書の他の箇所において記載しているとおり、ECD2またはECD4に結合する抗体は、当技術分野で公知であり、それらには、例えば、2C4またはペルツズマブ（ECD2に結合する）、4D5またはトラスツズマブ（E

10

20

30

40

50

C D 4 に結合する) が含まれる。H E R 2 の E C D 2 または E C D 4 に結合する他の抗体も、当技術分野において、例えば、W O 2 0 1 1 / 1 4 7 9 8 2 (G e n m a b A / S) において記載されている。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、H E R 2 の E C D 4 への抗体 4 D 5 またはトラスツズマブの結合を 5 0 % 以上遮断する抗体から誘導されている。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、H E R 2 の E C D 2 への抗体 2 C 4 またはペルツズマブの結合を 5 0 % 以上遮断する抗体から誘導されている。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、H E R 2 の E C D 2 への抗体 2 C 4 またはペルツズマブの結合を 3 0 % 以上遮断する抗体から誘導されている。

10

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、トラスツズマブまたはペルツズマブの F a b 断片から誘導されている。一実施形態では、抗原結合性ポリペプチドは、s c F v から誘導されている。

【 0 0 5 0 】

ある特定の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドは、これらの抗体のヒト化またはキメラバージョンから誘導されている。

【 0 0 5 1 】

非ヒト(例えば、げっ歯類)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大部分について、ヒト化抗体は、そのレシピエントの超可変領域からの残基が所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域からの残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(F R)残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために成される。一般に、ヒト化抗体は、その超可変ループのすべてか、または実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつその F R のすべてか、または実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列の F R である少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は任意選択によりまた、免疫グロブリン定常領域(F c)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、J o n e s e t a l . , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 (1 9 8 8) ; および P r e s t a , C u r r . O p . S t r u c t . B i o l . 2 : 5 9 3 - 5 9 6 (1 9 9 2) を参照されたい。

20

30

【 0 0 5 2 】

ヒト化 H E R 2 抗体には、参照によって本明細書に明らかに組み込まれる米国特許第 5 , 8 2 1 , 3 3 7 号の表 3 において記載されているとおりの h u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7、および h u M A b 4 D 5 - 8 またはトラスツズマブ(H E R C E P T I N (登録商標)) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 1 8 8 9 9 号において記載されているとおりのヒト化 5 2 0 C 9 (W O 9 3 / 2 1 3 1 9) および 2 0 ' ヒト化 2 C 4 抗体が含まれる。

40

【 0 0 5 3 】

親和性成熟

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、親和性成熟を使用する公知の H E R 2 結合抗体から誘導されている。

【 0 0 5 4 】

50

その同族抗原についての抗原結合性ポリペプチドの親和性を増大させることが望ましい場合、その抗原についての抗原結合性ポリペプチドの親和性を増大させるために、当技術分野で公知の方法を使用することができる。そのような方法の例は、次の参照文献において記載されている：Birtalan et al. (2008) JMB 377, 1518 - 1528; Gerstner et al. (2002) JMB 321, 851 - 862; Kelley et al. (1993) Biochem 32(27), 6828 - 6835; Li et al. (2010) JBC 285(6), 3865 - 3871、およびVajdos et al. (2002) JMB 320, 415 - 428。

【0055】

HER2抗原結合性ドメインを親和性成熟させるための例示的な方法の一つは、次のとおり記載される。トラスツズマブ/HER2(PDBコード1N8Z)複合体およびペルツズマブ/HER2複合体(PDBコード1S78)の構造をモデリングのために使用する。分子動力学(MD)を使用して、水性環境下におけるWT複合体の固有動的性質を評価することができる。柔軟なバックボーンと一緒に平均場およびデッドエンド排除(dead-end elimination)法を使用して、スクリーニングする変異体のためのモデル構造を最適化および調製することができる。パッキングの後に、接触密度、クラッシュスコア、疎水性、および静電を含むいくつかの特徴をスコアリングすることとなる。一般化Born法は、溶媒環境の作用の正確なモデリングを可能にし、残基種類を変更するためのタンパク質中の特定の位置を代替の残基種類に変異させた後の自由エネルギー差を計算する。接触密度およびクラッシュスコアは、有効なタンパク質パッキングの重大な局面である相補性の測定値を提供するであろう。このスクリーニング手順は、知識ベースの可能性、さらには、対の残基相互作用エネルギーおよびエントロピー計算値に基づくカップリング分析スキームを利用する。HER2結合を増強することが知られている文献上の変異、およびそれらの組み合わせを次の表にまとめる：

表A4. トラスツズマブ-HER2系についてHER2への結合を増大させることが知ら

れているトラスツズマブ変異
 変異 報告された改善

H_D102W (H_D98W)	3.2X
H_D102Y	3.1X
H_D102K	2.3X
H_D102T	2.2X
H_N55K	2.0X
H_N55T	1.9X
L_H91F	2.1X
L_D28R	1.9X

表A5. ペルツズマブ-HER2系についてHER2への結合を増大させることが知ら
 れているペルツズマブ変異

変異 報告された改善

L_I31A 1.9X

L_Y96A 2.1X

L_Y96F 2.5X

H_T30A 2.1X

H_G56A 8.3X

H_F63V 1.9X

10

【0056】

抗原結合性コンストラクトのFc

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、Fc、例えば、二量体Fcを含む。

【0057】

本明細書における「Fcドメイン」または「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を画定するために使用されている。この用語には、天然配列Fc領域および変異型Fc領域が含まれる。本明細書において別段の指定がない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991において記載されているとおり、EUインデックスとも呼ばれるEU付番システムに従っている。二量体Fcの「Fcポリペプチド」は、本明細書において使用する場合、二量体Fcドメインを形成する2つのポリペプチドの一方、すなわち、安定的に自己会合し得る免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチドを指す。例えば、二量体IgG FcのFcポリペプチドは、IgG CH2およびIgG CH3定常ドメイン配列を含む。

20

【0058】

Fcドメインは、CH3ドメインか、またはCH3およびCH2ドメインのいずれかを含む。CH3ドメインは、二量体Fcの2つのFcポリペプチドのそれぞれから1つで、2つのCH3配列を含む。CH2ドメインは、二量体Fcの2つのFcポリペプチドのそれぞれから1つで、2つのCH2配列を含む。

30

【0059】

いくつかの態様では、Fcは、少なくとも1つまたは2つのCH3配列を含む。いくつかの態様では、Fcは、1つまたは複数のリンカーを用いて、または用いることなく、第1の抗原結合性コンストラクトおよび/または第2の抗原結合性コンストラクトにカップリングされている。いくつかの態様では、Fcは、ヒトFcである。いくつかの態様では、Fcは、ヒトIgGまたはIgG1 Fcである。いくつかの態様では、Fcは、ヘテロ二量体Fcである。いくつかの態様では、Fcは、少なくとも1つまたは2つのCH2配列を含む。

40

【0060】

いくつかの態様では、Fcは、CH3配列の少なくとも一方に1つまたは複数の修飾を含む。いくつかの態様では、Fcは、CH2配列の少なくとも一方に1つまたは複数の修飾を含む。いくつかの態様では、Fcは、単一ポリペプチドである。いくつかの態様では、Fcは、複数ペプチド、例えば、2つのポリペプチドである。

【0061】

いくつかの態様では、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/CA

50

2012/050780において記載されているFcである。

【0062】

修飾CH3ドメイン

いくつかの態様では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、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ポリペプチドおよび第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Fcポリペプチドおよび1つの第2のFc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Fcポリペプチドは、第1のCH3配列を含み、第2のFcポリペプチドは、第2のCH3配列を含む。

10

【0063】

非対称に導入された1つまたは複数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。本明細書において使用する場合、「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および第2のCH3配列が優先的に対になって、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および第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および第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。

20

【0064】

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

【0065】

典型的には、Fcは、二量化し得る2つの連続重鎖配列(AおよびB)を含み得る。いくつかの態様では、Fcの一方または両方の配列は、EU付番を使用すると、次の位置：L351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400、および/またはN390に1つまたは複数の変異または修飾を含む。いくつかの態様では、Fcは、表Xに示されている変異配列を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体1 A~Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体2 A~Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体3 A~Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体4 A~Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体5 A~Bの変異を含む。

30

表A：IgG1 Fc配列

ヒトIgG1 Fc配列 231~447 (EU付番)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 350)	
変異IgG1 Fc配列 (231-447)	鎖	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

10

20

【 0 0 6 6 】

第1および第2のCH3配列は、全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231~447に関して、本明細書において記載したとおりのアミノ酸変異を含み得る。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がF405およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT394位にアミノ酸修飾を有する修飾CH3ドメインを含む。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351Y、F405A、およびY407Vから選択される1つまたは複数のアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366L、T366I、K392L、K392M、およびT394Wから選択される1つまたは複数のアミノ酸修飾を有する修飾CH3ドメインを含む。

30

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351、F405およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366、K392、およびT394位にアミノ酸修飾を有し、第1または第2のCH3配列の一方がQ347位にアミノ酸修飾をさらに含み、他方のCH3配列がK360位にアミノ酸修飾をさらに含む修飾CH3ドメインを含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351、F405、およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366、K392、およびT394位にアミノ酸修飾を有し、第1または第2のCH3配列の一方がQ347位にアミノ酸修飾をさらに含み、他方のCH3配列がK360位にアミノ酸修飾をさらに含み、上記CH3配列の一方または両方がアミノ酸修飾T350Vをさらに含む修飾CH3ドメインを含む。

40

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351、F405、およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366、K392、およびT394位にアミノ酸修飾を有し、上記第1または第2のCH3配列の一方がD399RまたはD399Kのアミノ酸修飾をさらに含み、他方のCH3配列がT411E、T411D、K409E、K409D、K392E、およびK392Dの1つまたは複数を含む修飾CH3ドメインを含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351、F405、およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366、K392、およびT394位にアミノ酸修飾を有し、上記第1または第2のCH3

50

配列の一方がD399RまたはD399Kのアミノ酸修飾をさらに含み、他方のCH3配列がT411E、T411D、K409E、K409D、K392E、およびK392Dの1つまたは複数を含み、上記CH3配列の一方または両方がアミノ酸修飾T350Vをさらに含む修飾CH3ドメインを含む。

【0069】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、第1のCH3配列がL351、F405、およびY407位にアミノ酸修飾を有し、第2のCH3配列がT366、K392、およびT394位にアミノ酸修飾を有し、上記CH3配列の一方または両方がT350Vのアミノ酸修飾をさらに含む修飾CH3ドメインを含む。

【0070】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、次のアミノ酸修飾を含む修飾CH3ドメインを含む(ここで、「A」は、第1のCH3配列に対するアミノ酸修飾を表し、「B」は、第2のCH3配列に対するアミノ酸修飾を表す): A: L351Y__F405A__Y407V、B: T366L__K392M__T394W、A: L351Y__F405A__Y407V、B: T366L__K392L__T394W、A: T350V__L351Y__F405A__Y407V、B: T350V__T366L__K392L__T394W、A: T350V__L351Y__F405A__Y407V、B: T350V__T366L__K392M__T394W、A: T350V__L351Y__S400E__F405A__Y407V、および/またはB: T350V__T366L__N390R__K392M__T394W。

【0071】

1つまたは複数の非対称アミノ酸修飾は、そのヘテロ二量体CH3ドメインが野生型ホモ二量体CH3ドメインに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進し得る。一実施形態では、1つまたは複数の非対称アミノ酸修飾は、そのヘテロ二量体Fcドメインが野生型ホモ二量体Fcドメインに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Fcドメインの形成を促進する。一実施形態では、1つまたは複数の非対称アミノ酸修飾は、そのヘテロ二量体Fcドメインが、示差走査熱分析研究における融解温度(Tm)によって観察される安定性を有し、かつその融解温度が、対応する対称な野生型ホモ二量体Fcドメインで観察される融解温度から4 以内であるヘテロ二量体Fcドメインの形成を促進する。いくつかの態様では、Fcは、CH3配列の少なくとも1つにおいて、野生型ホモ二量体Fcに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する1つまたは複数の修飾を含む。

【0072】

一実施形態では、CH3ドメインの安定性は、CH3ドメインの融解温度を測定することによって、例えば、示差走査熱分析(DSC)によって評価することができる。したがって、さらなる一実施形態では、CH3ドメインは、約68 以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約70 以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約72 以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約73 以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約75 以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約78 以上の融解温度を有する。いくつかの態様では、二量化CH3配列は、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84、または85 以上の融解温度(Tm)を有する。

【0073】

いくつかの実施形態では、修飾CH3配列を含むヘテロ二量体Fcは、発現産物において、ホモ二量体Fcと比較して、少なくとも約75%の純度で形成され得る。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約80%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約85%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約90%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約95%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約97%超の純度で形成される。いくつかの態様では、Fcは、発現された場合に、約75、76、77、78

10

20

30

40

50

、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成されるヘテロ二量体である。いくつかの態様では、Fcは、単細胞によって発現された場合に、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成されるヘテロ二量体である。

【0074】

ヘテロ二量体Fc形成を促進するために単量体Fcポリペプチドを修飾するための追加の方法は、国際特許公開WO96/027011(knobs into holes)、Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, electrostatic design to achieve selective heterodimerization)、Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel; 23(4): 195-202, strand exchange engineered domain (SEED) technology)、およびLabrijn et al. [Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-50]において記載されている。

10

20

【0075】

CH2ドメイン

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトのFcは、CH2ドメインを含む。FcのCH2ドメインの一例は、表Aにおいて示した配列のアミノ酸231~340である。複数のエフェクター機能が、抗体のFcに結合するFc受容体(FcR)によって媒介される。

30

【0076】

「Fc受容体」および「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載するために使用される。例えば、FcRは、天然配列ヒトFcRであり得る。一般に、FcRは、IgG抗体に結合するもの(ガンマ受容体)であり、それらには、それらの受容体の対立遺伝子変異型およびオルタナティブスプライシング型を含むFcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体が含まれる。FcRII受容体には、主にその細胞質ドメインにおいて異なる同様のアミノ酸配列を有するFcRIIA(「活性化受容体」)およびFcRIIB(「阻害性受容体」)が含まれる。他のアイソタイプの免疫グロブリンも、ある特定のFcRに結合し得る(例えば、Janeway et al., Immunobiology: the immune system in health and disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)を参照されたい)。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含有する。阻害性受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容抑制チロシンモチーフ(ITIM)を含有する(Daeron, Amur Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)において総説されている)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunome thods 4: 25-34 (1994); およびde Haas et al.,

40

50

J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)において総説されている。本明細書において「FcR」という用語には、将来同定されるものを含む他のFcRが内包される。この用語はまた、胎児への母系IgGの移行を担う新生児型受容体FcRnを包含する(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976); およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

【0077】

CH2ドメインにおける修飾は、FcへのFcRの結合に影響を及ぼし得る。種々のFcガンマ受容体についてのFcの親和性を選択的に変更するために、Fc領域におけるいくつかのアミノ酸修飾が、当技術分野で公知である。いくつかの態様では、Fcは、Fc-ガンマ受容体の選択的結合を促進する1つまたは複数の修飾を含む。

10

【0078】

FcへのFcRの結合を変更する例示的な変異を、下記に列挙する。

S298A/E333A/K334A、S298A/E333A/K334A/K326A(Lu Y, Vemes 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(Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon 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);

20

F243L(Stewart R, Thom G, Levens M, et al. Protein Eng Des Sel. 2011 Sep;24(9):671-8)、S298A/E333A/K334A(Shields RL, Namek 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);

30

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、ならびに参照によって本明細書に組み込まれるWO2011/120134およびWO2011/120135に列挙されている他の変異。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、283頁において変異を列挙している。

40

【0079】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、抗原に結合する抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと;同じ二量体Fcを含まない抗原結合性コンストラクトと比較して、安定性および製造の容易さなどの優れた生物物理学的特性を有する二量体Fcとを含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、1つまたは複数

50

の非対称アミノ酸修飾を含む。例示的な非対称変異が、国際特許出願 P C T / C A 2 0 1 4 / 0 5 0 5 0 7 において記載されている。

【 0 0 8 0 】

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では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、エフェクター機能を媒介するその能力を改善するための修飾を含む。そのような修飾は、当技術分野で公知であり、それらには、非フコシル化、または A D C C のための受容体、主に F C G R 3 a の活性化および C D C のための C 1 q に向けての F c の親和性の操作が含まれる。次の表 B 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。

10

【 0 0 8 1 】

アミノ酸配列を変更することなく、F c 糖鎖形成部位 (E U 付番で A s n 2 9 7) 上にフコースをほとんど有さないか、またはフコースを有さない抗原結合性コンストラクトを生成する方法は、当技術分野で周知である。G l y m a X (登録商標) 技術 (P r o B i o G e n A G) は、フコース生合成の細胞経路を偏向させる酵素のための遺伝子を、抗原結合性コンストラクト生成のために使用される細胞に導入することに基づく。これによって、抗原結合性コンストラクト産生細胞による N 連結抗体炭水化物部分への糖「フコース」の付加が妨げられる (v o n H o r s t e n e t a l . (2 0 1 0) G l y c o b i o l o g y . 2 0 1 0 D e c ; 2 0 (1 2) : 1 6 0 7 - 1 8) 。フコシル化のレベルを低下させた抗原結合性コンストラクトを得るための別の手法を、米国特許第 8 , 4 0 9 , 5 7 2 号において見出すことができ、これは、抗原結合性コンストラクト上でより低いレベルのフコシル化をもたらすそれらの能力について、抗原結合性コンストラクト生成のための細胞系を選択することを教示している。抗原結合性コンストラクトは、完全に非フコシル化されていてよい (検出可能なフコースを含まないことを意味する) 、または部分的に非フコシル化されていてよい (その単離抗体が、哺乳動物発現系によって産生された同様の抗体で通常検出されるフコースの量の 9 5 % 未満、8 5 % 未満、7 5 % 未満、6 5 % 未満、5 5 % 未満、4 5 % 未満、3 5 % 未満、2 5 % 未満、1 5 % 未満、または 5 % 未満を含有することを意味する) 。

20

【 0 0 8 2 】

したがって、一実施形態では、本明細書に記載のコンストラクトは、エフェクター機能の改善をもたらす、表 B において記載したとおりの 1 つまたは複数のアミノ酸修飾を含む二量体 F c を包含し得る。別の実施形態では、コンストラクトは、エフェクター機能を改善するために非フコシル化されていてよい。

30

表 B : C H 2 ドメインおよびエフェクター機能操作

参照文献	変異	効果
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	非フコシル化	ADCCの増大
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	ADCCの増大
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	ADCCの増大
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	ADCCの増大
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	ADCCの増大
Stewart, 2011	F243L	ADCCの増大
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	ADCCの増大
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	ADCCの増大
Lazar, 2006	S239D/I332E	ADCCの増大
Bowles, 2006	AME-D, 変異の明記なし	ADCCの増大
Heider, 2011	37.1, 変異の開示なし	ADCCの増大
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	CDCの増大

10

20

【0083】

Fc Rおよび/または補体結合および/またはエフェクター機能を低減するFc修飾が、当技術分野で公知である。最近の刊行物において、抗体を操作してエフェクター活性を低減またはサイレンシングさせるために使用されている戦略が記載されている (Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691、およびStrohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249を参照されたい)。これらの戦略には、糖鎖形成の修飾によるエフェクター機能の低減、IgG2/IgG4骨格の使用、またはヒンジ部もしくはそのFcのCH2領域への変異の導入が含まれる。例えば、米国特許出願公開第2011/0212087号(Strohl)、国際特許公開WO2006/105338(Xencor)、米国特許出願公開第2012/0225058号(Xencor)、米国特許出願公開第2012/0251531号(Genentech)、およびStrop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219)は、FcへのFc Rまたは補体結合を低減するための具体的な修飾を記載している。

30

40

【0084】

FcへのFc Rまたは補体結合を低減するための公知のアミノ酸修飾の具体的で非限定的な例には、次の表に特定されているものが含まれる：

表C：FcへのFc Rまたは補体結合を低減するための修飾

会社	変異
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4コンボ
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	大腸菌産生、非グリコシル化
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	ヒンジ変異体、おそらく C226S/P230S

10

20

【 0 0 8 5 】

一実施形態では、Fcは、上記の表において特定した少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234、L235、またはD265の少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234、L235、およびD265にアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、アミノ酸修飾L234A、L235A、およびD265Sを含む。

30

【 0 0 8 6 】

リンカーおよびリンカーポリペプチド

抗原結合性コンストラクトの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトのそれぞれは、相互に共有結合を形成し得るリンカーポリペプチドに機能的に連結されている。本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトの内容において、2個の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、Fab-scFvまたはscFv-scFv形式であるが、第1および第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトをリンカーポリペプチドと共に含む抗原結合性コンストラクトの空間的コンホメーションは、パイン分解によって生じるF(ab')₂断片のパラトープの相対的空間的コンホメーションに相似している。

40

【 0 0 8 7 】

したがって、F(ab')₂断片のパラトープの相対的空間的コンホメーションを維持し、かつIgGのコアヒンジ部におけるジスルフィド結合に相当する共有結合を形成し得るように、リンカーポリペプチドを選択する。適切なリンカーポリペプチドには、例えば、IgG1、IgG2、またはIgG4からのものなどのIgGヒンジ領域が含まれる。これらの例示的なリンカーの修飾バージョンも使用することができる。例えば、IgG4ヒンジ部の安定性を改善するための修飾は、当技術分野で公知である（例えば、Labrijnら(2009) Nature Biotechnology 27、767~771

50

を参照されたい)。

【0088】

一実施形態では、リンカーポリペプチドは、本明細書に記載のとおり骨格、例えば、Fcに機能的に連結されている。いくつかの態様では、Fcは、1つまたは複数のリンカーで1つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトにカップリングされている。いくつかの態様では、Fcは、リンカーによって、各抗原結合性ポリペプチドの重鎖にカップリングされている。

【0089】

他の実施形態では、リンカーポリペプチドは、Fc以外の骨格に機能的に連結されている。いくつかの代替タンパク質または分子ドメインが当技術分野で公知であり、2個の異なる抗原結合性ポリペプチドからなる選択的対を形成するために使用することができる。

例は、一緒に選択的対になるFosおよびJunなどのロイシンジッパードメインである[S A Kostelny, M S Cole, and J Y Tso. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol 1992 148:1547-53; Bemd J. Wranik, Erin L. Christensen, Gabriele Schaefer, Janet K. Jackman, Andrew C. Vendel, and Dan Eaton. LUZ-Y, a Novel Platform for the Mammalian Cell Production of Full-length IgG-bispecific Antibodies J. Biol. Chem. 2012 287: 43331-43339]。別法では、バルナーゼ-バルスターの対[Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P., and Pliickthun, A. (2003). Design of multivalent complexes using the bamase*barstar module. Nat Biotechnol 21, 1486-1492]、DNA鎖対[Zahida N. Chaudri, Michael Bartlett-Jones, George Panayotou, Thomas Klonisch, Ivan M. Roitt, Torben Lund, Peter J. Delves, Dual specificity antibodies using a double-stranded oligonucleotide bridge, FEBS Letters, Volume 450, Issues 1-2, 30 April 1999, Pages 23-26]、分割蛍光タンパク質対[Ulrich Brinkmann, Alexander Haas. Fluorescent antibody fusion protein, its production and use, WO 2011135040 A1]などの他の選択的対リング分子対を使用することもできる。

【0090】

解離定数 (K_D) および最大結合 (B_{max})

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、限定されないが、解離定数および最大結合を含む機能特性によって記載される。

【0091】

「解離定数 (K_D)」という用語は、本明細書において使用する場合、特定のリガンド-タンパク質相互作用の平衡解離定数を指すことが意図されている。本明細書において使用する場合、リガンド-タンパク質相互作用は、限定されないが、タンパク質間相互作用または抗体-抗原相互作用を指す。 K_D は、より小さい構成要素 ($A + B$) へと可逆的に解離する2個のタンパク質 (例えば、 AB) の性向を測定するものであり、「オフ速度 (k_{off})」とも呼ばれる解離速度と会合速度または「オン速度 (k_{on})」の比として定義される。したがって、 K_D は、 k_{off} / k_{on} に等しく、モル濃度 (M) として表される。 K_D が小さいほど、結合の親和性は強くということになる。したがって、1m

Mの K_D は、1 nMの K_D と比較して弱い結合親和性を示している。抗原結合性コンストラクトの K_D 値は、当技術分野で十分に確立されている方法を使用して決定することができる。抗原結合性コンストラクトの K_D を決定するための方法の1つは、表面プラズモン共鳴 (SPR)、典型的には、Biacore (登録商標) システムなどのバイオセンサーシステムを使用することによる方法である。等温滴定熱量測定 (ITC) は、決定するために使用することができる別の方法である。

【0092】

抗原結合性コンストラクトの結合特性は、様々な技術によって決定することができる。そのうちの1つは、フローサイトメトリー (FACS、蛍光標識細胞分取) による、抗原を発現するターゲット細胞への結合の測定である。典型的には、そのような実験において、対象抗原を発現するターゲット細胞を、種々の濃度の抗原結合性コンストラクトと共にインキュベートし、洗浄し、抗原結合性コンストラクトを検出するための二次薬剤と共にインキュベートし、洗浄し、フローサイトメーターにおいて分析して、細胞上の検出シグナルの強度を表す中央蛍光強度 (MFI) を測定するが、その検出シグナルは、細胞に結合した抗原結合性コンストラクトの数に関連する。次いで、抗原結合性コンストラクト濃度とMFIデータとを、飽和結合式 (saturation binding equation) にフィットさせて、2つの重要な結合パラメータである B_{max} および見掛け K_D を得る。

【0093】

見掛け K_D または見掛け平衡解離定数は、最大半量の細胞結合が観察される抗原結合性コンストラクト濃度を表す。明らかに、 K_D 値が小さいほど、最大細胞結合に達するためにより低い抗原結合性コンストラクト濃度が必要であり、したがって、その抗原結合性コンストラクトの親和性は高い。見掛け K_D は、細胞上で発現される種々の受容体レベルおよびインキュベーション条件などの細胞結合実験の条件に依存しており、したがって、見掛け K_D は一般に、SPRおよびITCなどの細胞非含有分子実験から決定された K_D 値とは異なる。しかしながら、それらの異なる方法の間にも、概して良好な一致が存在する。

【0094】

「 B_{max} 」または最大結合という用語は、抗原結合性コンストラクトの飽和濃度での、細胞における最大抗原結合性コンストラクトの結合レベルを指す。このパラメータは、相対比較のための任意の単位MFIで報告し得るか、または標準曲線を使用して、細胞に結合した抗原結合性コンストラクトの数に対応する絶対値に変換することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトの B_{max} の1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2.0倍の B_{max} を示す。

【0095】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトでは、飽和濃度で、かつ B_{max} がFSAと共にはや上昇し得ないと、 B_{max} とFSAとで明白な分離が生じる。非飽和濃度では、有意性はより低い。一実施形態では、基準抗原結合性コンストラクトと比較して、抗原結合性コンストラクトの B_{max} および K_D の上昇は、ターゲット細胞上でのターゲット抗原発現のレベルに依存しない。

【0096】

いくつかの実施形態は、対応する基準抗原結合性コンストラクトと比較して、上記抗原を提示するターゲット細胞に対する B_{max} (最大結合) の上昇を示す、本明細書に記載の単離抗原結合性コンストラクトである。いくつかの実施形態では、 B_{max} の上記上昇は、対応する基準抗原結合性コンストラクトの B_{max} の少なくとも約125%である。ある特定の実施形態では、 B_{max} の上昇は、対応する基準抗原結合性コンストラクトの B_{max} の少なくとも約150%である。いくつかの実施形態では、 B_{max} の上昇は、対応する基準抗原結合性コンストラクトの B_{max} の少なくとも約200%である。いくつかの実施形態では、 B_{max} の上記上昇は、対応する基準抗原結合性コンストラクトの

10

20

30

40

50

Bmaxの約110%超である。

【0097】

エフェクター機能の増大

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、それぞれ対応する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトと比較して（すなわち、ECD2に結合する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトまたはECD4に結合する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトと比較して）、かつ/または2つの単一特異性二価抗原結合性コンストラクトの組み合わせと比較して、エフェクター機能の増大を示す。抗体「エフェクター機能」は、抗体のFcドメイン（天然配列Fcドメインまたはアミノ酸配列変異型Fcドメイン）に帰せられる生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合；補体依存性細胞傷害性（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）；抗体依存性細胞食作用（ADCP）；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどが含まれる。

10

【0098】

ADCC

したがって一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、ADCCアッセイにおいて、1+レベルでHER2を発現する細胞において、Fab-Fab形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。

【0099】

一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ADCCアッセイにおいて、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、ADCCアッセイにおいて、トラスツズマブもしくはその類似体である基準抗原結合性コンストラクト、またはトラスツズマブまたはペルツズマブ類似体の組み合わせよりも、大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、ADCCアッセイにおいて、1+以上のレベルでHER2を発現する細胞において、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、ADCCアッセイにおいて、HER2 2+/3+細胞において、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。

20

30

【0100】

内部移行

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、受容体HER2への結合によって、HER2+細胞に内部移行される。したがって、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、HER2+細胞において受容体内部移行を誘導し得る。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、3+レベルでHER2を発現する細胞において、Fab-Fab形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きいHER2内部移行を誘導する。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Fab-scFv形式であり、2+または3+レベルでHER2を発現する細胞において、Fab-Fab形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きなHER2内部移行を誘導する。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、scFv-scFv形式であり、1+、2+、または3+レベルでHER2を発現する細胞において、Fab-Fab形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きなHER2内部移行を誘導する。

40

【0101】

細胞傷害活性

二重特異性抗原結合性コンストラクトは、本明細書の他の箇所で記載されているとおりADCとして調製され得、細胞に対して細胞傷害性である。一実施形態では、二重特異性

50

抗原結合性コンストラクトADCは、HER2+乳癌細胞における細胞傷害性または細胞生存アッセイにおいて、HER2¹⁺、²⁺、^{2+/3+}、または³⁺細胞において、トラスツズマブもしくはその類似体である基準抗原結合性コンストラクト、またはT-DM1およびペルツズマブの組み合わせである基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。

【0102】

Fc Rへの結合能の増大

いくつかの実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、1種または複数種のFc Rへの、より高い結合能(R_{max})を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ホモ二量体Fcを有するv506またはv6246である基準抗原結合性コンストラクトと比較して約1.3~2倍の1種または複数種のFc Rに対するR_{max}の増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約1.3~1.8倍のCD16 Fc Rに対するR_{max}の増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約1.3~1.8倍のCD32 Fc Rに対するR_{max}の増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約1.3~1.8倍のCD64 Fc Rに対するR_{max}の増大を示す。

10

【0103】

Fc Rについての親和性の増大

本明細書において提供する二重特異性抗原結合性コンストラクトは、トラスツズマブなどの基準抗原結合性コンストラクトと比較して、Fc Rについての親和性の増大を有する。結合から生じるFc濃度の上昇は、ADCCおよび/または他の免疫エフェクターの死滅機構の増大と一致する。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、1種または複数種のFc Rについての親和性の増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトが、HER2に結合する抗原結合性ポリペプチドを含む場合、その二重特異性抗原結合性コンストラクトは、少なくとも1種のFc Rについての親和性の増大を示す。この実施形態によれば、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、CD32についての親和性の増大を示す。

30

【0105】

FcRn結合およびPKパラメータ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、FcRnに結合し得る。当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。

40

【0106】

薬物動態パラメータ

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する二重特異性抗原結合性コンストラクトは、市販の治療用抗体に匹敵する薬物動態(PK)特性を示す。一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、血清濃度、t_{1/2}、ベータ半減期、および/またはCLに関して既知の治療用抗体と同等のPK特性を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、上記単一特異性二価抗原結合性コンストラクトに匹敵するか、それ以上のin vivo安定性を示す。そのようなin vivo安定性パラメータには、血清濃度、t_{1/2}、ベータ半減期、および/またはCLが

50

含まれる。

【0107】

二重特異性抗原結合性コンストラクトの試験：FcR、FcRn、およびC1q結合

二重特異性抗原結合性コンストラクトのエフェクター機能を、次のとおりに試験することができる。in vitroおよび/またはin vivo細胞傷害性アッセイを、ADCP、CDC、および/またはADCC活性を評価するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを、FcR結合を測定するために行うことができる。ADCCを媒介するための一次細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現するが、単球は、FcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991)の464頁の表3においてまとめられている。対象分子のADCC活性を評価するためのin vitroアッセイの例は、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されている。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。別法では、または加えて、対象分子のADCC活性は、in vivoで、例えば、Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998)において開示されているものなどの動物モデルにおいて評価することができる。二重特異性抗原結合性コンストラクトがC1qに結合し得るか、したがって、CDCを活性化し得るかどうかを決定するために、C1q結合アッセイを実施することもできる。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)において記載されているとおりのCDCアッセイを行うことができる。抗体の、SPRなどによるFcRn結合およびin vivo PK決定も、当技術分野で周知の方法を使用して行うことができる。

10

20

【0108】

抗原結合性コンストラクトの試験：HER2結合

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトまたは薬学的組成物を、ヒトにおいて使用する前に、所望の治療活性または予防活性についてin vitroで、次いでin vivoで試験する。例えば、化合物または薬学的組成物の治療有用性または予防有用性を実証するためのin vitroアッセイには、細胞系または患者組織試料での化合物の効果が含まれる。細胞系および/または組織試料に対する化合物または組成物の効果は、限定されないが、ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイを含む、当業者に知られている技術を利用して決定することができる。本発明に従って、具体的な抗原結合性コンストラクトの投与が適応であるかどうかを決定するために使用することができるin vitroアッセイには、in vitro細胞培養アッセイ、または患者組織試料を培養において増殖させ、抗原結合性コンストラクトに曝露するか、または別の方法でそれを投与し、その組織試料に対するそのような抗原結合性コンストラクトの効果を観察するin vitroアッセイが含まれる。

30

【0109】

抗原結合性コンストラクト候補は、HER2を発現する細胞、例えば、乳癌細胞系を使用してアッセイすることができる。次の表Dにおいて、いくつかの代表的な癌細胞系におけるHER2の発現レベルを記載する。

40

表D 対象細胞系におけるHER2の相対的発現レベル

細胞系	説明	IHCスコアリング	HER2 受容体/細胞
NCI-N87	ヒト胃癌	3+	評価せず
A549	ヒト肺癌(非小細胞肺癌)	0/1+	評価せず
BxPC-3	ヒト膵臓腺癌	1+	評価せず
MIA PaCa-2	ヒト膵管腺癌	2+	評価せず
FaDu	ヒト咽頭扁平上皮細胞癌	2+	評価せず
HCT-116	ヒト結腸直腸上皮癌	1+	評価せず
WI-38	正常胎児肺	0	1.0x10E4
MDA-MB-231	ヒト三重陰性乳房上皮腺癌	0/1+	1.7x10E4 - 2.3x10E4
MCF-7	ヒトエストロゲン受容体陽性乳房上皮腺癌	1+	4x10E4 - 7x10E4
JIMT-1	トラスツズマブ抵抗性乳房上皮癌、増幅HER2発癌遺伝子、HER2阻害性薬物(すなわちHerceptin(商標))に対して非感受性	2+	2x10E5 - 8x10E5
ZR-75-1	エストロゲン受容体陽性乳管癌	2+	3x10E5
SKOV-3	ヒト卵巣上皮腺癌、HER2遺伝子増幅	2/3+	5x10E5 - 1x10E6
SK-BR-3	ヒト乳房上皮腺癌	3+	> 1x10E6
BT-474	ヒト乳房上皮腺管癌	3+	> 1x10E6

10

【0110】

McDonagh et al Mol Cancer Ther. 2012 Mar; 11(3):582-93; Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research: 4; 35-41; Carter et al. PNAS, 1994:89; 4285-4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy; Hendricks et al Mol Cancer Ther 2013; 12:1816-28.

20

【0111】

当技術分野で公知のとおり、本明細書に記載の方法において使用するために適した抗原結合性コンストラクトを同定するために、いくつかのアッセイを使用することができる。これらのアッセイは、HER2を発現する癌細胞において実施することができる。適切な癌細胞の例を、表A5において同定する。実施することができるアッセイの例を以下に記載する。

30

【0112】

例えば、HER2に結合する増殖阻害性の抗原結合性コンストラクト候補を同定するために、HER2を発現する癌細胞の増殖を阻害する抗体をスクリーニングすることができる。一実施形態では、選択された抗原結合性コンストラクト候補は、細胞培養物中の癌細胞の増殖を、対照抗原結合性コンストラクトと比較して約20~100%、好ましくは約50~100%阻害し得る。

【0113】

細胞死を誘導する抗原結合性コンストラクト候補を選択するために、例えば、PI(ホスファチジルイノシトール)、トリパンプルー、または7AAD取り込みによって示されるような膜完全性の喪失を、対照に対して評価することができる。

40

【0114】

アポトーシスを誘導する抗原結合性コンストラクト候補を選択するために、アネキシン結合アッセイを使用することができる。アネキシン結合アッセイに加えて、DNA染色アッセイも使用することができる。

【0115】

一実施形態では、対象の抗原結合性コンストラクト候補は、免疫共沈降実験において決定されるとおり、モノクローナル抗体4D5よりもかなり有効に、好ましくはモノクローナル抗体7F3よりもかなりより有効に、MCF7およびSK-BR-3細胞の両方において、ErbB2とErbB3とのヘレグリン依存性会合を遮断し得る。

50

【0116】

対象抗体が結合するErbB2上のエピトープに結合する抗原結合性コンストラクトをスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)において記載されているものなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、または加えて、当技術分野で公知の方法によって、エピトープマッピングを行うことができる。

【0117】

抗原結合性コンストラクト間の競合は、試験中の抗原結合性コンストラクトが、共通の抗原への基準抗原結合性コンストラクトの特異的な結合を阻害または遮断するアッセイによって決定することができる(例えば、Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990; Fendly et al. Cancer Research 50: 1550-1558; 米国特許第6,949,245号を参照されたい)。競合結合アッセイにおいて測定した場合に、過剰な試験抗原結合性コンストラクト(例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または100倍)が、基準抗原結合性コンストラクトの結合を例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%阻害または遮断する場合には、試験抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトと競合する。競合アッセイ(抗原結合性コンストラクトと競合)によって同定される抗原結合性コンストラクトには、基準抗原結合性コンストラクトと同じエピトープに結合する抗原結合性コンストラクト、および基準抗原結合性コンストラクトが結合するエピトープに、立体障害が生じるほど十分に近接して隣接するエピトープに結合する抗原結合性コンストラクトが含まれる。例えば、HER2への結合について、本明細書に記載の第1の抗原結合性コンストラクトと競合する第2の競合性抗原結合性コンストラクトが同定され得る。ある特定の場合には、第2のコンストラクトは、競合結合アッセイにおいて測定した場合に、第1のコンストラクトの結合を例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%遮断または阻害し得る。ある特定の場合には、第2のコンストラクトは、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%超で、第1のコンストラクトに置き換わり得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、in vivoで、例えば、動物モデルにおいて、機能についてアッセイする。いくつかの実施形態では、動物モデルは、表Eに記載の動物モデルである。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトと比較して、動物モデルにおける処置の有効性の増大を示す。

表E: HER2結合性抗原結合性コンストラクトを試験するための動物モデル

異種移植片モデル	説明	参考文献
SKOV3 ヒト卵巣癌	HER2+/3+, 遺伝子増幅 トラスツズマブに対して中程度に感受性	Rhodes et al. 2002. American Journal of Pathology 118:408-417; Sims et al. 2012. British Journal of Cancer 106: 1779-1789
HBCx-13b ヒト転移性乳癌	HER2 3+, エストロゲン受容体陰性、 プロゲステロン受容体陰性； 侵襲性腺管乳房癌腫；化学療法抵抗性、 トラスツズマブ抵抗性	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer Research 13:3989-3998; Reyal et al. 2012. Breast Cancer Research 14:R11
T226 ヒト乳癌	HER2 3+, エストロゲン受容体陰性、 プロゲステロン受容体陰性；炎症性乳癌； トラスツズマブ抵抗性、ドセタキセル 及びカペシタピン中程度感受性、 アドリアマイシン/ シクロホスファミド感受性	
HBCx-5 ヒト乳癌	HER2 3+, エストロゲン受容体陰性、 プロゲステロン受容体陰性； 侵襲性腺管癌、ルミナルB； トラスツズマブ抵抗性、 ドセタキセル中程度感受性、 カペシタピン、アドリアマイシン/ シクロホスファミド感受性	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer Research 13:3989-3998; Reyal et al. 2012. Breast Cancer Research 14:R11
JIMT-1 ヒト乳癌	HER2 2+, HER2 遺伝子増幅、 トラスツズマブ及びペルツズマブ抵抗性	Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592

10

20

【0119】

基準抗原結合性コンストラクト

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトの機能特性を、基準抗原結合性コンストラクトの機能特性と比較する。基準抗原結合性コンストラクトが何であるかは、測定される機能特性、または成される識別に依存する。例えば、例示的な二重特異性抗原結合性コンストラクトの機能特性を比較する場合、基準抗原結合性コンストラクトは、例えば、v506などのトラスツズマブ類似体であり得るか、またはトラスツズマブおよびペルツズマブ(v4184)などの抗体の組合せであり得る。二重特異性抗原結合性コンストラクトの形式が比較されている実施形態では、基準抗原結合性コンストラクトは、例えば、両方の抗原結合性部分がFab-Fab形式(形式基準抗原結合性コンストラクト)である二重パラトピック抗HER2抗体である。後者のコンストラクトの例には、v6902およびv6903が含まれる。

30

【0120】

抗原結合性コンストラクトおよび抗体薬物コンジュゲート(ADC)

ある特定の実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、薬物、例えば、毒素、化学療法薬、免疫変調薬、または放射性同位体にコンジュゲートされている。ADC(抗体薬物コンジュゲートまたは抗原結合性コンストラクト薬物コンジュゲート)を調製するいくつかの方法が、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第8,624,003号(ポット方法)、同第8,163,888号(1ステップ)、および同第5,208,020号(2ステップ法)に記載されている。

40

【0121】

いくつかの実施形態では、薬物は、メイタンシン、オーリスタチン、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。他の実施形態では、薬物は、DM1およびDM4から選択されるメイタンシンである。さらなる例を下記に記載する。

【0122】

いくつかの実施形態では、薬物は、SMCCリンカー(DM1)またはSPDBリンカー(DM4)で、単離抗原結合性コンストラクトにコンジュゲートされている。追加の例を下記に記載する。抗原結合性タンパク質に対する薬物の比(DAR)は、例えば、1.0~6.0または3.0~5.0、または3.5~4.2であり得る。

【0123】

50

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、細胞傷害性薬物にコンジュゲートされている。「細胞傷害性薬物」という用語は、本明細書において使用する場合、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、かつ/または細胞の破壊をもたらす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、A t 2 1 1、I 1 3 1、I 1 2 5、Y 9 0、R e 1 8 6、R e 1 8 8、S m 1 5 3、B i 2 1 2、P 3 2、およびL u 1 7 7）、化学療法薬、ならびにその断片および/または変異体を含む細菌、真菌、植物、または動物由来の小分子毒素または酵素活性な毒素などの毒素を含むことが意図されている。さらなる例を下記に記載する。

【 0 1 2 4 】

薬物

A D Cの様々な実施形態において使用される薬物またはペイロードの非限定的例には、D M 1（メイタンシン、N 2' - デアセチル - N 2' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - またはN 2' - デアセチル - N 2' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイタンシン)、m c - M M A D (6 - マレイミドカプロイル - モノメチルオーリスタチン - D またはN - メチル - L - バリル - N - [(1 S , 2 R) - 2 - メトキシ - 4 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - [[(1 S) - 2 - フェニル - 1 - (2 - チアゾリル) エチル] アミノ] プロピル] - 1 - ピロリジニル] - 1 - [(1 S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - (9 C 1) - L - バリンアミド)、m c - M M A F (マレイミドカプロイル - モノメチルオーリスタチンF またはN - [6 - (2 , 5 - ジヒドロ - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロル - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - N - メチル - L - バリル - L - バリル - (3 R , 4 S , 5 S) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 4 - (メチルアミノ) ヘプタノイル - (R , R , 2 S) - - メトキシ - - メチル - 2 - ピロリジンプロパノイル - L - フェニルアラニン) およびm c - V a l - C i t - P A B A - M M A E (6 - マレイミドカプロイル - V a l c C i t - (p - アミノベンジルオキシカルボニル) - モノメチルオーリスタチンE またはN - [[[4 - [[N - [6 - (2 , 5 - ジヒドロ - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - L - バリル - N 5 - (アミノカルボニル) - L - オルニチル] アミノ] フェニル] メトキシ] カルボニル] - N - メチル - L - バリル - N - [(1 S , 2 R) - 4 - [(2 S) - 2 - [(1 R , 2 R) - 3 - [[(1 R , 2 S) - 2 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 2 - フェニルエチル] アミノ] - 1 - 30
- [(1 S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - L - バリンアミド) が含まれる。D M 1 は、チューブリン阻害薬メイタンシンの誘導体であり、M M A D、M M A E、およびM M A F は、オーリスタチン誘導体である。

【 0 1 2 5 】

メイタンシノイド薬物部分

上で示したとおり、いくつかの実施形態では、薬物はメイタンシノイドである。例示的なメイタンシノイドには、D M 1、D M 3 (N 2' - デアセチル - N 2' - (4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) メイタンシン)、およびD M 4 (N 2' - デアセチル - N 2' - (4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) メチルメイタンシン) (米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 2 0 2 5 3 6 を参照されたい) が含まれる。

【 0 1 2 6 】

メイタンシン化合物上の多くの位置が、連結の種類に応じて、連結位置として有用であることが公知である。例えば、エステル連結を形成するためには、ヒドロキシル基を有するC - 3 位、ヒドロキシメチルで修飾されたC - 1 4 位、ヒドロキシル基で修飾されたC - 1 5 位、およびヒドロキシル基を有するC - 2 0 位がすべて適している。

【 0 1 2 7 】

メイタンシノイド薬物部分のすべての立体異性体、すなわち、D のキラル炭素でのR およびS 立体配置のあらゆる組み合わせが、本明細書に記載のA D C のために企図される。

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

オーリスタチン

いくつかの実施形態では、薬物は、オーリスタチンE（ドラスタチン - 10の誘導体としても当技術分野で公知）またはその誘導体などのオーリスタチンである。オーリスタチンは、例えば、オーリスタチンEおよびケト酸との間で形成されるエステルであってよい。例えば、オーリスタチンEを、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させて、それぞれAEBおよびAEVBを生じさせることができる。他の典型的なオーリスタチンには、AFP、MMAF、およびMMAEが含まれる。例示的なオーリスタチンの合成および構造は、それぞれ、その全体があらゆる目的について参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,884,869号、同第7,098,308号、同第7,256,257号、同第7,423,116号、同第7,498,298号、および同第7,745,394号において記載されている。

10

【0129】

化学療法薬

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトを、化学療法薬にコンジュゲートさせる。例には、限定されないが、シスプランチン（Cisplatin）およびラパチニブが含まれる。「化学療法薬」は、癌を治療する際に有用な化学化合物である。

【0130】

化学療法薬の例には、アルキル化薬、例えば、チオテパおよびシクロスホスファミド（cyclophosphamide）（CYTOXAN（商標））；アルキルスルホナート、例えば、ブスルファン、イムプロスルファン、およびピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）およびウレドーパ（uredopa）；エチレンイミンおよびメチルアメルアミン（methylamelamine）、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスファオラミド（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチロメラミン（trimethylolomelamine）；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン（novembichin）、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルチノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル（5 - FU）；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5 - FU；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトン；抗副腎薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充物、例えば、フロリン酸（frolinic acid）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート（edatrax

20

30

40

50

ate); デホファミン (deffofamine); デメコルシン; ジアジコン; エルホルニチン (elfornithine); 酢酸エリプチニウム; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダミン; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダモール; ニトラクリン; ペントスタチン; フェナメット; ピラルピシン; ポドフィリン酸; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK7; ラゾキサソ; シゾフィラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジコン (triaziquone); 2, 2', 2'' = -トリクロロトリエチルアミン; ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトプロニトール; ミトラクトール; ピポプロマン; ガシトシン (gacytosine); アラビノシド (「Ara-C」); シクロホスファミド; チオテパ; タキサソ、例えばパクリタキセル (TAXOL (登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) およびドキセタキセル (doxetaxel) (TAXOTERE (登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロラムブシル; ゲムシタピン; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; 白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン; ビンブラスチン; 白金; エトポシド (VP-16); イホスファミド; マイトマイシンC; ミトキサントロン; ピンクリスチン; ビノレルピン; ナベルピン; ノバントロン (novantrone); テニボシド; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; CPT11; トポイソメラーゼ阻害薬 RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO); レチノイン酸; エスペラミシン; カペシタピン; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれる。この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性 4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン (Fareston) を含む抗エストロゲン; ならびにフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲンなどの、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も含まれる。

【0131】

コンジュゲートリンカー

いくつかの実施形態では、薬物は、リンカーによって抗原結合性コンストラクト、例えば、抗体に連結されている。抗体へのリンカーの結合は、表面リシン、酸化炭水化物への還元的カップリングによる方法、および鎖間ジスルフィド連結を還元することによって遊離されたシステイン残基による方法などの様々な方法で達成することができる。ヒドラゾン-、ジスルフィド-、およびペプチドベースの連結を含む様々なADC連結系が、当技術分野で公知である。

【0132】

適切なリンカーには、例えば、切断可能および切断不可能なリンカーが含まれる。切断可能なリンカーは典型的には、細胞内条件下で開裂を受け得る。適切な切断可能なリンカーには、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼによって切断され得るリンカーペプチドが含まれる。例示的な実施形態では、リンカーは、バリン-シトルリン (val-cit)、フェニルアラニン-リシン (phe-lys) リンカー、またはマレイミドカプロン酸-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル (mc-val-cit-PABA) リンカーなどのジペプチドリンカーであり得る。別のリンカーは、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート (SMCC) である。スルホ-smccコンジュゲーションは、スルフヒドリル (チオール、-SH) と反応するマレイミド基を介して生じ、そのスルホ-NHSエステルは、第1級アミン (リシン、およびタンパク質またはペプチドN末端に存在) に対して反応性である。また別のリンカーは、マレイミドカプロイル (MC) である。他の適切なリンカーには、ヒドラゾンリンカーなどの、特異的なpHまたはpH範囲で加水分解し得るリンカーが含まれる。追加の適切な切断可

10

20

30

40

50

能なリンカーには、ジスルフィドリンカーが含まれる。リンカーは、例えば、MCリンカーなど、薬物が放出されるために抗体が細胞内で分解しなければならない程度に、抗体に共有結合により結合し得る。

【0133】

A D C の調製

A D C は、(1) 共有結合によって抗体 - リンカー中間体 A b - L を形成するための、抗体の求核性基または求電子性基と二価リンカー試薬との反応、続く、活性化薬物部分 D との反応；および(2) 共有結合によって、薬物 - リンカー中間体 D - L を形成するための、薬物部分の求核性基または求電子性基とリンカー試薬との反応、続く、抗体の求核性基または求電子性基との反応を含む、当業者に知られている有機化学の反応、条件、および試薬を使用するいくつかの経路によって調製することができる。コンジュゲーション方法(1)および(2)を、様々な抗体、薬物部分、およびリンカーで使用して、本明細書に記載の抗体 - 薬物コンジュゲートを調製することができる。

10

【0134】

A D C を調製する方法のいくつかの具体的な例は、当技術分野で公知であり、米国特許第 8,624,003 号(ポット方法)、同第 8,163,888 号(ワンステップ)、および同第 5,208,020 号(2ステップ方法)において記載されている。

【0135】

抗原結合性コンストラクトの調製方法

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、例えば、米国特許第 4,816,567 号に記載されているとおりの組換え方法および組成物を使用して生成することができる。

20

【0136】

一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトをコードする単離核酸を提供する。そのような核酸は、抗原結合性コンストラクトの V L を含むアミノ酸配列および/または V H を含むアミノ酸配列(例えば、抗原結合性コンストラクトの軽鎖および/または重鎖)をコードし得る。さらなる一実施形態では、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター(例えば、発現ベクター)を提供する。一実施形態では、核酸を、マルチシストロン性ベクターに供給する。さらなる一実施形態では、そのような核酸を有する宿主細胞を提供する。そのような一実施形態では、宿主細胞は、(1) 抗原結合性コンストラクトの V L を含むアミノ酸配列および抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2) 抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの V L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、および抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、それらで形質転換されている)。一実施形態では、宿主細胞は、真核、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはヒト胎児由来腎臓(HEK)細胞、またはリンパ細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施形態では、抗原結合性コンストラクトを作製する方法であって、抗原結合性コンストラクトの発現に適した条件下で、上で提示したとおりの抗原結合性コンストラクトをコードする核酸を含む宿主細胞を培養することと、任意選択により、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗原結合性コンストラクトを回収することを含む方法を提供する。

30

40

【0137】

抗原結合性コンストラクトの組換え生成では、例えば、上記のとおり抗原結合性コンストラクトをコードする核酸を単離し、宿主細胞においてさらにクローニングおよび/または発現させるために1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を使用して容易に単離および配列決定することができる(例えば、抗原結合性コンストラクトの重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)。

【0138】

50

「実質的に精製された」という用語は、そのタンパク質が天然に存在する環境、すなわち、天然細胞において存在するような、そのタンパク質に通常付随するか、またはそれと相互作用する成分を実質的または本質的に含有し得ない本明細書に記載のコンストラクトまたはその変異体を指すか、またはある特定の実施形態では、細胞材料を実質的に含有しない組換え生成されるヘテロ多量体の場合の宿主細胞は、汚染タンパク質約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満（乾燥重量で）を有するタンパク質の調製物を含む。ヘテロ多量体またはその変異体を宿主細胞によって組換え生成する場合、タンパク質は、ある特定の実施形態では、細胞の乾燥重量の約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%以下で存在する。ヘテロ多量体またはその変異体を宿主細胞によって組換え生成する場合、タンパク質は、ある特定の実施形態では、細胞の乾燥重量の約5g/L、約4g/L、約3g/L、約2g/L、約1g/L、約750mg/L、約500mg/L、約250mg/L、約100mg/L、約50mg/L、約10mg/L、または約1mg/L以下で培養培地中に存在する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成された「実質的に精製された」ヘテロ多量体は、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC、および毛細管電気泳動などの適切な方法によって決定した場合に、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度レベル、具体的には、少なくとも約75%、80%、85%の純度レベル、より具体的には、少なくとも約90%の純度レベル、少なくとも約95%の純度レベル、少なくとも約99%以上の純度レベルを有する。

10

20

【0139】

抗原結合性コンストラクトをコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載の原核または真核細胞が含まれる。

【0140】

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」は、挿入のために使用する方法、例えば、直接的取り込み、形質導入、f-メーティング、または組換え宿主細胞を作成するために当技術分野で公知の他の方法に関わらず、外因性ポリヌクレオチドを含む細胞を指す。外因性ポリヌクレオチドは、非統合ベクター、例えば、プラスミドとして維持することもできるし、または別法では、宿主ゲノムに統合することもできる。

30

【0141】

本明細書において使用する場合、「真核生物」という用語は、動物（限定されないが、哺乳動物、昆虫類、爬虫類、鳥類などを含む）、織毛虫類、植物（限定されないが、単子葉植物、双子葉植物、藻類などを含む）、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物などの、系統発生ドメインで真核生物に属する生体を指す。

【0142】

本明細書において使用する場合、「原核生物」という用語は、原核生体を指す。例えば、非真核生体は、真性細菌（限定されないが、大腸菌（*Escherichia coli*）、*Thermus thermophilus*、*Bacillus stearothermophilus*、*Pseudomonas fluorescens*、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、*Pseudomonas putida*などを含む）系統発生ドメイン、または古細菌（限定されないが、*Methanococcus jannaschii*、*Methanobacterium thermoautotrophicum*、*Haloferax volcanii*および*Halobacterium*種NRC-1などの八口細菌、*Archaeoglobus fulgidus*、*Pyrococcus furiosus*、*Pyrococcus horikoshii*、*Aeuryopyrum pernix*を含む）系統発生的ドメインに属し得る。

40

【0143】

50

例えば、抗原結合性コンストラクトは、特に、糖鎖形成およびFcエフェクター機能が
 必要ない場合には、細菌中で生成することができる。細菌中での抗原結合性コンストラク
 ト断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号
 、同第5,789,199号、および同第5,840,523号を参照されたい(大腸菌
 中での抗体断片の発現を記載しているCharlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed.
 ., Humana Press, Totowa, N.J., 2003)、pp. 245-254も参照されたい)。発現の後に、抗原結合性コンストラクトを、可溶性画
 分中の細菌細胞ペーストから単離することができ、さらに精製することができる。

【0144】

原核生物に加えて、その糖鎖形成経路が「ヒト化」されていて、部分的または完全なヒ
 ト糖鎖形成パターンを伴う抗原結合性コンストラクトの生成をもたらす真菌および酵母株
 を含む糸状菌または酵母などの真核微生物も、抗原結合性コンストラクトをコードするベ
 クターのための適切なクローニングまたは発現宿主である。Gemgross, *Nat.
 Biotech.* 22:1409-1414 (2004)、およびLi et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)を参照さ
 れたい。

【0145】

グリコシル化抗原結合性コンストラクトの発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無
 脊椎動物および脊椎動物)から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物および昆虫
 細胞が含まれる。昆虫細胞と併せて、特にSpodoptera frugiperda
 細胞のトランスフェクションのために使用することができる多数のバキュロウイルス株が
 同定されている。

【0146】

植物細胞培養物を、宿主として利用することもできる。例えば、米国特許第5,959,
 177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,
 978号、および同第6,417,429号(トランスジェニックプラントにおいて抗原
 結合性コンストラクトを生成するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載)
 を参照されたい。

【0147】

脊椎動物細胞も、宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖するよう
 に適合させた哺乳動物細胞系が有用である。有用な哺乳動物宿主細胞系の他の例は、SV
 40によって形質転換されたサル腎臓CV1系(COS-7);ヒト胎児由来腎臓系(例
 えば、Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1
 977)において記載されているとおりの293または293細胞);ベビーハムスター
 腎臓細胞(BHK);マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, *Biol. Re
 prod.* 23:243-251 (1980)において記載されているとおりのTM
 4細胞);サル腎臓細胞(CV1);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76);
 ヒト子宮頸癌細胞(HELA);イヌ腎臓細胞(MDCK;バウファローラット肝臓細胞
 (BRL 3A);ヒト肺細胞(W138);ヒト肝臓細胞(Hep G2);マウス乳
 房腫瘍(MMT 060562);例えば、Mather et al., *Annal
 s N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)において記
 載されているとおりのTRI細胞;MRC5細胞;およびFS4細胞である。他の有用な
 哺乳動物宿主細胞系には、DHFR⁻ CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣(
 CHO)細胞(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA* 77:4216 (1980));ならびにY0、NS0、およびS
 p2/0などの骨髄腫細胞系が含まれる。抗原結合性コンストラクト生成に適したある特
 定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki and Wu, *Me
 thods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.
 K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.

10

20

30

40

50

), pp. 255 - 268 (2003)を参照されたい。

【0148】

一実施形態では、所定の比で、少なくとも1個の安定な哺乳動物細胞に、抗原結合性コンストラクトをコードする核酸をトランスフェクトすることと；その少なくとも1個の哺乳動物細胞において核酸を発現させることを含む方法によって、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを安定な哺乳動物細胞中で生成する。いくつかの実施形態では、発現産物において抗原結合性コンストラクトの最も高いパーセンテージをもたらす投入核酸の相対比を決定するために、核酸の所定の比を一過性トランスフェクション実験において決定する。

【0149】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のとおり安定な哺乳動物細胞中で抗原結合性コンストラクトを生成する方法であって、その少なくとも1個の安定な哺乳動物細胞の発現産物が、単量体重鎖または軽鎖ポリペプチド、または他の抗体と比較して、より高いパーセンテージの所望のグリコシル化抗原結合性コンストラクトを含む方法である。

【0150】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載の安定な哺乳動物細胞中でグリコシル化抗原結合性コンストラクトを生成する方法であって、所望のグリコシル化抗原結合性コンストラクトを同定および精製することを含む方法である。いくつかの実施形態では、上記同定は、液体クロマトグラフィーおよび質量分析法の一方または両方による同定である。

【0151】

必要な場合には、抗原結合性コンストラクトを、発現の後に精製または単離することができる。タンパク質は、当業者に知られている様々な方法で単離または精製することができる。標準的な精製方法には、FPLCおよびHPLCなどのシステムを使用して常圧または高圧で実施するイオン交換、疎水性相互作用、親和性、サイジングまたはゲル濾過、および逆相を含むクロマトグラフィー技術が含まれる。精製方法には、電気泳動、免疫学的、沈殿、透析、およびクロマトフォーカシング技術も含まれる、限外濾過および透析濾過技術も、タンパク質濃度と併せて有用である。当技術分野で周知のとおり、様々な天然タンパク質が、Fcおよび抗体に結合し、これらのタンパク質を、抗原結合性コンストラクトを精製するために本発明において使用することができる。例えば、細菌プロテインAおよびGは、Fc領域に結合する。同様に、細菌プロテインLは、数種の抗体のFab領域に結合する。精製は多くの場合に、特定の融合パートナーによって可能になり得る。例えば、GST融合を使用する場合には、グルタチオン樹脂を、Hisタグを使用する場合には、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーを、またはフラグタグを使用する場合には、固定化抗フラグ抗体を使用して、抗体を精製することができる。適切な精製技術における一般的なガイダンスについては、例えば、全体が参照によって本明細書に組み込まれるProtein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994を参照されたい。必要な精製程度は、抗原結合性コンストラクトの使用に応じて様々であろう。場合によっては、精製は必要ない。

【0152】

ある特定の実施形態では、抗原結合性コンストラクトを、限定されないが、Q-セファロース、DEAEセファロース、ポロスHQ、ポロスDEAF、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource/Source QおよびDEAE、Fractogel Q、およびDEAEカラムでのクロマトグラフィーを含むアニオン交換クロマトグラフィーを使用して精製する。

【0153】

具体的な実施形態では、本明細書に記載のタンパク質を、限定されないが、SP-セファロース、CMセファロース、ポロスHS、ポロスCM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource/Source SおよびCM、Fractogel SおよびCMカラム、ならびにそれらの同等品および比較可能品を含むカチオ

10

20

30

40

50

ン交換クロマトグラフィーを使用して精製する。

【0154】

加えて、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、当技術分野で公知の技術を使用して化学的に合成することができる（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y and Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)を参照されたい）。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドは、ペプチドシンセサイザーの使用によって合成することができる。さらに、所望の場合には、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、ポリペプチド配列に置換または付加として導入することができる。非古典的アミノ酸には、限定されないが、一般的なアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、アルファ-アミノイソ酪酸、4アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、-アラニン、フルオロ-アミノ酸、-メチルアミノ酸、C-メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、およびアミノ酸類似体が一般に含まれる。さらに、アミノ酸は、D（右旋性）またはL（左旋性）であってよい。

10

【0155】

翻訳後修飾：

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、翻訳の間、またはその後差別的に修飾される。

20

【0156】

「修飾された」という用語は、本明細書において使用する場合、ポリペプチドの長さ、ポリペプチドのアミノ酸配列、化学構造、同時翻訳修飾、または翻訳後修飾の変化など、所与のポリペプチドに対して成された任意の変化を指す。「(修飾)」用語という形態は、論述されているポリペプチドが、任意選択により修飾されている、すなわち、論述中のそのポリペプチドが、修飾されていても修飾されていなくてもよいことを意味する。

【0157】

「翻訳後修飾された」という用語は、ポリペプチド鎖に組み込まれた後に、そのようなアミノ酸で生じる天然または非天然アミノ酸の任意の修飾を指す。この用語は、例にすぎないが、同時翻訳 *in vivo* 修飾、同時翻訳 *in vitro* 修飾（細胞非含有翻訳系においてなど）、翻訳後 *in vivo* 修飾、および翻訳後 *in vitro* 修飾を内包する。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、修飾は、糖鎖形成、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性開裂、および抗体分子または抗原結合性コンストラクトまたは他の細胞リガンドへの連結のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、限定ではないが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 NaBH_4 による特異的開裂；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；およびツニカマイシンの存在下での代謝合成を含む公知の技術によって化学的に修飾されている。

40

【0159】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトの追加の翻訳後修飾には、例えば、N-連結またはO-連結炭水化物鎖、N末端またはC末端のプロセッシング、アミノ酸主鎖への化学部分の結合、N-連結またはO-連結炭水化物鎖の化学的修飾、および原核宿主細胞発現の結果としてのN末端のメチオニン残基の付加または欠失が含まれる。本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、タンパク質の検出および単離を可能にする酵素、蛍光、同位体、または親和性ラベルなどの検出可能なラベルで修飾される。ある特定の実施形態

50

では、適切な酵素ラベルの例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジンビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例には、ルミノールが含まれ；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ；適切な放射性物質の例には、ヨウ素、炭素、硫黄、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、フッ素が含まれる。

【 0 1 6 0 】

具体的な実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、放射性金属イオンと会合する大環状キレート薬に結合させる。

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、翻訳後プロセシングなどの天然プロセスによってか、または当技術分野で周知の化学的修飾技術によって修飾される。ある特定の実施形態では、同じ種類の修飾が、1個の所与のポリペプチド中のいくつかの部位に同じ程度または様々な程度で存在し得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトからのポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として、分枝しており、いくつかの実施形態では、分枝を伴うか、または伴わない環式である。環式、分枝、および分枝環式ポリペプチドは、翻訳後天然プロセスからの結果であるか、または合成方法によって作製される。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ - カルボキシル化、糖鎖形成、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫化、アルギニル化などのタンパク質への転移 - RNA媒介アミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる（例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1 - 12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626 - 646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48 - 62 (1992)を参照されたい)。

【 0 1 6 2 】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、本明細書に記載のタンパク質が結合するか、それに結合するか、またはそれと会合するポリペプチドのイムノアッセイまたは精製のために特に有用である固体支持体に結合される。そのような固体支持体には、限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれる。

【 0 1 6 3 】

薬学的組成物

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む薬学的組成物も、本明細書において提供する。薬学的組成物は、コンストラクトおよび薬学的に許容される担体を含む。

【 0 1 6 4 】

「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制当局によって認可

10

20

30

40

50

されているか、または米国薬局方または動物、特にヒトにおいて使用するために一般に認められている他の薬局方において挙げられていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬がそれと共に投与される希釈剤、補助剤、添加剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、ラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物、または合成由来のものを含む水および油などの滅菌液であり得る。いくつかの態様では、担体は、自然界には存在しない人工担体である。薬学的組成物を静脈投与する場合には、水を担体として使用することができる。生理食塩水ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液も、特に注射用液剤のための液体担体として使用することができる。適切な薬学的添加剤には、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、コメ、コムギ、チョコレート、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ラート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、所望の場合には、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有し得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤などの形態をとり得る。組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体を含む坐剤として製剤化することができる。経口製剤は、医薬グレードのマニトール、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の標準的な担体を含み得る。適切な薬学的担体の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」においてE. W. Martin E. W. Martinによって記載されている。そのような組成物は、患者に適正に投与するための形態が得られるように、治療有効量の化合物を好ましくは精製形態で、適切な量の担体と一緒に含有するであろう。製剤は、投与様式に適合すべきである。

【0165】

ある特定の実施形態では、コンストラクトを含む組成物を、ヒトへの静脈内投与に適した薬学的組成物として、常套的な手順に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張性水性緩衝液中の溶液である。必要な場合には、組成物は、注射部位での疼痛を緩和するために、可溶化剤およびリグノカインなどの局所麻酔薬を含んでもよい。一般に、成分を、別々に、または一緒に混合して、単位剤形で、例えば、無水凍結乾燥散剤または無水濃厚物として、活性薬剤の量を示したアンプルまたはサシェなどの気密密封容器に入れて供給する。組成物が注入によって投与されるはずである場合、これを、医薬グレードの滅菌水または生理食塩水を含有する注入ボトルに分配することができる。組成物が注射によって投与される場合、滅菌注射用水または生理食塩水のアンプルを提供して、投与前に成分を混合することができるようにすることができる。

【0166】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物を、中性または塩の形態で製剤化する。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などのアニオンと共に形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどのカチオンと共に形成されるものが含まれる。

【0167】

治療方法

ある特定の実施形態では、処置、予防、または寛解が望まれる対象に、疾患または障害を処置、予防、または寛解するために有効な量の本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを投与することを含む、疾患または障害を処置する方法を提供する。

【0168】

「障害」は、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトまたは方法での処置から利益を得るであろう任意の状態を指す。これには、該当する障害に哺乳動物が罹患しやすくなる病的状態を含む慢性および急性障害または疾患が含まれる。いくつかの実施形態では、障害は、下でより詳細に記載するとおりの癌である。

10

20

30

40

50

【0169】

「対象」という用語は、処置、観察、または実験の対象である動物、いくつかの実施形態では、哺乳動物を指す。動物は、ヒト、非ヒト霊長類、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコなど）、牧場動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、または実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）であってよい。

【0170】

「哺乳動物」という用語には、本明細書において使用する場合、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、およびブタが含まれる。

【0171】

「処置」は、処置を受ける個体または細胞の自然の経過を変更しようとする臨床的介入を指し、予防のためか、または臨床病理の経過中に行うことができる。処置の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患のいずれかの直接的または間接的病的帰結の減弱、転移の予防、疾患進行の減速、病態の改善または寛解、および緩解または予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、疾患または障害の発生を遅延させるために使用する。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトおよび方法は、腫瘍を退縮させる。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトおよび方法は、腫瘍/癌の増殖を阻害する。

10

【0172】

処置の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患のいずれかの直接的または間接的病的帰結の減弱、転移の予防、疾患進行の減速、病態の改善または寛解、生存率の改善、および緩解または予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、疾患の発生を遅延させるか、または疾患の進行を減速させるために使用する。

20

【0173】

「有効量」という用語は、本明細書において使用する場合、列挙された方法の目標を達成する、例えば、処置を受けている疾患、状態、または障害の症状の1つまたは複数がある程度軽減する、コンストラクトの投与量を指す。治療上のタンパク質の異常な発現および/または活性に関連する疾患または障害を処置、阻害、および予防する際に有効であろう本明細書に記載の組成物の量は、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、*in vitro*アッセイを、任意選択により、最適な投薬量範囲を同定する助けとするために使用することができる。製剤において使用される正確な用量はまた、投与経路、疾患または障害の重篤性に左右されるはずであり、従事者および各患者の状況の判断によって決定されるべきである。有効な用量を、*in vitro*または動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿する。

30

【0174】

抗原結合性コンストラクトを対象に投与する。様々な送達系、例えば、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセルへの封入、化合物を発現し得る組換え細胞、受容体媒介細胞内取り込み作用（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)を参照されたい）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸のコンストラクションなどが公知であり、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクト製剤を投与するために使用することができる。導入方法には、限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が含まれる。化合物または組成物を、任意の簡便な経路によって、例えば、注入または大量注射によって、上皮性または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸、および腸管粘膜など）を介しての吸収によって投与することができ、他の生物学的活性薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身でも局所でもよい。加えて、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクト組成物を、脳室内および髄腔内注射を含む任意の適切な経路によって中枢神経系へと導入することが望ましく；脳室内注射は、例えば、Ommayaレザバーなどのレザバーに取り付けられた脳室内カテーテルによって促

40

50

進することができる。例えば、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル化剤を含む製剤の使用によって、肺投与も使用することができる。

【0175】

具体的な一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトまたは組成物を、処置を必要とする範囲に局所投与することが望ましく；これは、例であって限定ではないが、外科手術中の局所注入、例えば外科手術後の創傷の包帯と併せての局所塗布によって、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、またはインプラントによって達成することができ、この際、上記インプラントは、シラスティック (sialastic) 膜などの膜または繊維を含む多孔性、非多孔性、またはゼラチン材料からなる。好ましくは、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含むタンパク質を投与する場合、タンパク質を吸収しない材料を使用するように配慮する必要がある。

10

【0176】

別の実施形態では、抗原結合性コンストラクトまたは組成物を、ベシクル、特に、リポソームで送達することができる (Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327を参照されたい；一般には上記を参照されたい)。

20

【0177】

また別の実施形態では、抗原結合性コンストラクトまたは組成物を、制御放出系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる (Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照されたい)。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, I, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照されたい；また、Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)を参照されたい)。また別の実施形態では、制御放出系を、治療標的、例えば、脳の近傍に設置して、全身用量の一部だけが必要であるようにすることができる (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。

30

40

【0178】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトをコードする核酸を含む具体的な一実施形態では、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれをコンストラクトし、細胞内になるようにそれを投与することによって、例えば、レトロウイルスベクターを使用することによって (米国特許第4,980,286号を参照されたい)、または直接注射することによって、またはマイクロ粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子ガン; Biobstic, Dupont) の使用、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクショ

50

ン剤でのコーティングによって、または核に入ることが公知のホメオボックス様ペプチドと連係して投与すること（例えば、J o l i o t e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 88:1864-1868 (1991)を参照されたい）などによって、その核酸を *in vivo* に投与して、そのコードされるタンパク質の発現を促進することができる。別法では、核酸を細胞内に導入し、相同的な組換えによって、発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

【0179】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、結合標的エピトープが重複しない抗原結合性コンストラクトとの組合せとして投与する。

【0180】

疾患または障害の処置、阻害、および予防において有効であろう抗原結合性コンストラクトの量は、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、*in vitro* アッセイを、任意選択により、最適な投薬量範囲を特定する助けとするために使用することができる。製剤において使用される正確な用量はまた、投与経路、疾患または障害の重篤性に左右されるはずであり、従事者および各患者の状況の判断によって決定されるべきである。有効な用量を、*in vitro* または動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿する。

【0181】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、単独で、または他の種類の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、および抗腫瘍薬）と組み合わせて投与することができる。一般に、患者の種類と同じ種である種由来または種反応性の生成物の投与が好ましい。したがって、一実施形態では、ヒト抗原結合性コンストラクト、断片誘導体、類似体、または核酸を、治療または予防のためにヒト患者に投与する。

【0182】

癌を処置する方法

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを使用して、対象においてHER2+癌または腫瘍を処置する方法、およびHER2+腫瘍細胞の増殖を阻害するか、またはHER2+腫瘍細胞を死滅させる方法を本明細書において記載する。

【0183】

HER2+癌とは、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトがその癌に結合し得るような、HER2を発現する癌を意味する。当技術分野で公知のとおり、HER2+癌は、HER2を様々なレベルで発現する。癌におけるErbb2、例えば、Erbb2(HER2)発現を決定するために、様々な診断/予後アッセイが利用可能である。一実施形態では、Erbb2過剰発現を、IHCによって、例えば、HERCEPTEST(登録商標)(Dako)を使用して分析することができる。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイに掛け、次のとおりのErbb2タンパク質染色強度基準を与えることができる：

スコア0

染色が観察されないか、または膜染色が、腫瘍細胞の10%未満において観察される。

スコア1+

かすかに/かろうじて認知可能な膜染色が、腫瘍細胞の10%超で検出される。細胞は、それらの膜の一部において染色されるだけである。

スコア2+

弱から中程度の膜全体の染色が、腫瘍細胞の10%超において観察される。

スコア3+

中程度から強度の膜全体の染色が、腫瘍細胞の10%超において観察される。

【0184】

Erbb2過剰発現評価について0または1+のスコアを示す腫瘍は、Erbb2を過剰発現していないと特徴づけられ得るが、2+または3+のスコアを示す腫瘍は、Erbb2を過剰発現していると特徴づけられ得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 5 】

別法では、または加えて、腫瘍における E r b B 2 過剰発現の規模（もしあるならば）を決定するために、I N F O R M（商標）（V e n t a n a（A r i z .））によって販売）または P A T H V I S I O N（商標）（V y s i s（I l l .））などの蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション（F I S H）アッセイをホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍組織において実施することができる。I H Cアッセイと比較して、H E R 2 遺伝子増幅を測定する F I S Hアッセイは、H E R C E P T I N（登録商標）での処置に対する患者の応答とより良好に相関しているようであり、H E R C E P T I N（登録商標）処置から利益を受け得る患者を特定するために好ましいアッセイであると現在判断されている。

【 0 1 8 6 】

表Dに、いくつかの代表的な乳癌および他の癌細胞系での H E R 2 の発現レベルを記載している（S u b i k e t a l .（2010）Breast Cancer：Basic Clinical Research：4；35-41；P r a n g e t a .（2005）British Journal of Cancer Research：92；342-349）。表において示すとおり、M C F - 7 および M D A - M B - 2 3 1 細胞は、低 H E R 2 発現細胞であると判断され；J I M T - 1 および Z R - 7 5 - 1 細胞は、中程度 H E R 2 発現細胞であると判断され、S K B R 3 および B T - 4 7 4 細胞は、高度 H E R 2 発現細胞であると判断される。S K O V 3（卵巣癌）細胞は、中程度 H E R 2 発現細胞であると判断される。

【 0 1 8 7 】

H E R 2 + 癌または腫瘍を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む有効量の薬学的組成物を提供することを含む方法を本明細書において記載する。

【 0 1 8 8 】

また、癌または腫瘍を処置するための医薬品を製造するための、本明細書に記載の H E R 2 抗原結合性コンストラクトの使用を本明細書において記載する。また、癌または腫瘍の処置において使用するための H E R 2 抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。

【 0 1 8 9 】

具体的な実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、v 1 0 0 0 0、v 7 0 9 1、v 5 0 1 9、または v 5 0 2 0 である。一実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、v 1 0 0 0 0 である。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、メイタンシン（D M 1）にコンジュゲートされている。D M 1 にコンジュゲートされている抗原結合性コンストラクトが腫瘍細胞に内部移行されると、D M 1 は、細胞内でコンストラクトから切断されて、腫瘍細胞を死滅させる。

【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態では、処置を受ける対象は、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、脳癌、子宮内膜癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、または表皮由来癌を有する。いくつかの実施形態では、腫瘍は転移性である。

【 0 1 9 1 】

一般に、処置を受ける対象における腫瘍は、腫瘍細胞 1 個当たり平均 1 0 , 0 0 0 以上の H E R 2 のコピーを発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、I H C によって判定した場合に H E R 2 0 ~ 1 +、1 +、H E R 2 2 +、または H E R 2 3 + である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、H E R 2 2 + 以下、または H E R 2 1 + 以下である。

【 0 1 9 2 】

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトでの処置を受ける対象の腫瘍は、乳癌である。具体的な一実施形態では、乳癌は、H E R 2 を 2 + レベル以下で発現する。具体的な一実施形態では、乳癌は、H E R 2 を 1 + レベル以下で発現する。いくつかの実施形態では、乳癌は、エストロゲン受容体（E R +）および/またはプロゲステロン受容

10

20

30

40

50

体 (P R +) を発現する。いくつかの実施形態では、乳癌は、 E R - およびまたは P R - である。いくつかの実施形態では、乳癌は、増幅 H E R 2 遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、乳癌は、 H E R 2 3 + 、エストロゲン受容体陰性 (E R -) 、プロゲステロン受容体陰性 (P R -) 、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌である。別の実施形態では、乳癌は、 H E R 2 3 + 、 E R - 、 P R - 、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌である。別の実施形態では、乳癌は、 H E R 2 3 + 、 E R - 、 P R - の侵襲性腺管癌である。別の実施形態では、乳癌は、 H E R 2 2 + 、 H E R 2 遺伝子増幅トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性の乳癌である。いくつかの実施形態では、乳癌は、三重陰性 (E R - 、 P R - 、および低 H E R 2 発現) である。

【 0 1 9 3 】

一実施形態では、腫瘍は、増幅 H E R 2 遺伝子を有する H E R 2 2 / 3 + 卵巣上皮性腺癌である。

【 0 1 9 4 】

他の標準治療法に対して抵抗性であるか、または抵抗性になりつつある H E R 2 + 腫瘍を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む薬学的組成物を投与することを含む方法を本明細書において提供する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、現行の治療に対して応答しない対象に、任意選択により 1 種または複数種の現行の抗 H E R 2 治療と組み合わせ提供する。いくつかの実施形態では、現行の抗 H E R 2 治療には、限定されないが、抗 H E R 2 または抗 H E R 3 単一特異性二価抗体、トラスツズマブ、ペルツズマブ、 T - D M 1 、二重特異性 H E R 2 / H E R 3 s c F v 、またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、タキサンなどの様々な化学療法薬に対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、癌は、トラスツズマブに対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、癌は、ペルツズマブに対して抵抗性である。一実施形態では、癌は、 T D M 1 (D M 1 にコンジュゲートされたトラスツズマブ) に対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、対象は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、または D M 1 などの抗 H E R 2 抗体で以前に処置されている。いくつかの実施形態では、対象は、抗 H E R 2 抗体で以前に処置されている。一実施形態では、患者が以前の抗 H E R 2 療法で進行している場合に、抗原結合性コンストラクトを転移癌の処置のために対象に与える。

【 0 1 9 5 】

H E R 2 + 腫瘍を有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む有効量の薬学的組成物を、追加の抗腫瘍薬と併せて与えることを含む方法を本明細書において提供する。追加の抗腫瘍薬は、上述のとおり治療用抗体または化学療法薬であってよい。本発明の抗原結合性コンストラクトと併用するために有用な化学療法薬には、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピン、ビノレルピン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、ペメトレキセド、5 - フルオロウラシル (フォリン酸を含むか、または含まない) 、カペシタピン、カルボプラチン、エピルピシン、オキサリプラチン、フォルフィリノックス (f o l f i r i n o x) 、アブラキサン、およびシクロホスファミドが含まれる。

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、腫瘍は非小細胞肺癌であり、追加の薬剤は、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピン、ビノレルピン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、またはペメトレキセドのうちの 1 種または複数種である。実施形態では、腫瘍は胃癌であり、追加の薬剤は、5 - フルオロウラシル (フォリン酸を含むか、または含まない) 、カペシタピン、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、エピルピシン、イリノテカン、オキサリプラチン、またはパクリタキセルのうちの 1 種または複数種である。他の実施形態では、腫瘍は膵臓癌であり、追加の薬剤は、ゲムシタピン、フォルフィリノックス、アブラキサン、または 5 - フルオロウラシルのうちの 1 種または複数種である。他の実施形態では、腫

10

20

30

40

50

瘍は、エストロゲンおよび/またはプロゲステロン陽性乳癌であり、追加の薬剤は、(a)ドキソルビシンおよびエピルビシンの組み合わせ、(b)パクリタキセルおよびドセタキセルの組み合わせ、または(c)5 -フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびカルボプラチンの組み合わせのうちの1種または複数種である。他の実施形態では、腫瘍は頭頸部癌であり、追加の薬剤は、パクリタキセル、カルボプラチン、ドキソルビシン、またはシスプラチンのうちの1種または複数種である。他の実施形態では、腫瘍は卵巣癌であり、追加の薬剤は、シスプラチン、カルボプラチン、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルなどのタキサンのうちの1種または複数種であり得る。

【 0 1 9 7 】

追加の薬剤を、処置を受けている対象に、抗原結合性コンストラクトと同時に、または連続して投与することができる。

10

【 0 1 9 8 】

抗原結合性コンストラクトでの処置を受ける対象は、ヒト、非ヒト霊長類、またはマウスなどの他の哺乳動物であり得る。

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、有効量の抗原結合性コンストラクトを、腫瘍を有する対象に与える結果は、腫瘍の縮小、腫瘍の増殖の阻害、腫瘍が進行するまでの時間の増大、対象の無病生存期間の延長、転移の低減、対象の無進行生存期間の増大、または処置を受けている対象の全生存期間の増大もしくは対象群の全生存期間の増大である。

【 0 2 0 0 】

20

また、HER2発現腫瘍細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、細胞を、本明細書において提供する抗原結合性コンストラクトと接触させることを含む方法を本明細書において記載する。

【 0 2 0 1 】

様々な実施形態で、腫瘍細胞は、HER2 1+または2+ヒト膵臓癌細胞、HER2 3+ヒト肺癌細胞、HER2 2+白色人種(human Caucasian)気管支肺癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、HER2 2+ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のHER2 2+扁平上皮細胞癌細胞、HER2 1+または2+ヒト結腸直腸癌細胞、HER2 3+ヒト胃癌細胞、HER2 1+ヒト乳房腺管ER+(エストロゲン受容体陽性)癌細胞、HER2 2+/3+ヒトER+、HER2増幅乳房癌細胞、HER2 0+/1+ヒト三重陰性乳癌細胞、HER2 2+ヒト子宮内膜様癌細胞、HER2 1+肺転移悪性黒色腫細胞、HER2 1+ヒト子宮頸癌細胞、Her2 1+ヒト腎細胞癌細胞、またはHER2 1+ヒト卵巣癌細胞であってよい。

30

【 0 2 0 2 】

抗原結合性コンストラクトがDM1にコンジュゲートされている実施形態では、腫瘍細胞は、HER2 1+または2+または3+ヒト膵臓癌細胞、HER2 2+転移膵臓癌細胞、HER2 0+/1+、+3+ヒト肺癌細胞、HER2 2+白色人種気管支肺癌細胞、HER2 0+未分化肺癌、ヒト非小細胞肺癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、HER2 2+ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のHER2 2+扁平上皮細胞癌細胞、HER2 1+または2+ヒト結腸直腸癌細胞、HER2 0+、1+、または3+ヒト胃癌細胞、HER2 1+ヒト乳房腺管ER+(エストロゲン受容体陽性)癌細胞、HER2 2+/3+ヒトER+、HER2増幅乳癌細胞、HER2 0+/1+ヒト三重陰性乳癌細胞、HER2 0+ヒト乳房腺管癌(基底B、間葉状三重陰性)細胞、HER2 2+ER+乳癌、HER2 0+ヒト転移乳癌細胞(ER-、HER2増幅、ルミナルA、TN)、ヒト子宮中胚葉腫瘍(混合グレードIII)細胞、2+ヒト子宮内膜様癌細胞、HER2 1+ヒト皮膚類表皮癌細胞、HER2 1+肺転移悪性黒色腫細胞、HER2 1+悪性黒色腫細胞、ヒト子宮頸類表皮癌細胞、HER2 1+ヒト膀胱癌細胞、HER2 1+ヒト子宮頸癌細胞、Her2 1+ヒト腎細胞癌細胞、またはHER2 2 1+、2+、または3+ヒト卵巣癌細胞であってよい。

40

【 0 2 0 3 】

50

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、次の細胞系（図37および38において図示）の1種または複数種であってよい：膵臓腫瘍細胞系のBxPC3、Capan-1、MiaPaca2；肺腫瘍細胞系のCalu-3、NCI-H322；頭頸部腫瘍細胞系のDetroit562、SCC-25、FaDu；結腸直腸腫瘍細胞系のHT29、SNU-C2B；胃腫瘍細胞系のNCI-N87；乳房腫瘍細胞系のMCF-7、MDAMB175、MDAMB361、MDA-MB-231、BT-20、JIMT-1、SkBr3、BT-474；子宮腫瘍細胞系のTOV-112D；皮膚腫瘍細胞系のMalme-3M；子宮頸部腫瘍細胞系のCaski、MS751；膀胱腫瘍細胞系のT24、卵巣腫瘍細胞系のCaOV3およびSKOV3。

【0204】

抗原結合性コンストラクトがDM1にコンジュゲートされているいくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、次の細胞系（図37および38において図示）の1種または複数種であってよい：膵臓腫瘍細胞系のBxPC3、Capan-1、MiaPaca2、SW1990、Panc1；肺腫瘍細胞系のA549、Calu-3、Calu-6、NCI-H2126、NCI-H322；頭頸部腫瘍細胞系のDetroit562、SCC-15、SCC-25、FaDu；結腸直腸腫瘍細胞系のColo201、DLD-1、HCT116、HT29、SNU-C2B；胃腫瘍細胞系のSNU-1、SNU-16、NCI-N87；乳房腫瘍細胞系のSkBr3、MCF-7、MDAMB175、MDAMB361、MDA-MB-231、ZR-75-1、BT-20、BT549、BT-474、CAMA-1、MDAMB453、JIMT-1、T47D；子宮腫瘍細胞系のSK-UT-1、TOV-112D；皮膚腫瘍細胞系のA431、Malme-3M、SKEMEL28；子宮頸部腫瘍細胞系のCaski、MS751；膀胱腫瘍細胞系のT24、腎臓腫瘍細胞系のACHN；卵巣腫瘍細胞系のCaOV3、Ovar-3、およびSKOV3であってよい。

【0205】

キットおよび製品

また、1種または複数種の抗原結合性コンストラクトを含むキットを本明細書において記載する。キットの個々の構成要素は、別々の容器に包装され、かつそのような容器に付随して、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって指示された形態での注意書であってよく、その際、その注意書は、製造、使用、または販売についての機関による認可を反映する。キットは、任意選択により、抗原結合性コンストラクトの使用法または投与レジメンを概説する説明書または指示書を含むことができる。

【0206】

キットの1個または複数個の構成要素を溶液、例えば、水溶液または滅菌水溶液として提供する場合、容器の手段自体が、溶液をそこから対象に投与するか、キットの他の構成要素に適用および混合することができる吸入装置、シリンジ、ピペット、点眼装置、または他のそのような同様の装置であってよい。

【0207】

キットの構成要素は、乾燥形態または凍結乾燥形態で提供することもでき、キットは加えて、凍結乾燥された構成要素の再構成に適した溶媒を含有し得る。容器の個数または種類に関わらず、本明細書に記載のキットはまた、患者への組成物の投与を援助するための器具を含んでよい。そのような器具は、吸入装置、経鼻噴霧デバイス、シリンジ、ピペット、ピンセット、測定用スプーン、点眼装置、または同様の医学的に認められた送達ビクルであってよい。

【0208】

本明細書に記載の別の態様では、上記の障害の処置、予防、および/または診断に有用な材料を含む製品を提供する。製品は、容器、およびその容器の上か、またはそれに付随するラベルまたは添付文書を含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静脈内液バッグなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材

10

20

30

40

50

料から形成されていてよい。容器は、単独であるか、または状態の処置、予防、および/または診断に有効な別の組成物と組み合わせられた組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してよい(例えば、容器は、皮下注射針を刺し通すことができるストッパーを有する静脈内液バッグまたはバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも1種の活性薬剤は、本明細書に記載のT細胞活性化抗原結合性コンストラクトである。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選択した状態の処置のために使用されることを示している。さらに、製品は、(a)その中に、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む組成物を含有する第1の容器;および(b)その中に、さらなる細胞傷害薬または別の治療薬を含む組成物を含有する第2の容器を含んでよい。本明細書に記載のこの実施形態における製品は、組成物が特定の状態を処置するために使用することができることを示す添付文書をさらに含んでよい。別法では、または加えて、製品は、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2(または第3)の容器をさらに含んでよい。これは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的立場および使用者の立場から望ましい他の材料をさらに含んでよい。

10

【0209】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、少なくとも1種のポリペプチドを含む。本明細書に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも記載する。抗原結合性コンストラクトは典型的には、単離されている。

20

【0210】

本明細書において使用する場合、「単離された」は、その天然細胞培養環境の構成要素から同定および分離および/または回収されている作用物質(例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド)を意味する。その天然環境の混入構成要素は、抗原結合性コンストラクトの診断または治療用途に干渉するであろう物質であり、それらには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質または非タンパク質溶質が含まれ得る。「単離された」はまた、例えば、ヒトの介入によって合成されている薬剤に関する。

【0211】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書において互換的に使用される。すなわち、ポリペプチドを対象とする記載は、ペプチドの記載およびタンパク質の記載に等しく当てはまり、逆も同様である。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー、さらには、1個または複数個のアミノ酸残基が天然にはコードされないアミノ酸であるアミノ酸ポリマーに適用される。本明細書において使用する場合、この用語は、アミノ酸残基が共有結合のペプチド結合によって連結している全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を内包する。

30

【0212】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在する、および天然に存在しないアミノ酸、さらには、天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物質を指す。天然にコードされるアミノ酸は、20共通アミノ酸(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、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン)ならびにピロリシンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体は、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、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合している炭素を有する化合物を指す。そのような類似体は、修飾されたR基(ノルロイシンなど)または修飾されたペプチド主鎖を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を維持している。アミノ酸に対する言及には、例えば、天然に存在するタンパク質構成L-アミノ酸; D-アミノ酸、アミノ酸変異体および誘導体などの化学的に修飾されたアミノ酸; -アラニン、オルニチンなどの天然に存在する非タンパク質構成アミノ酸; ならび

40

50

にアミノ酸に特徴的であると当技術分野で公知の特性を有する化学的に合成された化合物が含まれる。天然に存在しないアミノ酸の例には、限定されないが、 α -メチルアミノ酸（例えば、 α -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、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン）、側鎖に外部メチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、および側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置き換えられているアミノ酸（例えば、システイン酸）が含まれる。本発明のタンパク質に、合成非天然アミノ酸、置換アミノ酸、または1個もしくは複数個のD-アミノ酸を含む非天然アミノ酸を導入することが、いくつかの異なる方法において有利であり得る。D-アミノ酸含有ペプチドなどは、L-アミノ酸-含有対応物と比較して、*in vitro*または*in vivo*で安定性の増大を示す。したがって、D-アミノ酸を組み込むペプチドなどの構築は、より大きな細胞内安定性が望まれるか、または必要な場合には、特に有用であり得る。より具体的には、D-ペプチドなどは、内在性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに対して抵抗性があり、それによって、そのような特性が望ましい場合には、*in vivo*での分子の生物学的利用能の改善および長時間の寿命をもたらす。加えて、D-ペプチドなどは、ヘルパーT細胞に対する主要組織適合性複合体クラスII制限提示について効率的にプロセシングされ得ず、したがって、生体全体における体液性免疫応答を誘導する可能性が低い。

【0213】

アミノ酸は、それらの一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号によって、本明細書において言及されることがある。同様にヌクレオチドは、それらの一般に認められている1文字コードによって言及されることがある。

【0214】

抗原結合性コンストラクトのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に含まれる。「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」という用語は、2個以上のヌクレオチド分子の連続した延伸部を示すことが意図されている。ヌクレオチド配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、もしくは合成由来、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

【0215】

「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはリボヌクレオチド、およびそれらのポリマーを指す。具体的に限定しない限り、この用語は、基準核酸と同様の結合特性を有し、かつ天然に存在するヌクレオチドと同様に代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を内包する。他に具体的に限定しない限り、この用語はまた、PNA（ペプチド核酸）、アンチセンス技術において使用されるDNAの類似体（ホスホロチオエート、ホスホロアミデートなど）を含むオリゴヌクレオチド類似体を指す。別段に示さない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に修飾されたその変異体（限定されないが、縮重コドン置換体を含む）および相補的配列、さらには、明示されている配列を暗に内包する。具体的には、1個または複数個の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作成することによって、縮重コドン置換体を達成することができる（Batzler et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

【0216】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。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を指すか、本質的に同一の配列に対してアミノ酸配列をコードしない核酸を指す。遺伝コードの縮重によって、多数の機能的に同一の核酸が、いずれか

10

20

30

40

50

の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって規定されているいずれの位置においても、コードされるポリペプチドを変更することなく、そのコドンを、記載されている対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸変異は、「サイレント変異」であり、これは、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に記載のいずれの核酸配列も、核酸の考えられるあらゆるサイレント変異を記載するものである。当業者であれば、核酸中の各コドン（通常、メチオニンのための唯一のコドンである A U G、および通常、トリプトファンのための唯一のコドンである T G G 以外）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを認めるであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が、それぞれ記載の配列において暗示されている。

10

【 0 2 1 7 】

アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コードされる配列中の単一のアミノ酸またはアミノ酸の低いパーセンテージを変更、付加、または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加は、その変更がアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または化学的に同様のアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらす「保存的に修飾された変異体」であることを認めるであろう。機能的に同様のアミノ酸をもたらす保存的置換表は、当業者に公知である。そのような保存的に修飾された変異体は、本明細書に記載の多型変異体、種間同族体、および対立遺伝子に加えられ、それらを排除しない。

20

【 0 2 1 8 】

機能的に同様のアミノ酸をもたらす保存置換表は、当業者に公知である。次の 8 つの群はそれぞれ、相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リシン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、トレオニン (T)；および [0 1 3 9] 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)) を参照されたい)。

30

【 0 2 1 9 】

2 つ以上の核酸またはポリペプチド配列の内容における「同一」または「同一」率という用語は、同じである 2 つ以上の配列またはサブ配列に関する。次の配列比較アルゴリズム (または当業者が利用可能な他のアルゴリズム) の 1 つを使用して測定して、または手動のアラインメントおよび目視検査によって、比較ウィンドウまたは指定の領域にわたって最大対応について比較およびアラインした場合に、同じ (すなわち、規定の領域にわたって同一性約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95%) であるアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージを有するならば、それらの配列は「実質的に同一」である。この定義はまた、試験配列の補体に関する。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である領域にわたって、または 75 ~ 100 アミノ酸またはヌクレオチド長である領域にわたって、または規定されていない場合には、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列全体を通して存在し得る。ヒト以外の種からの同族体を含めて、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリを、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはその断片を有する標識プローブでスクリーニングするステップと、上記ポリヌクレオチド配列を含有する全長 cDNA およびゲノムクローンを単離するステップとを含むプロセスによって得ることができる。そのようなハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知である。

40

【 0 2 2 0 】

50

配列の比較では典型的に、1つの配列を、基準配列として役立て、それに対して、試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験および基準配列をコンピュータに入力し、サブ配列座標を指定し、必要な場合には、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。初期設定プログラムのパラメータを使用することも、または代替パラメータを指定することもできる。次いで、配列比較アルゴリズムが、そのプログラムのパラメータに基づき、基準配列に対する試験配列の配列同一率を算出する。

【0221】

「比較ウィンドウ」は、本明細書において使用する場合、2つの配列を最適に配列させた後、一方の配列を、同数の連続した位置の基準配列と比較することができる20~600、通常は約50~約200、より通常は約100~約150からなる群から選択される複数の連続した位置の任意の1つのセグメントに対する言及を含む。比較のための配列のアラインメント方法は、当業者に公知である。限定されないが、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所相同アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似方法に関する研究、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) のコンピューター制御実施、または手動アラインメントおよび目視検査 (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) を参照されたい) によるものを含む比較のための配列の最適なアラインメントを行うことができる。

【0222】

配列同一率および配列類似率を決定するために適したアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410において記載されている。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センターを通じて公に利用可能であり、ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.govにおいて入手することができる。BLASTアルゴリズムのパラメータW、T、およびXによって、アラインメントの感度および速度が決まる。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列で) は、初期設定値として、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M = 5、N = -4、および両ストランドの比較を使用する。アミノ酸配列では、BLASTPプログラムは、初期設定値として、ワード長3、期待値 (E) 10、およびBLOSUM62スコアマトリクス (HenikoffおよびHenikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照されたい) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = -4、および両ストランドの比較を用いる。BLASTアルゴリズムを典型的には、「低複雑性」フィルターをオフにして行う。

【0223】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計的解析を実行する (例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877を参照されたい)。BLASTアルゴリズムによって得られる類似性の測定値の1つは、最小合計確率 (smallest sum probability) (P(N)) であり、これは、2つのヌクレオチド配列間か、または2つのアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率を示す。例えば、核酸は、試験核酸と基準核酸との比較において最小合計確率が約0.2未満、または約0.01未満、または約0.001未満である場合に、基準配列と類似しているとみなさ

10

20

30

40

50

れる。

【0224】

「～と選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」という表現は、その配列が複雑な混合物（限定されないが、全細胞またはライブラリDNAまたはRNAを含む）中に存在する場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で分子が特定のヌクレオチド配列のみと結合、二重鎖化、またはハイブリダイズすることを指す。

【0225】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という表現は、当技術分野で公知のとおり低いイオン強度および高温の条件下でのDNA、RNA、もしくは他の核酸、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションに関する。典型的には、ストリンジェントな条件下で、核酸の複雑な混合物（限定されないが、全細胞またはライブラリDNAまたはRNAを含む）中で、プローブはその標的サブ配列とハイブリダイズするが、その複雑な混合物中の他の配列とはハイブリダイズしない。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、種々の状況において異なる。比較的長い配列は特に高い温度でハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広範な指針は、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)において見出される。

【0226】

本明細書において使用する場合、「操作する、操作された、操作すること」という用語は、天然に存在するか、もしくは組換えのポリペプチドまたはその断片のペプチド主鎖の任意の操作または翻訳後修飾を含むことが考慮される。操作には、アミノ酸配列、糖鎖形成パターン、または個々のアミノ酸の側鎖基の修飾、さらには、これらの手法の組み合わせが含まれる。操作されたタンパク質を、標準的な分子生物学技術によって発現および生成する。

【0227】

「単離核酸分子またはポリヌクレオチド」では、その天然環境から取り出されている核酸分子、DNA、またはRNAが意図されている。例えば、ベクター中に含有される、ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、単離されているとみなされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種の宿主細胞中で維持されている組換えポリヌクレオチド、または溶液中の（部分的に、または実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離ポリヌクレオチドには、ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞中に含まれるポリヌクレオチド分子が含まれるが、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。単離RNA分子には、*in vivo*または*in vitro* RNA転写物、さらには、ポジティブおよびネガティブストランド形態、ならびに二本鎖形態が含まれる。本明細書に記載の単離ポリヌクレオチドまたは核酸にはさらに、例えば、PCRまたは化学合成によって、合成されたそのような分子が含まれる。加えて、ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸には、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの調節エレメントが含まれる。

【0228】

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」という用語は一般に、例えば、米国特許第4,683,195号において記載されているとおりの*in vitro*で所望のヌクレオチド配列を増幅するための方法を指す。一般に、PCR方法は、テンプレート核酸に優先的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプライマーを使用するプライマー伸長合成の繰り返しサイクルを必要とする。

【0229】

本発明の基準ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、95%「同一な」ヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列を有する核酸またはポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチド配列が、基準ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドごとに5つまでの点突然変異を含み得る場合は除いて、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、基準配列と同一であることが意図されている。言い換えると、基準ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためには、基準配列内のヌクレオチドの5%までが欠失していてもよい、または別のヌクレオチドで置換されているとよい、または基準配列内の全ヌクレオチドの5%までいくつかのヌクレオチドが、基準配列に挿入されているとよい。基準配列のこれらの変更は、基準ヌクレオチド配列の5'または3'末端位で、またはそれらの末端位の間どこかで、基準配列中の残基内で個々に散在して、または基準配列内で1つもしくは複数の連続する群で生じていてもよい。実際問題として、いずれの特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるかどうかは、ポリペプチドについて上記で検討したものなどの公知のコンピュータプログラム（例えば、ALIGN-2）を使用して従来どおり決定することができる。

10

【0230】

ポリペプチドの誘導体または変異体は、その誘導体または変異体のアミノ酸配列が元のペプチドからの100アミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有する場合に、そのペプチドと「相同性」を共有しているか、それと「相同」であると記載される。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも75%同じである。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも85%同じである。ある特定の実施形態では、誘導体のアミノ酸配列は、その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%同じである。いくつかの実施形態では、誘導体のアミノ酸配列は、その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%同じである。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも99%同じである。

20

【0231】

「修飾された」という用語は、本明細書において使用する場合、ポリペプチドの長さ、ポリペプチドのアミノ酸配列、化学構造の変化、同時翻訳修飾、または翻訳後修飾など、所与のポリペプチドに対して成された任意の変化を指す。「(修飾)」用語という形態は、論述されているポリペプチドが、任意選択により修飾されている、すなわち、論述中のポリペプチドが修飾されていても修飾されていなくてもよいことを意味する。

30

【0232】

いくつかの態様では、抗原結合性コンストラクトは、本明細書において開示する表（複数可）または受入番号（複数可）において記載する関連アミノ酸配列またはその断片と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、単離された抗原結合性コンストラクトは、本明細書において開示する表（複数可）または受入番号（複数可）において記載する関連ヌクレオチド配列またはその断片と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む。

40

【0233】

本発明は、本明細書に記載の特定のプロトコル；細胞系、コンストラクト、および試薬に限定されず、したがって変化し得ることは理解されるはずである。本明細書において使用する専門用語は、特定の実施形態を記載することのみを目的としたものであって、本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも理解されるはずである。

【0234】

本明細書において言及する刊行物および特許はすべて、例えば、本明細書に記載の発明と関連して使用され得る、それらの刊行物において記載されているコンストラクトおよび

50

方法を記載および開示することを目的として、参照によって本明細書に組み込まれる。本明細書において考察する刊行物は、本出願の出願日前に開示するためのみに提供される。本明細書に記載のいずれも、先行発明によるか、または他の何らかの理由によって、本発明者らがそのような開示に先行する権利を有していないことを承認するものと解釈されるべきではない。

【 0 2 3 5 】

参照文献

Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, Marquis D, Ondek B, Wooldridge JE, Smith BJ, Breitmeyer JB, Weiner GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2648-54. Epub 2006 Jul 6.

10

Desjarlais JR, Lazar GA. Modulation of antibody effector function. *Exp Cell Res*. 2011 May 15;317(9):1278-85.

Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12669-74.

20

Heider KH, Kiefer K, Zenz T, Volden M, Stilgenbauer S, Ostermann E, Baum A, Lamche H, Küpcü Z, Jacobi A, Müller S, Hirt U, Adolf GR, Borges E. A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27.

30

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10. Epub 2006 Mar 6.

Lu Y, Vernes JM, Chiang N, Ou Q, Ding J, Adams C, Hong K, Truong BT, Ng D, Shen A, Nakamura G, Gong Q, Presta LG, Beresini M, Kelley B, Lowman H, Wong WL, Meng YG. Identification of IgG(1) variants with increased affinity to FcγRIIIa and unaltered affinity to FcγRI and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-based binding assays. *J Immunol Methods*. 2011 Feb 28;365(1-2):132-41. Epub 2010 Dec 23. 10

Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*. 2011 Nov;16(11):1071-1080.

Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9. 20

Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, Li H, Ciccarone V, Zhang T, Stavenhagen J, Koenig S, Stewart SJ, Moore PA, Johnson S, Bonvini E. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc-gamma receptor binding properties. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 30;13(6):R123. [Epub ahead of print] 30

Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Aug;7(8):2517-27.

Schneider S, Zacharias M. Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol*. 2012 May;51(1):66-72.

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604. 40

Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuaille N, Rankin CT, Li H, Burke S, Huang L, Vijn S, Johnson S, Bonvini E, Koenig S. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8882-90.

Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM, Webster C, Jermutus L, Lund J. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Sep;24(9):671-8. Epub 2011 May 18.

10

【実施例】

【0236】

以下は、本発明を実施するための具体的な実施形態の例である。実施例は、実例を目的として提供するに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものでは全くない。使用する数値（例えば、量、温度など）に関して確度を保証する努力はしたが、むろん、多少の実験誤差および偏差は許容されるべきである。

【0237】

本発明の実行では、別段に示さない限り、当分野の技能の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、および薬理学の従来の方法を使用する。そのような技術は、文献において十分に説明されている。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。

20

30

【0238】

実施例1： 例示的な抗HER2二重特異性抗体および対照の調製

いくつかの例示的な抗HER2二重パラトピック抗体（または抗原結合性コンストラクト）および対照を、下記のとおり調製した。抗体および対照を種々の形式で調製し、例示的な二重パラトピック形式の表現を図1において示す。図1に示されている形式のすべてにおいて、ヘテロ二量体Fcは、黒色で示されている一方の鎖（鎖A）および灰色で示されている他方の鎖（鎖B）で図示されており、一方の抗原結合性ドメイン（1）は、斜線を掛けて示されており、他方の抗原結合性ドメイン（2）は白色で示されている。

40

【0239】

図1Aは、Fab-Fab形式の二重パラトピック抗体の構造を図示する。図1B~1Eは、scFv-Fab形式の二重パラトピック抗体の考えられ得るバージョンの構造を図示する。図1Bでは、抗原結合性ドメイン1は、鎖Aに融合しているscFvであり、抗原結合性ドメイン2は、鎖Bに融合しているFabである。図1Cでは、抗原結合性ドメイン1は、鎖Aに融合しているFabであり、抗原結合性ドメイン2は、鎖Bに融合しているscFvである。図1Dでは、抗原結合性ドメイン2は、鎖Aに融合しているFabであり、抗原結合性ドメイン1は、鎖Bに融合しているscFvである。図1Eでは、抗原結合性ドメイン2は、鎖Aに融合しているscFvであり、抗原結合性ドメイン1は

50

、鎖Bに融合しているFabである。図1Fでは、抗原結合性ドメインは両方ともscFvである。

【0240】

次の変異体の配列は、実施例の後にある配列の表において提供する。CDR領域を、KabataおよびChothia法の組み合わせを使用して特定した。特定のために使用する方法に基づき、領域は多少変わり得る。

【0241】

例示的な抗HER2二重パラトピック抗体

例示的な抗HER2二重パラトピック抗体を、表1において示すとおりに調製した。

(表1) 例示的な抗HER2二重パラトピック抗体

変異体		鎖A	鎖B
5019	エピトープを含有するドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	エピトープを含有するドメイン	ECD4	ECD2
	形式	scFv	Fab
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	CH3配列置換	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
7091	エピトープを含有するドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ

10

20

30

	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W	
10000	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4	
	形式	Fab	scFv	
	抗体名	ペルツズマブ - VL領域中にY96A およびVH領域中にT30A/A49G/L69F を含む	トラスツズマブ	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W	10
6902	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4	
	形式	Fab	Fab	
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ	
	Fab 置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W	20
6903	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4	
	形式	Fab	Fab	
	Fab 置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E	
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W	30
6717	エピトープを 含有する ドメイン	ECD4	ECD2	
	形式	scFv	scFv	
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W	40

注釈：

・EU抗体の付番を参照しての、KababでのEUインデックスによるCH3付番 (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85)；

・KababによるFabまたは可変ドメイン付番 (Kabab and Wu, 1991; Kabab et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, p 647 (1991))；

- ・「エピトープを含有するドメイン」= 抗原結合性部分が結合するHER2のドメイン；
- ・「抗体名称」= 抗原結合性部分が由来する抗体は、存在する場合には野生型と比較される置換を含む；
- ・「Fab置換」= 正確な軽鎖対形成を促進する、Fabにおける置換；
- ・「CH3配列置換」= ヘテロ二量体Fcの形成を促進する、CH3ドメインにおける置換。

【0242】

例示的な抗HER2一価対照抗体

v1040：HER2結合性ドメインが、鎖A上の、トラスツズマブから誘導されたFabであり、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異を有し、鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異を有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域がC226Sの変異を有し；抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する一価抗HER2抗体。

10

【0243】

v630：HER2結合性ドメインが、鎖A上の、トラスツズマブから誘導されたscFvであり、Fc領域が、鎖AにL351Y__S400E__F405A__Y407Vの変異を有し、鎖BにT366I__N390R__K392M__T394Wの変異を有するヘテロ二量体であり；ヒンジ領域が両方の鎖にC226Sの変異（EU付番）を有し；抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する一価抗HER2抗体。

【0244】

v4182：HER2結合性ドメインが、鎖A上の、ペルツズマブから誘導されたFabであり、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異を有し、鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異を有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域がC226Sの変異を有し；抗原結合性ドメインが、HER2のドメイン2に結合する一価抗HER2抗体。

20

【0245】

例示的な抗HER2単一特異性二価抗体対照（フルサイズ抗体、FSA）

v506は、対照として、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において自家生成した野生型抗HER2である。HER2結合性ドメインは両方とも、Fab形式でトラスツズマブから誘導されており、Fcは、野生型ホモ二量体であり；抗原結合性ドメインは、HER2のドメイン4に結合する。この抗体は、トラスツズマブ類似体とも称される。

30

【0246】

v792は、HER2結合性ドメインが両方とも、Fab形式でトラスツズマブから誘導されており、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異および鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異を有するヘテロ二量体であり；抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する、IgG1ヒンジを備えた野生型トラスツズマブである。この抗体は、トラスツズマブ類似体とも称される。

【0247】

v4184、HER2結合性ドメインが両方とも、Fab形式でペルツズマブから誘導されており、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異および鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異を有するヘテロ二量体である、二価抗HER2抗体。抗原結合性ドメインは、HER2のドメイン2に結合する。この抗体は、ペルツズマブ類似体とも称される。

40

【0248】

hIgGは、市販の非特異的ポリクローナル抗体対照である（Jackson ImmunoResearch、# 009-000-003）。

【0249】

これらの抗体および対照（ヒトIgG以外）を次のとおりにクローニングし、発現させ

50

た。抗体重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を、ヒト/哺乳動物発現のために最適化されたコドンを使用する遺伝子合成によって構築した。トラスツズマブFab配列を、既知のHER2/neuドメイン4結合抗体から生成した(Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci 89, 4285)。Fcは、IgG1アイソタイプであった。scFv配列を、グリシン-セリンリンカーを使用してトラスツズマブのVHおよびVLドメインから生成した(Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 her2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci 89, 4285.)。ペルツズマブFab配列を、既知のHER2/neuドメイン2結合性Abから生成した(Adams CW et al. (2006) Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic her dimerization inhibitor, Pertuzumab. Cancer Immunol Immunother, 2006; 55(6): 717-27)。

10

【0250】

最終遺伝子産物を哺乳動物発現ベクターPTT5(NRC-BRI, Canada)にサブクローニングし、CHO細胞において発現させた(Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. Nucleic acids research 30, e9(2002))。

20

【0251】

CHO細胞を、指数増殖期(1.5~2百万細胞/ml)において、2.5:1のPEI:DNA比で1mg/ml 25kDaポリエチレンイミン水溶液(PEI, poly sciences)でトランスフェクトした(Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1): 44-51 (2011))。ヘテロ二量体の形成に最適な濃度範囲を決定するために、DNAを、ヘテロ二量体形成を可能にする重鎖(HC-A)、軽鎖(LC)、および重鎖B(HC-B)の最適なDNA比においてトランスフェクトした(例えば、HC-A/HC-B/LC比=30:30:40(v5019))。5~6日間の後に、トランスフェクトした細胞を培養培地と一緒に採集し、4000rpmで遠心した後、0.45µmフィルターを使用して清澄化した。

30

【0252】

清澄化培養培地を、MabSelect SuRe(GE Healthcare)プロテインAカラムに装填し、10カラム体積のPBS緩衝液(pH7.2)で洗浄した。抗体を10カラム体積のクエン酸緩衝液(pH3.6)で溶離し、抗体を含有する貯留画分を、トリス(pH11)で中和した。

40

【0253】

プロテインA抗体溶離液を、ゲル濾過(SEC)によってさらに精製した。ゲル濾過のために、抗体混合物3.5mgを1.5mLまで濃縮し、1mL/分の流速でAKTA Express FPLCによってSephadex 200 HiLoad 16/600 200pgカラム(GE Healthcare)に装填した。PBS緩衝液(pH7.4)を1mL/分の流速で使用した。精製抗体に対応する画分を収集し、約1mg/mLに濃縮した。

【0254】

50

種々の分子形式を有する例示的な抗HER2 ECD2×ECD4二重パラトピック抗体（例えば、v6717ではscFv-scFv IgG1；v6903およびv6902ではFab-Fab IgG1；v5019、v7091、およびv10000ではFab-scFv IgG1）を上記のとおりクロニングし、発現させ、精製した。

【0255】

抗体純度を定量し、標的ヘテロ二量体タンパク質ならびに考えられ得るホモ二量体および/または半抗体および/または誤った対の軽鎖混入物の量を決定するために、LC-MSインタクト質量分析(intact mass analysis)を行った。LC-MSインタクト質量分析は、ADC分子のために使用されるDAR分析計算を除いて、実施例2において記載するとおりに行った。

【0256】

データを表2において示す。表2は、これらの二重パラトピック抗体の発現および精製が、v6717では所望の生成物100%、v6903では所望のヘテロ二量体生成物91%、およびv6902では所望の生成物62%をもたらしたことを示している。括弧内の数値は、メインピークおよび+81Daのサイドピークの合計量を示している。このサイドピークは典型的には、C末端HAタグを含む変異体(v6903およびv6902など)で検出される。メインピークおよびサイドピークを合わせると、v6903およびv6903では、約98%および67%のヘテロ二量体純度が得られる。高いヘテロ二量体純度に基づき、v6903を、scFv-scFvおよびFab-scFv形式と直接的に比較するための代表的なFab-Fab抗HER2二重パラトピック変異体と特定した。

(表2) 抗体の発現および精製

変異体	所望のヘテロ二量体種 (+サイドピーク)
6717	100.0
6903	90.9 (97.7)
6902	62.4 (67.4)

【0257】

実施例2： 例示的な抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲート(ADC)の調製

次の抗HER2二重パラトピック抗体薬物コンジュゲート(抗HER2二重パラトピック-ADC)を調製した。変異体5019、7091、10000、および506のADCを調製した。これらのADCは、次のとおり特定される：

v6363 (DM1にコンジュゲートさせたv5019)

v7148 (DM1にコンジュゲートさせたv7091)

v10553 (DM1にコンジュゲートさせたv10000)

v6246 (DM1にコンジュゲートさせたv506、T-DM1、トラスツズマブ-エムタンシンと類似)

v6249 (DM1にコンジュゲートさせたヒトIgG)。

【0258】

ADCを、メイタンシンへの直接的なカップリングによって調製した。実施例1において記載したとおりプロテインAおよびSECによって精製した抗体(純度>95%)を、ADC分子の調製において使用した。ADCを、Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. Cancer Res 2006; 66: 3214-21において記載されている方法に従ってコンジュゲートさせた。ADCは、LC/MSによって決定されるとおり、また下記のとおり、抗体1個当たり3.0個の

メイタンシノイド分子の平均モル比を有した。

【0259】

ADCコンジュゲーション反応において使用される試薬の詳細は次のとおりである：コンジュゲーション緩衝液1：50 mMリン酸カリウム / 50 mM塩化ナトリウム、pH 6.5、2 mM EDTA。コンジュゲーション緩衝液2：50 mMコハク酸ナトリウム、pH 5.0。ADC調製緩衝液：20 mMコハク酸ナトリウム、6% (w/v) トレハロース、0.02% ポリソルベート20、pH 5.0。ジメチルアセトアミド (DMA)；DMA中の10 mM SMCC (コンジュゲーションの前に調製)、DMA中の10 mM DM1-SH (コンジュゲーションの前に調製)、PBS中の1 mM DTNB、緩衝液中の1 mMシステイン、20 mMコハク酸ナトリウム、pH 5.0。UV-VIS分光光度計 (Fisher Scientific製のNano drop 100)、PD-10カラム (GE Healthcare)。

10

【0260】

ADCを次のとおりに調製した。出発抗体溶液を、コンジュゲーション緩衝液1 25 mLで予め平衡化させておいたPD-10カラムに装填し、続いて、コンジュゲーション緩衝液1 0.5 mLを装填した。抗体溶離液を収集し、濃度を A_{280} で測定し、濃度を20 mg/mLに調節した。DMA中の10 mM SMCC-DM1溶液を調製した。抗体に対して7.5モル当量のSMCC-DM1を抗体溶液に添加し、DMAを10% v/vの最終DMA体積まで添加した。反応物を短時間混合し、室温で2時間にわたってインキュベートした。第2のPD-10カラムをコンジュゲーション緩衝液1 25 mLで平衡化させ、抗体-MCC-DM1溶液を、続いて、緩衝液1 0.5 mLをカラムに添加した。抗体-MCC-DM1溶離液を収集し、抗体溶液の A_{252} および A_{280} を測定した。抗体-MCC-DM1濃度を算出した ($= 1.45 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、または $217500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。ADCを、高MW分析のためのSEC-HPLCカラムで分析した (SEC-HPLCカラムTOSOH、G3000-SWXL、7.8 mm x 30 cm、緩衝液、100 mMリン酸ナトリウム、300 mM塩化ナトリウム、pH 7.0、流速：1 mL/分)。

20

【0261】

ADC薬-抗体比 (DAR) を、Tosoh TSKゲルButyl-NPRカラム (4.6 mm x 3.5 mm x 2.5 mm) を使用するHIC-HPLCによって分析した。溶離を、25分かけての10~90%緩衝液Bの勾配、続く、4分間の100%緩衝液Bを使用して1 mL/分で行った。緩衝液Aは、20 mMリン酸ナトリウム、1.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0を含む。緩衝液Bは、20 mMリン酸ナトリウム、25% v/vイソプロパノール、pH 7.0を含む。

30

【0262】

ADC薬-抗体比 (DAR) を、次の方法によってLC-MSで決定した。抗体を、LC-MSに装填する前にPNGアーゼFで脱グリコシル化した。液体クロマトグラフィーを、次の条件下でAgilent 1100 Series HPLCで実施した：

【0263】

流速：1 mL/分、カラムの後に分流してMSには100 μ L/分。溶媒：A = ddH₂O中の0.1%ギ酸、B = 65%アセトニトリル、25% THF、9.9% ddH₂O、0.1%ギ酸。カラム：2.1 x 30 mm Poros R2。カラム温度：80；溶媒も予め加熱。勾配：20% B (0~3分)、20~90% B (3~6分)、90~20% B (6~7分)、20% B (7~9分)。

40

【0264】

引き続いて、質量分析法 (MS) を次の条件下で、Ion Max Electrosprayを使用するイオン化法でLTQ-Orbitrap XL質量分析計で実施した。校正およびチューニング方法：CsIの2 mg/mL溶液を10 μ L/分の流速で注入する。Orbitrapを、Automatic Tune機能を使用してm/z 221.1にチューニングした (観察された全CsIイオン範囲：1690~2800)。コーン

50

電圧：40V；チューブレンズ：115V；FT分解：7,500；走査範囲m/z400～4000；走査遅延：1.5分。データの分子量プロファイルを、Thermo's Promass デコンボリューションソフトウェアを使用して生成した。試料の平均DARを、各画分ピークで観察されたDARの関数として決定した（計算式： $(DAR \times \text{画分ピーク強度})$ を使用）。

【0265】

表3に、ADC分子での平均DARをまとめる。例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および対照での平均DARは約3であった。

（表3）

	DAR (LC-MS)	DAR (HIC)	n
v6246	2.9	3.0	5
v6363	2.6	3.3	5
v7148	3.4	3.9	1
v10553	4.0	4.0	1

10

【0266】

実施例3：抗HER2二重パラトピック抗体の発現およびベンチスケール精製

実施例1において記載した抗HER2二重パラトピック抗体（v5019、v7091、およびv10000）を、10Lおよび/または25L体積で発現させ、次のとおりにプロテインAおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって精製した。

20

【0267】

清澄化培養培地を、MabSelect SuRe（GE Healthcare）プロテインAカラムに装填し、10カラム体積のPBS緩衝液（pH7.2）で洗浄した。抗体を、10カラム体積のクエン酸緩衝液（pH3.6）で溶離し、抗体を含有する貯留画分をトリス（pH11）で中和した。

【0268】

プロテインA抗体溶離液を、ゲル濾過（SEC）によってさらに精製した。ゲル濾過のために、抗体混合物3.5mgを1.5mLに濃縮し、1mL/分の流速でAKTAE xpress FPLCによって、Sephadex 200 HiLoad 16/600 200pgカラム（GE Healthcare）に装填した。PBS緩衝液（pH7.4）を1mL/分の流速で使用した。精製抗体に対応する画分を収集し、約1mg/mLに濃縮した。精製タンパク質を、実施例2において記載したとおりにLC-MSによって分析した。

30

【0269】

10L発現ならびにベンチスケールでのプロテインAおよびSEC精製の結果を図2Aおよび2Bに示す。図2Aは、プロテインA精製v5019のSECクロマトグラフを示しており、図2Bは、プロテインA貯留画分、さらにはSEC画分15および19ならびに貯留SEC画分16～18の相対純度を比較する非還元型SDS-PAGEゲルを示している。これらの結果は、抗HER2二重パラトピック抗体が発現されたこと、およびプロテインAおよびSECによる精製が純粋なタンパク質試料をもたらしたことを示している。さらなる定量を、UPLC-SECおよびLC-MS分析によって行い、実施例4において記載する。

40

【0270】

25L発現およびベンチスケールでのプロテインA精製の結果を、図2Cにおいて示す。図2Cは、プロテインA精製v10000の相対純度を比較するSDS-PAGEゲルを示している。レーンMは、タンパク質マーカースを含み；レーン1は、還元条件下でのv10000を含み；レーン2は、非還元条件下でのv10000を含む。SDS-PAGEゲルは、v10000が純粋であり、非還元条件下で約125kDaの正確な予測MW

50

で泳動することを示している。還元条件下では、C H - A 重鎖 (約 49 k D a) および C H - B 重鎖 (約 52.5 k D a) に対応する 2 つの重鎖バンドを視認することができ ; C H - A 軽鎖を視認することができ、これは、約 23.5 k D a の正確な予測質量で泳動する。これらの結果は、抗 H E R 2 二重パラトピック抗体が発現されること、およびプロテイン A によるワンステップ精製が純粋なタンパク質試料をもたらすことを示している。さらなる定量を、U P L C - S E C および L C - M S 分析によって行い、実施例 4 において記載する。

【 0 2 7 1 】

実施例 4 : U P L C - S E C および L C - M S による二重パラトピック抗 H E R 2 抗体の純度の分析

例示的なプロテイン A および S E C 精製された二重パラトピック抗 H E R 2 ヘテロ多量体の純度および凝集率を、上記の方法による U P L C - S E C によって決定した。

【 0 2 7 2 】

U P L C - S E C 分析を、30 に設定した W a t e r s B E H 2 0 0 S E C カラム (2.5 m L , 4.6 x 150 m m , ステンレス鋼、1.7 μ m 粒子) を使用して 0.4 m l / 分で行った。泳動時間は 7 分であり、25 m M リン酸ナトリウム、150 m M 酢酸ナトリウム、p H 7.1 ; および 150 m M リン酸ナトリウム、p H 6.4 ~ 7.1 からなる泳動緩衝液を用いて、注入 1 回当たりの全体積は 2.8 m L であった。吸光度による検出を、190 ~ 400 n m で蛍光によって容易にし、280 n m で励起し、発光を 300 ~ 360 n m で収集した。ピーク積分を E m p o w e r 3 ソフトウェアによって分析した。

【 0 2 7 3 】

貯留 v 5 0 1 9 S E C 画分の U P L C - S E C 結果を図 3 A において示す。これらの結果は、例示的な抗 H E R 2 二重パラトピック抗体が、プロテイン A および S E C クロマトグラフィーによって H M W 種 1 % 未満で純度 99 % 超まで精製されたことを示している。

【 0 2 7 4 】

v 1 0 0 0 0 の貯留プロテイン A 画分の U P L C - S E C 結果を図 3 B において示す。これらの結果は、例示的な抗 H E R 2 二重パラトピック抗体が、プロテイン A およびクロマトグラフィーによって H M W 種 1 % 未満で純度 96 % 超まで精製されたことを示している。

【 0 2 7 5 】

例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 抗体の純度を、実施例 2 において記載した方法によって、標準的な条件下で L C - M S を使用して決定した。v 5 0 1 9 の貯留 S E C 画分の L C - M S 分析からの結果を図 4 A において示す。このデータは、例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 ヘテロ二量体が 100 % のヘテロ二量体純度を有することを示している。v 1 0 0 0 0 の貯留プロテイン A 画分の L C - M S 分析からの結果を図 4 B において示す。このデータは、例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 ヘテロ二量体が、ワンステッププロテイン A 精製後に、98 % のヘテロ二量体純度を有することを示している。

【 0 2 7 6 】

プロテイン A クロマトグラフィーならびに / またはプロテイン A および S E C によって精製された抗体を、次の実施例に記載のアッセイのために使用した。

【 0 2 7 7 】

実施例 5 . プロテイン A および C E X クロマトグラフィーによって精製された二重パラトピック抗 H E R 2 抗体の大規模発現および製造可能性の評価

実施例 1 に記載の例示的な抗 H E R 2 二重パラトピック抗体 v 5 0 1 9 を 25 L 規模で発現させ、次のとおり精製した。

【 0 2 7 8 】

抗体を上清から得、記載のプロトコルによるプロテイン A 精製 (M a b S e l e c t (商標) 樹脂 ; G E H e a l t h c a r e) 、続く、カチオン交換クロマトグラフィー (H i T r a p (商標) S P F F 樹脂 ; G E H e a l t h c a r e) からなる 2 ステッ

10

20

30

40

50

ブ精製方法を続けた。

【0279】

CHO-3E7細胞を、オービタルシェーカー（VWR Scientific、Chester、PA）上、37℃、5%CO₂のエルレンマイヤーフラスコ（Corning Inc.、Acton、MA）内で、無血清Freestyle CHO発現培地（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）中に維持した。トランスフェクションの2日前に、Wave Bioreactor System 20/50（GE Healthcare Bio-Science Corp）を使用して、25Lの体積で、50L Cell Bagに、適切な密度で細胞を播種した。トランスフェクションの当日に、DNAおよびPEI（Polysciences、Eppelheim、ドイツ）を、最適な比で混合し、実施例1に記載の方法を使用して細胞に添加した。6日目に収集した細胞上清をさらに精製するために使用した。

10

【0280】

細胞培養ブロス遠心し、濾過し、その後、10.0mL/分で、XK26/20（GE Healthcare、Uppsala、Sweden）に充填された30mL Mabselect（商標）樹脂に装填した。適切な緩衝液で洗浄および溶離した後に、画分を収集し、1Mトリス-HCl（pH9.0）で中和した。標的タンパク質を、XK16/20（GE Healthcare、Uppsala、Sweden）に充填された20mL SPFF樹脂によってさらに精製した。Mabselect（商標）精製試料を20mM NaAc（pH5.5）で希釈し、伝導性を5ms/cm未満に調整し、50mMクエン酸（pH3.0）を添加して、試料pH値を5.5に調整した。試料を、HiTrap（商標）SPFF樹脂（GE Healthcare）上に1mL/分で装填し、20mM NaAcで洗浄した。タンパク質を、1mL/分で0~100%の20mM NaAc、1M NaCl、pH5.5、10CVの勾配溶離を使用して溶離した。

20

【0281】

精製タンパク質を、実施例1に記載のSDS-PAGE、および実施例4に記載の方法によるヘテロ二量体純度のためのLC-MSによって分析した。結果を、図5Aおよび5Bにおいて示す。図5Aは、Mabselect（商標）およびHiTrap（商標）SPFF精製後のv5019のSDS-PAGE結果を示しており：レーンMはタンパク質マーカースを含み；レーン1は還元条件下でのv5019（3μg）を含み；レーン2は非還元条件下のv5019を含む（2.5μg）。SDS-PAGEゲルは、v5019が、Mabselect（商標）およびHiTrap（商標）SPFF精製後に相対的に純粋であり、非還元条件下で、約125kDaの正確な予測MWで泳動することを示している。還元条件下では、CH-A重鎖（約49kDa）およびCH-B重鎖（約52.5kDa）に対応する2つの重鎖バンドを視認することができ；CH-A軽鎖を視認することができ、これは、約23.5kDaの正確な予測質量で泳動する。

30

【0282】

Mabselect（商標）およびHiTrap（商標）SPFF精製したv5019のLC-MS分析を、実施例4に記載の方法を使用して行って、ヘテロ二量体純度を決定した。LC-MS分析からの結果を、図5Bにおいて示す。これらの結果は、Mabselect（商標）およびHiTrap（商標）SPFFを使用したv5019精製が、99%超のヘテロ二量体純度および少量（1%未満）または検出不可能なホモ二量体または半抗体汚染を示すタンパク質をもたらすことを示している。

40

【0283】

実施例6：低レベルから高レベルのHER2を発現する細胞系における、二重パラトピック抗HER2抗体のBmaxと対照のBmaxとの比較

様々なレベルのHER2を発現する細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を対照と比較して測定するために、次の実験を行った。使用した細胞系は、SKOV3（HER2 2+/3+）、JIMT-1（HER2 2+）、MDA-MB

50

- 231 (HER2 0/1+)、およびMCF7 (HER2 1+)であった。試験した二重パラトピック抗HER2抗体には、v5019、v7091、およびv10000が含まれる。HER2発現(HER2+)細胞に結合する二重パラトピック抗HER2抗体の能力を、 B_{max} および見掛け K_D (平衡解離定数)の具体的な測定と共に、以下に記載するとおりに決定した。

【0284】

HER2+細胞の表面への試験抗体の結合をフローサイトメトリーによって決定した。細胞をPBSで洗浄し、 1×10^5 細胞/ $100 \mu\text{l}$ でDMEMに再懸濁させた。細胞懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を、各マイクロ遠心管に添加し、続いて、抗体変異体 $10 \mu\text{l}$ /管を添加した。管を、回転器上、4で2時間にわたってインキュベートした。マイクロ遠心管を室温、2000RPMで2分間にわたって遠心し、細胞ペレットを培地 $500 \mu\text{l}$ で洗浄した。各細胞ペレットを、 $2 \mu\text{g}$ /試料まで培地中で希釈したフルオロクロム標識された二次抗体 $100 \mu\text{l}$ に再懸濁させた。次いで、試料を、回転器上、4で1時間にわたってインキュベートした。インキュベーション後に、細胞を2000rpmで2分間にわたって遠心し、培地中で洗浄した。細胞を培地 $500 \mu\text{l}$ に再懸濁させ、ヨウ化プロピジウム(PI) $5 \mu\text{l}$ を含有する管に濾過し、製造元指示書に従ってBD LSR IIフローサイトメーターで分析した。例示的な二重パラトピック抗HER2ヘテロ二量体抗体および対照抗体の K_D を、GraphPad Prismにおいて行われるデータ分析および曲線フィッティングを用いてFACSによって評価した。

【0285】

結果を図6A~6Gにおいて示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019、v7091、およびv10000)が、抗HER2 FSA(v506)と比較して約1.5倍高い B_{max} で、HER2+細胞に結合し得ることを実証している。図6A~6Gにおける結果も、二重パラトピック抗HER2抗体(v5019、v7091、およびv10000)が、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同様の B_{max} で、HER2+細胞に結合し得ることを示している。

【0286】

HER2+ SKOV3細胞(HER2 2/3+)での結合結果を図6A、6E、ならびに表4および表5において示す。図6Aおよび表4における結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、SKOV3細胞への結合において、2種の異なる抗HER2 FSA(v506またはv4184)と比較して約1.5倍高い B_{max} を表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同等の B_{max} を表すことを示している。SKOV3への結合についてのv5019の見掛け K_D は、抗HER2 FSA単独(v506またはv4184)、または2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して約2~4倍高かった。

(表4) SKOV3細胞への結合

抗体変異体	K_D (nM)	B_{max}
v506	2.713	29190
v4184	4.108	29204
v5019	8.084	47401
v506 + v4184	4.414	49062

【0287】

図6Eおよび表5における結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019、7091、およびv10000)が、SKOV3細胞への結合において、2種の異なる抗HER2 FSA(v506またはv4184)と比較して約1.5~1.6倍高

いBmaxを表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019、7091、およびv10000)が、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同等のBmaxを表すことを示している。SKOV3への結合についてのv5019、v7091、v10000、および2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)の見掛けK_Dは、抗HER2 FSA単独(v506またはv4184)のいずれかと比較して約2~3倍高かった。

(表5) SKOV3への結合

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	4.8	30007
v4184	5.6	27628
v506 + v4184	10.0	49014
v5019	13.6	47693
v7091	14.5	44737
v10000	10.3	48054

10

【0288】

JIMT-1細胞系(HER2²⁺)における結合曲線を図6Bおよび表6において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、JIMT-1細胞への結合において、抗HER2 FSA(v506)と比較して約1.5倍高いBmaxを表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同等のBmaxを表すことを示している。JIMT-1への結合についてのv5019の見掛けK_Dは、抗HER2 FSA(v506)と比較して約2倍高く、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同等であった(約1.2倍高い)。

20

(表6) JIMT-1細胞への結合

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	1.875	4905
v5019	4.317	7203
v506 + v4184	5.057	7200

30

【0289】

MCF7細胞系(HER2¹⁺)における結合曲線を図6C、6F、ならびに表7および8において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019、7091、およびv10000)が、MCF7細胞への結合において、抗HER2 FSA(v506)と比較して約1.5倍高いBmaxを表すことを示している。図6Cにおける結果はまた、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と比較して同等のBmaxを表すことを示している。MCF7への結合についてのv5019の見掛けK_Dは、抗HER2 FSA(v506)および2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)と同様であった。

40

(表7) MCF7細胞への結合

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	1.301	542
v5019	1.506	872
v506 + v4184	2.095	903

【 0 2 9 0 】

図 6 F および表 8 における結果は、例示的な二重パラトピック抗 HER 2 抗体 (v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、および v 1 0 0 0 0) が、F S A 単一特異性 v 5 0 6 と比較して約 1 . 6 ~ 1 . 7 倍大きい B m a x を表すことを示している。v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、および v 1 0 0 0 0 の見掛け K_D は、抗 HER 2 F S A (v 5 0 6) と同等であった。

10

(表 8) MCF 7 細胞への結合

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	3.5	571
v5019	5.6	968
v7091	6.5	918
v10000	3.7	915

【 0 2 9 1 】

20

MDA - MB - 2 3 1 細胞系 (HER 2 0 / 1 +) における結合曲線を図 6 D および表 9 において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗 HER 2 抗体 (v 5 0 1 9) が、MDA - MB - 2 3 1 細胞への結合において、抗 HER 2 F S A (v 5 0 6) と比較して約 1 . 5 倍高い B m a x を表すことを示している。結果はまた、例示的な二重パラトピック抗 HER 2 抗体 (v 5 0 1 9) が、2 種の抗 HER 2 F S A の組み合わせ (v 5 0 6 + v 4 1 8 4) と比較して同等の B m a x を表すことを示している。MDA - MB - 2 3 1 への結合についての v 5 0 1 9 の見掛け K_D は、抗 HER 2 F S A (v 5 0 6) と比較して約 2 . 4 分の 1 であり、2 種の抗 HER 2 F S A の組み合わせ (v 5 0 6 + v 4 1 8 4) と比較して約 1 . 7 倍高かった。

(表 9) MDA - MB - 2 3 1 細胞への結合

30

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	8.364	0.9521
v5019	3.543	1.411
v506 + v4184	2.040	1.542

【 0 2 9 2 】

WI - 3 8 肺線維芽細胞細胞系における結合曲線を図 6 G および表 1 0 において示す。WI - 3 8 細胞系は、基礎レベル (HER 2 0 +、約 1 0 , 0 0 0 受容体 / 細胞) の HER 2 を発現する正常な肺上皮細胞である (Carter et al . 1 9 9 2 , PNAS , 8 9 : 4 2 8 5 - 4 2 8 9 ; Yarden 2 0 0 0 , HER 2 : Basic Research , Prognosis and Therapy)。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗 HER 2 抗体 (v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、v 1 0 0 0 0) が、WI - 3 8 細胞への結合において、抗 HER 2 F S A (v 5 0 6) と比較して同等の細胞表面装飾 (B m a x) を表すことを示しているが ; しかしながら、v 5 0 6 での結合は、飽和に達しているとは考えられず、したがって、 K_D を決定することはできなかつたことに留意されたい。例示的な二重パラトピック抗 HER 2 抗体のなかでの見掛け K_D は同等であった。

40

(表 1 0) WI - 3 8 細胞への結合

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	決定せず	約 366
v5019	7.0	380
v7091	8.3	371
v10000	8.4	418

【 0 2 9 3 】

これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体が、抗HER2単一特異性FSAよりも約1.5~1.6倍高いレベルでHER2 1+、2+、および3+腫瘍細胞に結合し得ること、および例示的な二重パラトピック抗HER2抗体が、異なるエピトープ特異性を有する2種の単独の単一特異性抗HER2 FSAの組み合わせと比較して同等のレベルでHER2 1+、2+、および3+腫瘍細胞に結合し得ることを示している。これらの結果はまた、二重パラトピック抗HER2抗体が約10,000以下のHER2受容体/細胞を発現する基礎HER2発現細胞への結合の増大(すなわち、単一特異性抗HER2抗体v506と比較)を示さないこと、およびHER2受容体レベルが約10,000受容体/細胞超であると、二重パラトピック抗HER2抗体への細胞表面結合の増大のための閾値が生じることを示している。このデータに基づき、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体は、HER2 3+、2+、および1+腫瘍細胞への細胞表面結合を増大させるであろうが、約10,000受容体以下でHER2受容体の基礎レベルを発現する非腫瘍細胞への細胞表面結合は増大させないであろうことが予測されるであろう。

10

20

【 0 2 9 4 】

実施例7: HER2+細胞の増殖を阻害する二重パラトピック抗HER2抗体の能力

3+および2+レベルでHER2を発現する細胞の増殖を阻害する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を測定した。実験を、HER2 3+細胞系のBT-474、SKBr3、SKOV3、およびHER2 2+ JIMT-1で実施した。二重パラトピック抗HER2抗体のv5019、v7091、およびv10000を試験した。BT-474細胞(200nM抗体); SKOV3、SKBr3、およびJIMT-1細胞(300nM抗体)の増殖を阻害する二重パラトピック抗HER2抗体の能力を下記のとおり測定した。

30

【 0 2 9 5 】

試験抗体を培地中で希釈し、10μl/ウェルで細胞に三つ組(triplicate)で添加した。プレートを37℃で3日間にわたってインキュベートした。細胞生存率を、AlamarBlue(商標)(BioSource # dal 1100)またはCelltiter-Glo(登録商標)のいずれかを使用して測定し、製造元指示書に従って吸光度を読み取った。データを未処理対照に対して正規化し、分析を、GraphPad Prismにおいて行った。

【 0 2 9 6 】

増殖阻害結果を図7A~Eにおいて示す。結果の概要を表11Aおよび11Bにおいて提示する。結果の図7A~Bおよび表11Aは、例示的な抗HER2二重パラトピック(v5019)が、HER2+ SKOV3およびBT-474細胞系を増殖阻害し得ることを示している。図10Aは、抗HER2二重パラトピック抗体が、抗HER2 FSA(v506)と比較した場合に、かつ2種の抗HER2 FSA抗体の組み合わせ(v506+v4184)と比較した場合に、SKOV3の最大増殖阻害を媒介することを示している。

40

(表11A) HER2 3+癌細胞の増殖阻害

処理	生存率%	
	SKOV3 HER2 2+/3+	BT-474 HER2 3+
v506	88	37
v506 + v4184	96	32
v5019	77	43

【 0 2 9 7 】

図7C～Eおよび表11Bの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体（v5019、v7091、およびv10000）がHER2 3+ SKBR3、HER2 2+/3+ SKOV3、およびHER2 2+ JIMT-1腫瘍細胞系の増殖を阻害し得ることを示している。図7Cは、抗HER2二重パラトピック抗体v7091およびv10000が、HER2 3+ SKBr3乳房腫瘍細胞の最大増殖阻害を媒介することを示している。図7Dは、抗HER2二重パラトピック抗体（v7091およびv10000）が、HER2 3+ SKOV3卵巣腫瘍細胞の最大増殖阻害を媒介することを示している。図7Eは、抗HER2二重パラトピック抗体（v7091およびv10000）が、HER2 2+ Herceptin抵抗性JIMT-1腫瘍細胞の最大増殖阻害を媒介することを示している。試験したすべての細胞系において、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体（v7091およびv10000）は、抗HER2 FSA単一特異性抗体（v506）と比較して高い増殖阻害を媒介した。

（表11B）HER2 3+癌細胞の増殖阻害

処理	生存率%		
	SKBr3 HER2 3+	SKOV3 HER2 2+/3+	JIMT-1 HER2 2+
v506	52	107	107
v5019	59	83	106
v7091	35	79	85
v10000	34	73	84

【 0 2 9 8 】

これらの結果は、二重パラトピック抗HER2抗体の例示的な飽和濃度が、HER2 3+および2+乳房および卵巣腫瘍細胞、ならびにHER2 2+トラスツズマブ抵抗性腫瘍細胞を、FSA抗HER2単一特異性抗体よりも約20%高く増殖阻害することができることを示している。

【 0 2 9 9 】

実施例8：HER2 ECDと比較して、二量体HER2への二重パラトピック抗HER2抗体のパラトープの優先的結合

膜結合HER2（HER2-Fc）とshed HER2 ECDとの間の結合差の代理として、二量体HER2およびHER2 ECDに結合する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の個々のパラトープの能力を決定するために、この実験を行った。実験を次のとおりに実施した。

【 0 3 0 0 】

表面プラスモン共鳴（SPR）分析：HER2細胞外ドメイン（sHER-2、Ebioscience BMS362、全長タンパク質のアミノ酸23～652をコード）およびHER2-Fc（細胞外ドメインのアミノ酸1～652をコードする二量体HER2-Fc融合体；Sino Biological Inc.、10004-H02H）への結合についての一価抗HER2抗体（v1040またはv4182）の親和性を、Biacore（GE Healthcare）からのT200システムを使用してSPRによって測定した。HER2 ECDへの結合を、次の方法によって決定した。10mm Hepes（pH6.8）中のHER2 ECDを44RU（応答単位）のレベルまで、アミンカップリングによってCM5チップ上に固定化した。一価抗HER2抗体を0.

76 ~ 60 nMの範囲の濃度で、HER2固定化チップの表面上に通過させた。HER2-Fcへの結合を、次の方法によって決定した。10 mm HEPES (pH 6.8)中のHER2-Fcを43RUのレベルまで、アミンカップリングによってCM5上に固定化した。一価抗HER2抗体を0.76 ~ 60 nMの範囲の濃度で、HER2固定化チップの表面上に通過させた。抗体濃度を、結合について三つ組で分析した。平衡解離結合定数(K_D)および反応速度(k_a および k_d)を、単一サイクル反応速度法を使用して決定した。センソグラム(sensograms)を、1:1 Langmuir結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を室温で行った。

【0301】

結果を、図8A、図8B、表11C、および表11Dにおいて示す。図8Aおよび表11Cにおける結果は、一価抗HER2抗体(v1040; 例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のCH-B上の抗原結合性ドメインを表す)のSPR結合データを示している。図8Aは、固定化HER2 ECDまたはHER2-Fcへのv1040結合の K_D 値(nM)を図示しており、一価抗HER2抗体が、HER2-Fcに対する結合について、HER2 ECDと比較して低い K_D を有することを示している。表11Cは、HER2 ECDおよびHER2-Fc(「HER2 mem」)への結合における、フルサイズ抗HER2抗体(FSA)と比較しての一価抗HER2抗体(OA)の k_a (1/Ms)および k_d (1/s)値を示している。このデータは、HER2 ECDおよびHER2-Fcへの結合について、OAおよびFSAの同等のオン(k_a)およびオフ(k_d)速度を示している。

(表11C) HER2 ECDおよびHER2-Fc(「HER2 mem」)への結合における、フルサイズ抗HER2抗体(FSA)と比較しての一価抗HER2抗体(OA)の k_a (1/Ms)および k_d (1/s)値

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
OA 対 HER2 ECD	2.00E+05	6.15E-05
FSA 対 HER2 ECD	4.14E+05	2.01E-05
OA 対 HER2 mem	1.88E+05	4.38E-05
FSA 対 HER2 mem	3.41E+05	4.94E-06*

【0302】

図8Bおよび表11Dにおける結果は、一価抗HER2抗体(v4182; 例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のCH-A上の抗原結合性ドメインを表す)のSPR結合データを示している。図8Bは、固定化HER2 ECDまたはHER2-Fcへのv4182結合の K_D 値(nM)を図示しており、一価抗HER2抗体が、HER2-Fcへの結合について、HER2 ECDと比較して低い K_D を有することを示している。表11Dは、HER2 ECDおよびHER2-Fc(「HER2 mem」)への結合における、フルサイズ抗HER2抗体(FSA)と比較しての一価抗HER2抗体(OA)の k_a (1/Ms)および k_d (1/s)値を示している。このデータは、HER2 ECDおよびHER2-Fcへの結合について、OAおよびFSAの同等のオン(k_a)およびオフ(k_d)速度を示している。

(表11D)

	ka (1/Ms)	kd (1/s)
OA 対 HER2 ECD	9.08E+04	6.17E-04
FSA 対 HER2 ECD	9.55E+04	3.93E-04
OA 対 HER2 mem	1.39E+05	2.04E-04
FSA 対 HER2 mem	1.77E+05	6.84E-05

【0303】

これらのデータは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のパラトープのそれぞれが、膜結合HER2の代表である二量体HER2抗原への結合について、HER2 ECDと比較して低い K_D 値を有することを示している。このデータに基づき、例示的な抗HER2抗体は、膜結合HER2抗原について、罹患者の血清中に存在し、かつ治療用抗体のためのシンク(sink)として作用し得る脱離HER2 ECDと比較して高い結合親和性を有すると予測されるであろう(Brodowicz T, et al. Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. Int J Cancer. 1997; 73:875-879)。例えば、基線HER2 ECDレベル15 ng/mL以下に対して、進行性疾患の患者は、ECD38 ng/mL以上のHER2を有する。

10

20

【0304】

実施例9：HER2+細胞における二重パラトピック抗HER2抗体の細胞全体負荷および内部移行

HER2+細胞へ内部移行される例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を評価するために、この実験を行った。直接的な内部移行方法は、Schmidt, M. et al., Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. Cancer Immunol Immunother (2008) 57:1879-1890において詳述されているプロトコルに従った。具体的には、抗体を、製造元指示書に従ってAlexaFluor(登録商標)488 Protein Labeling Kit(Invitrogen, cat. no. A10235)を使用して直接的に標識した。

30

【0305】

内部移行アッセイのために、12ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルを播種し、 $37 + 5\% CO_2$ で終夜インキュベートした。翌日、標識抗体をDMEM+10%FBS中の200 nMで添加し、 $37 + 5\% CO_2$ で24時間インキュベートした。暗条件下で、培地を吸引し、ウェルをPBS $2 \times 500 \mu L$ で洗浄した。細胞を採取するために、細胞解離緩衝液(250 μL)を 37 で添加した。細胞をペレット化し、抗Alexa Fluor 488、ウサギIgG画分(Molecular Probes, A11094)(50 $\mu g/mL$)を含むか、または含まないDMEM+10%FBS 100 μL 中に再懸濁させ、氷上で30分間にわたってインキュベートした。分析の前に、DMEM+10%FBS 300 μL 、濾過試料、ヨウ化プロピジウム4 μl を添加した。試料を、LSRIIフローサイトメーターを使用して分析した。

40

【0306】

HER2+細胞に内部移行する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を、図9Aおよび図9Bにおいて示す。図9Aは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2 FSA対照と共に24時間インキュベートした後にBT-474細胞において検出可能な表面および内部抗体の結果を示している。これらの結果は、例示的な抗

50

HER2二重パラトピック抗体(v5019)とのインキュベーションが、抗HER2 FSA対照と比較して約2倍多い、BT-474細胞への内部移行抗体をもたらすことを示している。図9Bは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2 FSA対照と共に24時間インキュベートした後にJIMT-1細胞において検出可能な表面および内部抗体の結果を示している。これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)とのインキュベーションが、JIMT-1細胞において、抗HER2 FSA対照と比較して約2倍多い内部移行抗体をもたらすことを示している。24時間後の表面染色の量は、BT-474およびJIMT-1細胞の両方において、二重パラトピック抗HER2および抗HER2 FSAのなかでは、同等であった。

【0307】

10

図10A~Fにおける結果は、37°Cで24時間後の内部移行抗体の量に加えて、37°Cで24時間にわたるインキュベーション後の表面結合抗体と比較して、4°Cで2時間後に検出可能な細胞全体の表面結合抗体の比較を示している。図10Aは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2 FSA対照と共にインキュベートした後のBT-474細胞の結果を示している。これらの結果は、24時間にわたるBT-474細胞との例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションは、細胞全体の表面上で検出される抗体の約15%の低減をもたらすことを示している。図10Aはまた、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)とのインキュベーションが、BT-474細胞において、抗HER2 FSA対照と比較して約2倍多い内部移行をもたらすことを示している。

20

【0308】

図10Bは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2 FSA対照とインキュベーションした後のJIMT-1細胞における結果を示している。図10Bは、4°Cでの2時間後に表面染色を加えているが、図9Bにおいて示した実験の繰り返しである。これらの結果は、24時間にわたるJIMT-1細胞との例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションが、細胞全体の表面上で検出される抗体の約57%の低減をもたらすことを示している。図10Bはまた、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)とのインキュベーションが、37°Cで24時間のインキュベーション後に、BT-474細胞において、抗HER2 FSA対照と比較して多い内部移行抗体をもたらすことを示している。

30

【0309】

図10Cは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体と共にインキュベートした後のSKOV3細胞における結果を示している。これらの結果は、24時間にわたるSKOV3細胞との例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションが、細胞全体の表面上で検出される抗体の約32%の低減をもたらすことを示している。

【0310】

図10Dは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体とインキュベートした後のMCF7細胞における結果を示している。これらの結果は、24時間にわたるMCF7細胞との例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションが、細胞全体の表面上で検出される抗体の約45%の低減をもたらすことを示している。

40

【0311】

図10Eは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体v5019、v7091、およびv10000とインキュベートした後のSKOV3細胞における結果を示している。これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションが、SKOV3細胞では、抗HER2 FSA対照と比較して1.5~1.8倍多い内部移行抗体をもたらすことを示している。24時間にわたる抗HER2 FSA対照とのインキュベーションは、細胞全体の表面上で検出される抗体の最大の低減(約77%)をもたらすことを示している。

【0312】

図10Fは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体v5019、v7091、およ

50

びv10000とインキュベートした後のJIMT-1細胞における結果を示している。これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体のインキュベーションが、JIMT-1細胞では、抗HER2 FSA対照と比較して1.4~1.8倍多い内部移行抗体をもたらすことを示している。24時間にわたる抗HER2二重パラトピック抗体(v5019およびv10000)とのインキュベーションは、細胞全体の表面上で検出される抗体の最大の低減(約64%)をもたらした。

【0313】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体が、HER2+細胞において、単一特異性抗HER2 FSAと比較して優れた内部移行特性を有することを示している。37での24時間のインキュベーション後に検出される表面抗体の低減は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体が、HER2+細胞においてインキュベーション後に、細胞表面HER2受容体の量を低減することができること、およびインキュベーション後の表面HER2低減が、HER2+腫瘍細胞において最大であることを示している。

10

【0314】

実施例10: HER2+細胞とのインキュベーション後の抗HER2二重パラトピック抗体の細胞染色および位置特定(1、3、および16時間目)、

種々の時点でのHER2+ JIMT-1細胞への例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の内部移行を分析するために、細胞全体負荷および内部移行を分析するために実施例9において提示した方法に直交する方法として、この実験を行った。

20

【0315】

JIMT-1細胞を、37+5%CO₂で1時間、3時間、および16時間にわたって無血清DMEM中200nMの抗体(v506、v4184、v5019、またはv506およびv4184の組み合わせ)と共にインキュベートした。細胞を、温めた滅菌PBS(500ml/ウェル)で穏やかに2回洗浄した。細胞を、室温で10分間にわたって10%ホルマリン/PBS溶液250mlで固定した。固定した細胞をPBS(500μl/ウェル)で3回洗浄し、5分間にわたって0.2%Triton X-100を含有するPBS250μl/ウェルで透過処理し、PBS500μl/ウェルで3回洗浄した。細胞を、室温で1時間にわたってPBS+5%ヤギ血清500μl/ウェルで遮断した。遮断緩衝液を除去し、二次抗体300μl/ウェル(Alexa Fluor 488にコンジュゲートしたAffiniPure Fab断片ヤギ抗ヒトIgG(H+L); Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 109-547-003)を室温で1時間わたってインキュベートした。細胞をPBS500μl/ウェルで3回洗浄し、次いで、固定細胞を含むカバーガラスを、Prolong gold anti-fade with DAPI(Life Technologies; #P36931)を使用してスライド上に載せた。Olympus FV1000 Confocal顕微鏡を使用して、60倍単一画像を得た。

30

【0316】

結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)が3時間目にJIMT-1細胞に内部移行し、主に核の近くに位置特定されたことを示した。インキュベーション3時間目での画像の比較によって、抗HER2二重パラトピック抗体に関連して、2種の抗HER2 FSA(v506+v4184)と比較して、かつ個々の抗HER2 FSA(v506またはv4184)と比較して多量の内部染色が示された。抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)の結果を抗HER2 FSA(v4184)と比較すると、抗体染色の細胞位置特定において相違が見られ、抗HER2 FSA(v4184)は、1、3、および16時間の時点で顕著な形質膜染色を示した。検出可能な抗体の量が、抗HER2 FSA(v506)、2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)、および抗HER2二重パラトピック抗体処理では16時間目に低減した(データ図示せず)。

40

【0317】

50

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体v5019がHER2+細胞に内部移行し、内部移行抗体が、3時間のインキュベーション後に検出可能であったことを示している。これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体がHER2+細胞において、抗HER2 FSAと比較して多量に内部移行し得ることを示す実施例9において提示した結果と一致する。

【0318】

実施例11： 対照と比較しての、二重パラトピック抗HER2抗体によって媒介されるHER2+細胞のADCC

SKOV3細胞(卵巣癌、HER2 2+/3+)においてADCCを媒介する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力を測定するために、この実験を行った。

10

【0319】

ターゲット細胞を、30分間にわたって試験抗体(45µg/mlから1/10漸減濃度)と共に予めインキュベートし、続いて、エフェクター細胞を5:1のエフェクター/ターゲット細胞比で添加し、インキュベーションを37+5%CO₂で6時間にわたって継続した。試料を、45µg/mlから1/10漸減していく8つの濃度で試験した。LDH放出を、LDHアッセイキットを使用して測定した。

【0320】

用量反応試験を、5:1、3:1、および1:1のエフェクター/ターゲット(E/T)比で、様々な濃度の試料で行った。50%効果濃度(EC₅₀)値を、GraphPad Prismを使用してシグモイド用量反応非線形回帰フィットで分析した。

20

【0321】

細胞を、マッコイ5a完全培地中、37/5%CO₂で維持し、ATCCからのプロトコルに従って、10%FBSを補充した適切な培地で定期的にサブ培養した。p10未満の継代数の細胞をこのアッセイでは使用した。試料を、アッセイにおいて使用する前に、1%FBSおよび1%pen/strepを補充したフェノールレッド非含有DMEM培地で、0.3~300nMの濃度に希釈した。

【0322】

5:1のエフェクター細胞とターゲット細胞との比での、HER2+SKOV3細胞におけるADCC結果を図11Aおよび表12において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、抗HER2 FSA(v792)および2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792+v4184)と比較した場合に、最大パーセンテージの、ADCCによる最大ターゲット細胞溶解を媒介することを示している。例示的な二重パラトピック抗HER2抗体によって媒介される最大細胞溶解における差異は、抗HER2 FSAと比較して約1.6倍大きく、2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792+v4184)と比較して約1.2倍大きかった。

30

(表12)

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)	最大細胞溶解%
v792	約0.032	17.82
v5019	約0.164	28.57
v792+v4184	約0.042	23.85

40

【0323】

3:1のエフェクター細胞とターゲット細胞の比でのHER2+SKOV3細胞におけるADCC結果を図11Bおよび表13において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、抗HER2 FSA(v792)および2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792+v4184)と比較した場合に、最大パーセンテージの、ADCCによる最大ターゲット細胞溶解を媒介したことを示している。例示的な二重パラトピック抗HER2抗体によって媒介される最大細胞溶解に

50

おける差異は、抗HER2 FSAと比較して約1.3倍大きく、2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792 + v4184)と比較して約1.8倍大きかった。

(表13)

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)	最大細胞溶解%
v792	1.064	16.9
v5019	約0.4608	22.3
v792 + v4184	約1.078	12.3

【0324】

1:1のエフェクター細胞とターゲット細胞の比でのHER2 + SKOV3細胞におけるADCC結果を、図11Cおよび表14において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、抗HER2 FSA(v792)および2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792 + v4184)と比較した場合に、最大パーセンテージのADCCによる最大ターゲット細胞溶解を媒介したことを示している。例示的な二重パラトピック抗HER2抗体によって媒介される最大細胞溶解における差異は、抗HER2 FSAと比較して約1.8倍大きく、2種の異なる抗HER2 FSAの組み合わせ(v792 + v4184)と比較して約1.13倍大きかった。

(表14)

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)	最大細胞溶解%
v792	1.429	7.529
v5019	約1.075	13.29
v792 + v4184	約0.1121	11.73

【0325】

図11および表12~14における結果は、例示的な二重パラトピックHER2抗体が、種々のE:T比で、抗HER2 FSAおよび2種の抗HER2 FSAの組み合わせと比較した場合に最大のSKOV3細胞のADCCを媒介することを示している。抗HER2二重パラトピック抗体によって媒介されるADCCの増大の観察が、化学療法後に循環エフェクター細胞の変動および/または低減を表すHER2+罹患患者において予測されるであろう(Suzuki E. et al. Clin Cancer Res 2007; 13: 1875-1882)。図11における観察は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体への細胞結合において、抗HER2 FSAと比較して約1.5倍の増大を示す実施例6において提示した細胞全体結合Bmaxデータと一致する。

【0326】

実施例12: HER2ECDに結合する例示的な抗HER2抗体の能力

例示的な抗HER2二重パラトピック抗体がHER2 ECDに結合する機構を評価するために、具体的には、1個の二重パラトピック抗体分子のパラトープの両方が、1個のHER2 ECDに結合(シス結合; 抗体とHER2分子とが1:1)し得るか、または1個の二重パラトピック抗体の各パラトープが2個の異なるHER2 ECDに結合(トランス結合; 抗体とHER2分子とが1:2)し得るかを理解するために、SPRアッセイを使用した。シス対トランス結合の表現を図14において図示する。オフ速度が低下する(ゆっくりになる)と、抗体捕捉レベル(表面密度)が上昇するという相関が、トランス結合(すなわち、2個のHER2分子への1個の抗体分子の結合)の指標である。

【0327】

組換えヒトHER2への例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)の親和性および結合反応速度を測定し、一価抗HER2抗体(v630またはv4182; v5019の個々のパラトープを含む)のものと比較したが、これは、Biacoreから

10

20

30

40

50

のT200システム(GE Healthcare)を使用してSPRによって測定した。5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で注入した抗ヒトFc2000~4000RUを、標準的なアミンカップリングを使用してCM5チップ上に固定化した。一価抗HER2抗体(v630またはv4182)および例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)を、350~15RUの範囲の応答レベルで抗ヒトFc上に捕捉した(PBST中0.08~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の濃度で注入、10 $\mu\text{l}/\text{分}$ で1分)。組換えヒトHER2をPBST中で希釈し、120nM、200nM、または300nMのいずれかの出発濃度で、3倍希釈で注入し、50 $\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で3分間にわたって注入し、続いて、最終の注入の終了時にさらに30分間にわたって解離させた。HER2希釈を二つ組(duplicate)で分析した。センソグラムを、1:1Langmuir結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を25で行った。

10

【0328】

結果を、図12および図13において示す。

【0329】

図12Aにおける結果は、チップの表面上での注入抗体濃度から捕捉抗体濃度の範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての一価抗HER2(v630およびv4182)および例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)の k_a (1/Ms)を示している。これらの結果は、種々の抗体捕捉レベルで、v630、v4182、およびv5019について、 k_a が変化しないことを示している。

【0330】

20

図12Bにおける結果は、チップの表面上での注入抗体濃度から捕捉抗体濃度の範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての一価抗HER2(v630およびv4182)および例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)の k_d (1/s)を示している。これらの結果は、抗体捕捉レベルが上昇するにつれて、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)についてのみ、 k_d が低下したことを示している。

【0331】

図12Cにおける結果は、チップの表面上での注入抗体濃度から捕捉抗体濃度の範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての一価抗HER2(v630およびv4182)および例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)の K_D (M)を示している。これらの結果は、抗体捕捉レベルが上昇するにつれて、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)についてのみ、 K_D が低下したことを示している。この結果は、図15Bにおいて示す k_d 値の低下と相関している。

30

【0332】

図13Aにおける結果は、抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)の k_d (1/s)を示している。これらの結果は、 k_d 値が、チップの表面上に捕捉される抗体のRUの上昇と逆比例する(すなわち、抗体捕捉レベルが高いほど、オフ速度は遅くなる)ことを示している。この結果は、抗体捕捉レベルが高いほど、オフ速度が低下することによって証拠づけられるとおり、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、2個の別々のHER2分子上のHER2ECD2およびHER2ECD4に結合(すなわち、トランス結合)し得ることを示している。このデータは、図47において提示されていて、実施例43において考察されている同様の実験によって裏付けられ、その実験では、二価単一特異性抗HER2FSA(v506)は、この分子で予測されたとおり、抗体捕捉レベルが上昇しても k_d (1/s)および K_D (M)値が一定のままであるシス結合(抗体とHER2とが1:1)を実証した。

40

【0333】

図13Bにおける結果は、抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての一価抗HER2抗体(v4182)の k_d (1/s)を示している。これらの結果は、チップの表面上に捕捉される種々の抗体RUの範囲にわたって、 k_d が変化し

50

ないことを示している。これらの結果は、一価抗HER2抗体(v4182)が、一価で、1:1で結合(シス結合)していることを示している。

【0334】

図13Cにおける結果は、抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトHER2への結合についての一価抗HER2抗体(v630)のkd(1/s)を示している。これらの結果は、チップの表面上に捕捉される種々の抗体RUの範囲にわたって、kdが変化しないことを示している。これらの結果は、一価抗HER2抗体(v630)が、一価で、1:1で結合(シス結合)していることを示している。このデータは、図47において提示され、実施例43Xにおいて考察されている実験によって裏付けられ、その実験では、二価単一特異性抗HER2 FSA(v506)は、kd(1/s)において変化を示さなかった。

10

【0335】

[0098] 図12および図13における結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v5019)が、トランスで、2個のHER2分子へ同時に結合し得ること(抗体とHER2との比が1:2)を示している。SPRによって検出される結合のトランス機構は、実施例9および10において提示される内部移行データと合わせて、実施例6において提示されるより高度な細胞表面飽和結合データ(Bmax)と一致する。

【0336】

実施例13: BT-474細胞における、AKTリン酸化に対する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体インキュベーションの効果

20

BT-474細胞においてpAKTシグナル伝達を低減する例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の能力を、AKT Colorimetric In-Cell ELISA Kit (Thermo Scientific; cat no. 62215)を製造元指示書に従って、ただし次の変更を加えて使用して試験した。細胞を 5×10^3 /ウェルで播種し、 $37 \pm 5\% \text{CO}_2$ で24時間にわたってインキュベートした。細胞を、100nM抗体と共に30分間にわたってインキュベートし、続いて、rhHRG-1と共に15分間にわたってインキュベートした。細胞を洗浄し、固定化し、指示書に従って透過処理した。二次抗体(1:5000; Jackson ImmunoResearch、HRP-ロバ抗マウスIgG、JIR、Cat#715-036-150、HRP-ロバ抗ウサギIgG、JIR、Cat#711-036-452)を添加し、アッセイを、製造元指示書に従ってプロセッシングした。

30

【0337】

図15における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体とのインキュベーションが、HRG-1の存在下でのp-Aktレベルにおいて、ヒトIgG対照(CTL)に対して約1.2分の1の低下を媒介したことを示している。2種の抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)は、ヒトIgG対照と比較して約1.5分の1であるHRG-1存在下でのp-Aktレベルの最大の低減を媒介した。リガンド(HRG-1)の不在下で、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体では、ヒトIgG対照抗体と比較して、p-Aktの僅かな低下が検出された。

【0338】

これらのデータは、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体は、HER2+細胞においてリガンド活性化シグナル伝達を遮断し得ることを示している。

40

【0339】

実施例14: 心筋細胞生存率に対する二重パラトピック抗HER2抗体の効果

潜在的な心臓毒性作用の予兆を得るために、心筋細胞生存率に対する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体およびADCの効果測定した。

【0340】

基礎レベルのHER2受容体を発現するiCell心筋細胞(Cellular Dynamics International、CMC-100-010)を製造元指示書に従って増殖させ、抗体処理後の心筋細胞の健康を評価するためのターゲット細胞として

50

使用した。アッセイを、次のとおりに行った。細胞を96ウェルプレート(15,000細胞/ウェル)に播種し、48時間にわたって維持した。細胞培地を維持培地に取り換え、細胞を72時間にわたって維持した。抗体誘発性心臓毒性の作用にアクセスするために、細胞を単独か、または組み合わせの10nMおよび100nMの変異体で72時間にわたって処理した。アンスラサイクリン誘発性心臓毒性の作用にアクセスするために(単独か、または例示的な二重パラトピック抗HER2抗体と組み合わせで)、細胞を、3μM(約IC₂₀)のドキソルピシンで1時間にわたって処理し、続いて、単独か、または組み合わせの抗体変異体10nMおよび100nMで72時間にわたって処理した。製造元指示書に従ってCell Titer - Glo(登録商標)Luminescent Cell Viability Assay(Promega, G7570)および/またはSulphorhodamine(Sigma 230162-5G)を用いて細胞ATPレベルを定量化することによって、細胞生存率を評価した。

【0341】

結果を、図16A~Cにおいて示す。図16Aにおける結果は、治療関連濃度の例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019)および例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363)との心筋細胞のインキュベーションが、未処理対照(「偽」と比較して、心筋細胞生存率に影響を及ぼさなかったことを示している。

【0342】

図16Bにおける結果は、治療関連濃度の例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019、v7091、およびv10000)、および例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363、v7148、およびv10553)との心筋細胞のインキュベーションが、未処理対照(「偽」と比較して、心筋細胞生存率に対して作用を有さなかったことを示している。図16Aおよび16Bにおける結果に基づき、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、他の抗HER2ターゲティング抗体で報告されているような(Grazette L.P. et al. Inhibition of ErbB2 Causes Mitochondrial Dysfunction in Cardiomyocytes; Journal of the American College of Cardiology: 2004; 44:11)、例えば、ミトコンドリア機能障害による心筋症を誘発するはずがないと予測される。

【0343】

図16Cにおける結果は、ドキソルピシンでの心筋細胞の前処理、続く、治療関連濃度の例示的な抗HER2二重パラトピック抗体(v5019、v7091、およびv10000)および例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363、v7148、およびv10553)とのインキュベーションが、未処理対照+ドキソルピシン(「偽+ドキソルピシン(Dox)」と比較して、心筋細胞生存率に対して作用を有さなかったことを示している。図16Cにおける結果に基づき、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体および例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、同時にアンスラサイクリン処置を受けている患者において心臓機能障害のリスクの上昇をもたらすはずがないと予測される(Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. J Clin Oncol (2002) 20:1215-1221)。

【0344】

図16A~Cは、抗HER2二重パラトピック抗体およびADCとの心筋細胞のインキュベーションが、単独で、またはドキソルピシンと組み合わせで処理した場合に、単一特異性抗HER2 FSA抗体(v506)、抗HER2 FSAの組み合わせ(v506+v4184)、およびADC(v6246)と比較して、同等の効果を有したことを示している。これらの結果に基づき、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体およびADCが、抗単一特異性抗HER2 FSA、トラスツズマブ、またはADC、T-DM1と

10

20

30

40

50

比較して大きな心臓毒性作用を有することはないであろうと予測される。

【0345】

実施例15：HER2+細胞における例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCの細胞毒性

HER2+細胞において細胞毒性を媒介する例示的な二重パラトピック抗HER2-ADC抗体(v6363、v7148、およびv10553)の能力を測定した。いくつかの場合、DM1にコンジュゲートされたヒトIgG(v6249)を対照として使用した。実験を、HER2+乳房腫瘍細胞系JIMT-1、MCF7、MDA-MB-231、HER2+卵巣腫瘍細胞系SKOV3、およびHER2+胃細胞系NCI-N87において実施した。HER2+細胞における例示的な二重パラトピック抗HER2-ADC抗体の細胞毒性を評価し、単一特異性抗HER2-FSA-ADC(v6246)および抗HER2-FSA-ADC+抗HER2-FSA対照(v6246+v4184)と比較した。この方法を、実施例7において記載したとおりに、ただし、次の変更を加えて行った。抗HER2-ADCを、ターゲットSKOV3およびJIMT-1(図17AおよびB)細胞と共に24時間にわたってインキュベートし、細胞を洗浄し、培地を取り換え、37で5日間のインキュベーション後に細胞生存率を評価した。抗HER2-ADCを、ターゲットMCF7およびMDA-MB-231ターゲット細胞と共に6時間にわたってインキュベートし(図17CおよびD)、細胞を洗浄し、培地を取り換え、細胞生存率を、37でのインキュベーションの5日目に評価した。図17E~Gでは、抗HER2-ADCを、ターゲットSKOV3、JIMT-1、NCI-N87細胞と共に5日間にわたって連続してインキュベートした。細胞生存率を、AlamarBlue(商標)(図17A~D)またはCelltiter-Glo(登録商標)(図17E~G)のいずれかを使用して、実施例7において記載したとおりに測定した。

【0346】

結果を、図17A~Gにおいて示し、そのデータを、表15および16にまとめる。

【0347】

図17Aならびに表15および16における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363)が、JIMT-1において、抗HER2-FSA-ADC(v6246)および抗HER2-FSA-ADC+抗HER2-FSAの組み合わせ(v6246+v4184)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して約13分の1である優れたEC₅₀を有した。

【0348】

図17Bおよび表15における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363)が、SKOV3において、抗HER2-FSA-ADC(v6246)および抗HER2-FSA-ADC+抗HER2-FSAの組み合わせ(v6246+v4184)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して約5分の1である優れたEC₅₀を有した。

【0349】

図17Cおよび表15における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363)が、MCF7において、抗HER2-FSA-ADC(v6246)および抗HER2-FSA-ADC+抗HER2-FSAの組み合わせ(v6246+v4184)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して約2分の1である優れたEC₅₀を有した。

【0350】

図17Dおよび表15における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC(v6363)が、MDA-MB-231において、抗HER2-FSA-ADC(v6246)および抗HER2-FSA-ADC+抗HER2-FSAの組み合わせ(v6

10

20

30

40

50

246 + v4184)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して約2分の1である優れたEC₅₀を有した。

(表15)

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)			
	SKOV3	JIMT-1	NCI-N87	対照 (FSA-ADC)
v6246	0.9225	5.942	122.0	約1075
v6246 + 4184	3.146	12.68	約24432	136.4
v6363	0.1776	0.4443	58.55	141.0

10

【0351】

図17Eおよび表16における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC (v6363、v7148、およびv10553)が、SKOV3卵巣腫瘍細胞において、抗HER2-FSA-ADC (v6246)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して、約2分の1~約7分の1である優れたEC₅₀値を有した。

【0352】

図17Fおよび表16における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC (v6363、v7148、およびv10553)が、JIMT-1乳房腫瘍細胞において、抗HER2-FSA-ADC (v6246)と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して約6分の1~約9分の1である優れたEC₅₀値を有した。

20

【0353】

図17Gおよび表16における結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC (v6363、v7148、およびv10553)が、NCI-N87胃腫瘍細胞において細胞毒性であることを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCは、抗HER2-FSA-ADC対照と比較してほぼ同等のEC₅₀値を有した。

(表16)

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)		
	SKOV3	JIMT-1	NCI-N87
v6246	0.22	3.52	1.04
v6363	0.03	0.56	1.33
v7148	0.06	0.56	2.74
v10553	0.09	0.39	1.69

30

【0354】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC (v6363、v7148、およびv10553)が、HER2³⁺、²⁺、および¹⁺乳房腫瘍細胞において、抗HER2-FSA-ADC対照と比較して、より細胞毒性であることを示している。これらの結果はまた、例示的な抗HER2二重パラトピック-ADC (v6363、v7148、およびv10553)が、HER2^{2/3+}胃腫瘍細胞において細胞毒性であることを示している。これらの結果は、実施例9において提示した内部移行結果と一致する。

40

【0355】

実施例16： ヒト卵巣癌細胞異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗HER2抗体の効果

例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の抗腫瘍有効性を評価するために、ヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデルSKOV3を使用した。

50

【 0 3 5 6 】

雌の無胸腺ヌードマウスに、1 mm³ 腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。2 2 0 mm³ の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を3つの処理群、すなわち、I g G対照、抗 H E R 2 F S A (v 5 0 6)、および二重パラトピック抗 H E R 2 抗体 (v 5 0 1 9) に無作為割当した。

【 0 3 5 7 】

各群には、1 5 匹の動物が含まれた。各群への投与は次のとおりである：

【 0 3 5 8 】

A) I g G対照を、試験 1 日目に 3 0 m g / k g の初回負荷量で、次いで、試験 3 9 日目まで週 2 回、2 0 m g / k g の維持用量で静脈内投与した。

10

【 0 3 5 9 】

B) 抗 H E R 2 F S A (v 5 0 6) を、試験 1 日目に 1 5 m g / k g の初回負荷量で、次いで、試験 1 8 日目まで週 2 回、1 0 m g / k g の維持用量で静脈内投与した。2 2 日目から 3 9 日目には、抗 H E R 2 F S A 5 m g / k g を週 2 回、静脈内投与した。抗 H E R 2 F S A (v 4 1 8 4) を、週 2 回、5 m g / k g で同時に腹腔内投与した。

【 0 3 6 0 】

C) 二重パラトピック抗 H E R 2 抗体を、試験 1 日目に 1 5 m g / k g の初回負荷量で、次いで、研究 3 9 日目まで週 2 回、1 0 m g / k g の維持用量で静脈内投与した。

【 0 3 6 1 】

腫瘍体積を、試験の経過にわたって週 2 回測定し、応答動物数および生存期間中央値を 2 2 日目に評価した。結果を、図 1 8 および表 1 7 において示す。

20

【 0 3 6 2 】

二重パラトピック抗 H E R 2 および抗 H E R 2 F S A は、I g G 対照と比較して優れた腫瘍増殖阻害を実証した。二重パラトピック抗 H E R 2 抗体は、抗 H E R 2 F S A の組合せと比較して優れた腫瘍増殖阻害を誘発した (図 1 8 A)。二重パラトピック抗 H E R 2 抗体は、2 2 日目において、抗 H E R 2 F S A v 5 0 6 と比較して、応答腫瘍の数の増大と関連した (それぞれ 1 1 および 5) (表 1 7)。例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 抗体および抗 H E R 2 F S A は、I g G 対照と比較して優れた生存率を実証した。二重パラトピック抗 H E R 2 抗体は、抗 H E R 2 F S A (3 6 日間) と比較して、優れた生存期間中央値 (6 1 日間) を有した (図 1 8 B および表 1 7)。試験 2 2 日目に、第 2 の抗 H E R 2 F S A (v 4 1 8 4) を、抗 H E R 2 F S A (v 5 0 6) と組み合わせて加えた。2 種の抗 H E R 2 F S A の組み合わせは、抗 H E R 2 F S A (v 5 0 6) 単独と比較して、さらなる腫瘍増殖阻害を誘発した。

30

(表 1 7)

n=15, 22日目	IgG	v506	v5019
平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの変化%)	1908 (+766%)	1291 (+486%)	697 (+217%)
% TGI	0	32	63
応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	0/15	5/15	11/15
生存期間中央値 (日数)	22	36	61

40

【 0 3 6 3 】

実施例 1 7 : ヒト卵巣癌細胞系異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗 H E R 2 抗体薬物コンジュゲート (A D C) の効果

D M 1 にコンジュゲートさせた例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 抗体 (v 6 3 6 3) の抗腫瘍有効性を評価するために、ヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデル S K O V 3 を使用した。

【 0 3 6 4 】

50

雌の無胸腺ヌードマウスに、 1 mm^3 腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。 220 mm^3 の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を3つの処理群、すなわち、IgG対照、抗HER2 FSA-ADC、および二重パラトピック抗HER2-ADCに無作為割当した。

【0365】

各群には、15匹の動物が含まれた。各群への投与は次のとおりである：

【0366】

A) IgG対照を、試験1日目に 30 mg/kg の初回負荷量で、次いで、試験39日目まで週2回、 20 mg/kg の維持用量で静脈内投与した。

【0367】

B) 抗HER2 FSA-ADC (v6246) を、試験1日目に 10 mg/kg の初回負荷量で、次いで、15日目および29日目に、 5 mg/kg の維持用量で静脈内投与した。

【0368】

C) 二重パラトピック抗HER2抗体-ADC (v6363) を、試験1日目に 10 mg/kg の初回負荷量で、次いで、15日目および29日目に、 5 mg/kg の維持用量で静脈内投与した。

【0369】

腫瘍体積を、試験を通じて測定し、応答動物数および生存期間中央値を22日目に評価した。結果を、図19において示す。結果の概要を表18において示す。

【0370】

二重パラトピック抗HER2-ADCおよび抗HER2 FSA-ADCは、IgG対照よりも良好に腫瘍増殖を阻害した(図19Aおよび表18)。二重パラトピック抗HER2-ADCは、抗HER2 FSA-ADCが阻害したよりも大規模に腫瘍増殖を阻害した。二重パラトピック抗HER2-ADC群は、抗HER2 FSA-ADCと比較して、応答腫瘍の数の増大と関連した(それぞれ11および9)。二重パラトピック抗HER2-ADCおよび抗HER2 FSA-ADC群は、IgG対照と比較して優れた生存率を実証した(図19Bおよび表18)。二重パラトピック抗HER2抗体群は、36日間の生存期間中央値を有した抗HER2 FSA-ADCと比較して、61日間の生存期間中央値を実証した(図19Bおよび表18)。

(表18)

n=15, 22日目	IgG	v6246	v6363
平均腫瘍体積 (mm^3) (基線からの変化%)	1908 (+766%)	873 (+297%)	632 (+187%)
% TGI	0	54%	67%
応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	0/15	9/15	11/15
生存期間中央値(日数)	22	36	61

【0371】

実施例18： ヒト一次細胞異種移植片モデル(HBCx-13b)における二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果

DM1にコンジュゲートさせた例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の抗腫瘍有効性を評価するために、トラスツズマブ抵抗性患者由来のヒト乳癌からの異種移植片モデルHBCx-13Bを使用した。

【0372】

雌の無胸腺ヌードマウスに、 20 mm^3 腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。 100 mm^3 の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を3つの処理群、すなわち、抗HER2 FSA (v506)、抗HER2 FSA-ADC

10

20

30

40

50

(v6246)、および二重パラトピック抗HER2-ADC(v6363)に無作為割当した。各群には、7匹の動物が含まれた。各群への投与は次のとおりである：

【0373】

A) 抗HER2 FSAを試験1日目に15mg/kgの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験4、8、11、15、18、22、および25日目に10mg/kgの維持用量を投与した。

【0374】

B) 抗HER2 FSA-ADCを試験1日目に10mg/kgの初回負荷量で、次いで、22日目に5mg/kgの維持用量で静脈内投与した。

【0375】

C) 二重パラトピック抗HER2抗体-ADCを、試験1日目に10mg/kgの初回負荷量で、次いで、試験22日目に、5mg/kgの維持用量で静脈内投与した。

【0376】

腫瘍体積を、試験を通じて測定し、平均腫瘍体積、完全応答、およびゼロ残留疾患(zero residual disease)パラメータを50日目に評価した。結果を図20において示す。結果の概要を表19において示す。

【0377】

二重パラトピック抗HER2-ADCおよび抗HER2 FSA-ADCは、抗HER2 FSA(v506)と比較して、大きな腫瘍増殖阻害を実証した。二重パラトピック抗HER2-ADCは、抗HER2 FSA-ADCよりも良好に腫瘍増殖を阻害した。二重パラトピック抗HER2-ADC群は、抗HER2 FSA-ADC群と比較して、完全応答(基線から10%超の減少)(それぞれ7および4)を示し、かつゼロ残留疾患(それぞれ5および2)を示す腫瘍数の増大と関連した。

(表19)

n=7, 50日目	v506	v6246	v6363
平均腫瘍体積 (mm ³)(基線からの変化%)	1149 (+1018%)	262 (+153%)	26 (-75%)
% TGI	0%	77%	98%
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0	4/7	7/7
ゼロ残留疾患 (腫瘍体積20mm ³ 未満)	0	2/7	5/7

【0378】

実施例19：ヒト一次細胞異種移植片モデル(T226)における二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果

例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCの抗腫瘍有効性を評価するために、患者由来のヒト乳癌からのトラスツズマブ抵抗性異種移植片モデルT226を使用した。

【0379】

雌の無胸腺ヌードマウスに、20mm³腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。100mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を4つの処理群、すなわち、IgG対照(n=15)、抗HER2 FSA(v506；n=15)、抗HER2 FSA-ADC(v6246；n=16)、および二重パラトピック抗HER2-ADCコンジュゲート(v6363；n=16)に無作為割当した。各群への投与は次のとおりである：

【0380】

A) IgG対照を試験1日目に15mg/kgの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験4、8、11、15、18、22、および25日目に10mg/kgの維持用量を投与した。

【0381】

B) 抗HER2 FSAを試験1日目に15mg/kgの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験4、8、11、15、18、22、および25日目に10mg/kgの維持用量を投与した。

【0382】

C) 抗HER2 FSA-ADCを試験1日目および15日目に5mg/kgで静脈内投与した。

【0383】

D) 二重パラトピック抗HER2-ADCコンジュゲートを試験1日目および15日目に5mg/kgで静脈内投与した。

【0384】

腫瘍体積を、試験経過を通じて測定し、平均腫瘍体積および完全応答パラメータを31日目に評価した。結果を図21において示す。結果の概要を表20において示す。

【0385】

二重パラトピック抗HER2-ADCおよび抗HER2 FSA-ADCは、抗HER2 FSA(v506)およびIgG対照と比較して良好な腫瘍増殖阻害を実証した。例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCは、このモデルにおいて、抗HER2 FSA-ADCと比較して同等の腫瘍増殖阻害および完全基線退縮を誘発した(図21および表20)。

(表20)

31日目	IgG (n=13)	v506 (n=13)	v6246 (n=16)	v6363 (n=16)
平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの変化%)	1797 (+1728%)	1611 (+1573)	422 (+332%)	572 (+483%)
% TGI (対 hIgG)	0%	11%	77%	68%
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0/13	0/14	1/16	1/16

【0386】

実施例20: ヒト一次細胞異種移植片モデル(HBCx-5)における二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果

例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCの抗腫瘍有効性を評価するために、患者由来のヒト乳癌からのトラスツズマブ抵抗性異種移植片モデルHBCx-5(侵襲性腺管癌、ルミナルB)を使用した。

【0387】

雌の無胸腺ヌードマウスに、20mm³腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。100mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし;次いで、動物を4つの処理群、すなわち、IgG対照(n=15)、抗HER2 FSA(v506;n=15)、抗HER2 FSA-ADC(v6246;n=16)、および二重パラトピック抗HER2-ADC(v6363;n=16)に無作為割当した。各群への投与は次のとおりであった:

【0388】

A) IgG対照を試験1日目に15mg/kgの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験4、8、11、15、18、22、および25日目に10mg/kgの維持用量を投与した。

【0389】

B) 抗HER2 FSAを試験1日目に15mg/kgの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験4、8、11、15、18、22、および25日目に10mg/kgの維持用量

10

20

30

40

50

を投与した。

【0390】

C) 抗HER2 FSA-ADCを試験1および15、22、29、36日目に10mg/kgで静脈内投与した。

【0391】

D) 二重パラトピック抗HER2-ADCを試験1および15、22、29、36日目に10mg/kgで静脈内投与した。

【0392】

腫瘍体積を、試験経過を通じて測定し、平均腫瘍体積、T/C比、応答動物数、完全応答、およびゼロ残留疾患パラメータを43日目に評価した。結果を図22において示す。結果の概要を表21において示す。

【0393】

二重パラトピック抗HER2-ADCおよび抗HER2 FSA-ADCは、抗HER2 FSA(v506)およびIgG対照と比較して良好な腫瘍増殖阻害を示した。例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCは、トラスツズマブ抵抗性HBCx-5ヒト乳癌異種移植片モデルにおいて、抗HER2 FSA-ADCと比較して同等の腫瘍増殖阻害を誘発し、応答動物数の増大を有した(図22および表21)。

(表21)

43日目	IgG (n=4)	Herceptin (n=5)	T-DM1 (n=7)	6363 (n=7)
平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの変化%)	922 (+693%)	815 (+598%)	193 (+65%)	241 (+106%)
T/C (IgG) 比	1	0.88	0.21	0.26
応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	0/4	1/5	6/7	7/7
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0/4	0/5	1/7	0/7
ゼロ残留疾患 (腫瘍体積20mm ³ 未満)	0/4	0/5	0/7	0/7

【0394】

実施例21: ヒト細胞系異種移植片モデル(SKOV3)における抗HER2治療抵抗性腫瘍に対する二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(ADC)の効果

抗HER2治療抵抗性腫瘍における例示的な二重パラトピック抗HER2-ADCの抗腫瘍有効性を評価するために、実施例17において記載したヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデルSKOV3を使用した。

【0395】

実施例17において記載したとおりに、ただし、次の変更を加えて、方法を行った。動物コホートに、抗HER2抗体を、試験1日目に15mg/kgで、かつ4、8、15日目に10mg/kgで静脈内投与したが;この処置は、このモデルでは、15日目までに有効な応答を実証することができなかった。次いで、この処置群を、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体薬物コンジュゲート(v6363)での処理に変換し、試験19および27日目に5mg/kgで、かつ試験34、41、および48日目に15mg/kgで投与した。

【0396】

腫瘍体積を、実験経過を通じて、週2回測定した。

【0397】

結果を図23において示すが、これは、例示的な二重パラトピック抗HER2-ADC(v6363)で処置した群は、220mm³の当初平均出発体積未満の平均腫瘍体積ま

での腫瘍退縮を示したことを示している。

【0398】

実施例 22： ヒト一次細胞異種移植片モデル (HBCx - 13b) における抗HER2 治療抵抗性腫瘍に対する二重パラトピック抗HER2 抗体薬物コンジュゲート (ADC) の効果

DM1にコンジュゲートさせた例示的な二重パラトピック抗HER2 抗体の抗腫瘍有効性を評価するために、トラスツズマブ抵抗性患者由来のヒト乳癌からの異種移植片モデルHBCx - 13Bを使用した。

【0399】

実施例18において記載したとおりに、ただし、次の変更を加えて、方法を行った。動物コホートに、二重特異性抗Erbbファミリーターゲティング抗体を、試験1日目に15mg/kgで、かつ4、8、15、18、22、および25日目に10mg/kgで静脈内投与したが；この処置は、有効な応答を実証することができなかった。次いで、この処置群を、例示的な二重パラトピック抗HER2 抗体薬物コンジュゲート(v6363)での処置に変換し、試験31日目、52日目に10mg/kgで、かつ試験45日目に5mg/kgで投与した。腫瘍体積を、研究の期間を通じて測定した。

【0400】

結果を図24において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2 - ADC(v6363)が、腫瘍の進行を防いだことを示している。最初の投与から57日目までに、v6363処置群の腫瘍体積は2%未満しか増大しなかったが、同じ期間において、v506処置群は、110%超増殖した。

【0401】

実施例 23： 例示的な二重パラトピック抗HER2 抗体のフコース含有率の分析

例示的な二重パラトピック抗HER2 抗体(v5019、v7091、およびv10000)のN-連結グリカンのフコース含有率を定量化するために、グリコペプチド分析を行った。

【0402】

グリコペプチド分析を、次のとおりに行った。抗体試料を、56で1時間にわたって10mM DTTで還元し、室温で1時間にわたって55mMヨードアセトアミドでアルキル化し、37で終夜にわたって、50mM炭酸水素アンモニウム中にトリプシンを含む溶液中で消化した。トリプシン消化物を、QToF-UltimaでのナノLC-MS/MSによって分析した。NCBIデータベースをMascotで検索して、タンパク質配列を同定した。MaxEnt3(MassLynx)を使用して、グリコペプチドイオンをデコンボリューションし、異なるグリコ型を定量化した。

【0403】

グリコペプチド分析結果の概要が、表22に示される。例示的な二重パラトピック抗HER2 抗体(v5019、v7091、およびv10000)のN-連結グリカンは、約90%フコシル化されている(フコースを伴わないN-連結グリカンは10%)。単一特異性抗HER2 FSA(v506)のN-連結グリカンは、約96%フコシル化されており(フコースを伴わないN-連結グリカンは4%)、かつHerceptin(登録商標)は、約87%フコシル化されている(フコースを伴わないN-連結グリカンは4%)。

(表22)FcN-連結グリコペプチド分析

抗体変異体	フコースを伴って観察されたグリコペプチドの平均%	フコースを伴わずに観察されたグリコペプチドの平均%	n
v506	96.4	3.6	5
Herceptin(登録商標)	86.5	13.4	4
v5019	90.5	9.4	6
v7091	89.9	26.9	3
v10000	89.2	10.7	5

10

【0404】

これらの結果は、CHO細胞において一過性に発現させた二重パラトピック抗HER2抗体（ヘテロ二量体Fcを含む）が、N-グリカンにおいて、市販のHerceptin（登録商標）と比較して約3%高いフコース含有率を有することを示している。CHO細胞において一過性に発現させたホモ二量体抗HER2 FSA（v506）は、約96%の最も高いフコース含有率を有する。

【0405】

実施例24： 例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の熱安定性

例示的な二重パラトピック抗HER2抗体（v5019、v7091、およびv10000）およびADC（v6363、v7148、およびv10533）の熱安定性を、下記のとおりにDSCによって測定した。

20

【0406】

DSCを、PBS中で約0.3mg/mlに調節した精製タンパク質試料（抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADC）を使用して、MicroCal（商標）VP-Capillary DSC（GE Healthcare）で行った。試料を60 /時の速度、低フィードバック、8秒フィルター、5分の事前温度調節（preTstat）、および窒素圧70psiで、20 から100 まで走査した。得られたサーモグラムを、Origin 7ソフトウェアを使用して分析した。

【0407】

例示的な二重パラトピック抗HER2抗体（v5019、v7091、およびv10000）の熱安定性結果を図25A～Cにおいて示す。図25Aは、v5019でのサーモグラムを示しており；5019のそれぞれのFcおよび鎖A Fabは、75 のT_mを有し、鎖B scFvは、69 のT_mを有する。図25Bは、v10000でのサーモグラムを示しており；Fc CH3ドメインは、82 のT_mを有し、Fab鎖Aは、76.5 のT_mを有し、鎖B scFvは、69.5 のT_mを有する。図25Cは、v7091でのサーモグラムを示しており；Fc CH3ドメインは、82 のT_mを有し、Fab鎖Aは、76.7 のT_mを有し、鎖B scFvは、69.5 のT_mを有する。

30

【0408】

例示的な二重パラトピック抗HER2 ADC（v6363、v7148、およびv10533）の熱安定性結果を図26A～Cにおいて示す。図26Aは、v6363でのサーモグラムを示しており；Fcは、75 のT_mを有し、鎖A FabおよびFc CH3ドメインは、75 のT_mを有する。6363の鎖B scFvは、69 のT_mを有する。図26Bは、v10533でのサーモグラムを示しており；Fc CH3ドメインは、83 のT_mを有し、鎖A Fabは、75.7 のT_mを有し、鎖B scFvは、66.2 のT_mを有する。図26Cは、v7148でのサーモグラムを示し；Fc CH3ドメインは、82.6 のT_mを有し、鎖A Fabは、74.8 のT_mを有し、鎖B scFvは、66.6 のT_mを有する。

40

【0409】

例示的な二重パラトピック抗体およびADCは、野生型IgGに匹敵する熱安定性を有

50

する。

【0410】

実施例25： 様々なレベルのHER2を発現する乳房腫瘍細胞のADCCを誘発する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力

HER2陽性3+、2+、および0/1+HER2発現(三重陰性)乳癌細胞系の用量依存性ADCCを誘発する例示的な二重パラトピック抗体(v5019)の能力を検査した。ADCC実験を、NKエフェクター細胞とターゲット細胞との比を5:1で一定なままにすることを除いて、実施例11において記載したとおりに行った。

【0411】

ADCC結果を、図27および表23において示す。図27A~Cにおける結果は、例示的な二重パラトピック抗体(v5019)が、Herceptin(登録商標)と比較して約1.2~1.3倍大きいHER2陽性3+、2+、および0/1+HER2発現乳癌細胞の最大細胞溶解を誘発することを示している。結果はまた、v5019(90%のN-グリカンがフコースを含む)は、Herceptin(登録商標)(86%のN-グリカンがフコースを有する;実施例23)と比較して、N-グリカンにおいて約4%高いフコース含有率を有する(NK細胞上のCD16への結合親和性が低くなる)にも関わらず、より有効にHER2陽性3+、2+、および0/1+HER2発現乳癌のADCCを媒介する。v5019によって誘発される、より高いターゲット細胞死滅は、実施例6において記載したとおりの腫瘍細胞装飾の増大によると推定することができる。

10

(表23) HER2 3+、2+、および0/1+HER2発現乳癌細胞のADCC

20

処理	SKBr3 HER2 3+		JIMT-1 HER2 2+		MDA-MB-231 HER2 0/1+	
	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)
v5019	30	約0.9	60	0.001	53	0.9
Herceptin(登録商標)	23	約0.9	51	0.002	44	0.9

【0412】

図27DにおけるADCC結果は、例示的な二重パラトピック抗体(v7091およびv10000)が、基礎HER2発現WI-38細胞系において、Herceptin(登録商標)と比較して同様の最大細胞溶解を誘発することを示している。ADCC結果は、HER2受容体レベルが10,000HER2/細胞よりも高いと、結合およびADCCの増大のための閾値が生じることを示した細胞結合データ(実施例6)を裏付けている。このデータに基づき、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体は、HER2 3+、2+および1+腫瘍細胞の細胞表面結合およびADCCを増大するであろうが、受容体約10,000以下のHER2受容体の基礎レベルを発現する非腫瘍細胞の細胞表面結合およびADCCを増大しないであろうと予測されるであろう。

30

【0413】

実施例26： ADCCに対する抗体非フコシル化の効果

40

HER2陽性2/3+、2+、および0/1+HER2発現(三重陰性)乳癌細胞系の用量依存性ADCCを誘発する非フコシル化された例示的な二重パラトピック抗体(非フコシル化v5019、非フコシル化10000)の能力を検査した。5:1の一定のNKエフェクター細胞またはPBMCエフェクター細胞とターゲット(E:T)細胞比との比を使用したことを除いて、実施例11において記載したとおり、ADCC実験を、SKOV3細胞、MDA-MB-231細胞、およびZR75-1細胞において行った。von Horsten et al. 2010 Glycobiology 20:1607-1618において記載されているとおりに一過性に発現されたRMD酵素を使用して、実施例1において記載したとおりに、非フコシル化された例示的な二重パラトピック抗体をCHO細胞において一過性に生成した。非フコシル化v5019および非フコシル

50

化v10000のフコース含有率を、実施例23において記載したとおりに測定したところ、それらは、2%未満とより少なくフコシル化されていることが決定された(データは図示せず)。NKエフェクター細胞を使用したデータを図28A~Bにおいて示し、PBM Cを使用したデータを図28Cにおいて示す。

【0414】

図28A、図28B、および表24は、非フコシル化v5019(v5019-afuco)が、Herceptin(登録商標)よりも約1.5~1.7倍高い最大細胞溶解で、HER2/3+および0/1+HER2発現乳癌細胞のADCCを誘発することを示している。

(表24)HER2 2/3+および基礎HER2発現(三重陰性)乳癌細胞のADCC

処理	SKOV3 HER2 2+/3+		MDA-MD-231 HER2 0/1+	
	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)
v5019-非フコシル化	24	約0.6	58	約0.6
Herceptin(登録商標)	14	約0.6	40	約0.3

10

【0415】

図28Cおよび表25における結果は、v10000が、Herceptin(登録商標)よりも約1.3倍大きい最大細胞溶解でHER2 2+ZR-75-1乳癌細胞のADCCを誘発し、非フコシル化v10000が、Herceptin(登録商標)よりも約1.5倍大きい最大細胞溶解を誘発することを示している。

(表25)HER2 2/3+乳癌細胞のADCC

処理	ZR-751 HER2 2+	
	ターゲット細胞溶解の最大%	EC ₅₀ (nM)
v10000	28	約0.06
v10000-非フコシル化	32	約0.7
Herceptin(登録商標)	21	約0.5

20

30

【0416】

ADCC結果は、Herceptin(登録商標)をベンチマークとして使用した場合、例示的な非フコシル化二重パラトピック抗体(非フコシル化v5019、非フコシル化v10000)が、フコシル化抗体(v5019、実施例25、v10000)と比較して約15~25%高い最大細胞溶解を誘発することを示している。これらの結果は、FcN-グリカンのフコース含有率の低下が、ADCCによる最大細胞溶解の増大をもたらすことを示している。

【0417】

実施例27: 外因性増殖刺激リガンド(EGFおよびHRG)の存在下でHER2 3+乳癌細胞の増殖を阻害する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体の能力

40

外因性増殖刺激リガンド(EGFおよびHRG)の存在下でHER2 3+乳癌細胞の増殖を阻害する5019の能力を検査した。

【0418】

試験抗体および外因性リガンド(HRG10ng/mLまたはEGF50ng/mL)を、ターゲットBT-474HER2 3+細胞に三つ組で添加し、37°Cで5日間にわたってインキュベートした。細胞生存率を、AlamarBlue(商標)(37°Cで2時間)を使用して測定し、吸光度を、530/580nmで読み取った。データを未処理対照に対して正規化し、GraphPad Prismを使用して分析を行った。

【0419】

50

結果を、図 29 および表 26 において示す。結果は、例示的な二重パラトピック抗体 v5019 が、増殖刺激リガンド (70% 阻害) の不在下で、さらには、EGF (40% 阻害) または HRG (約 10% 阻害) の存在下で、HER2⁺ 乳癌細胞の増殖を阻害することを示している。抗 HER2 単一特異性 FSA (v506) は、他の erbb 受容体 EGF R および HER3 による EGF または HRG 誘発性腫瘍細胞増殖を遮断しない。v5019 は、HER2 およびリガンド依存性二量化および他のコンパニオン erbb 受容体による増殖の阻害において、v506 よりも優れている。

(表 26) HER2⁺ 癌細胞の増殖阻害

処理	生存率%		
	抗体のみ	+ EGF	+ HRG
偽	100	122	110
v506	41	114	129
v5019	31	56	92

10

【0420】

これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗体が、おそらく抗 ECD2 鎖 A Fab アームの結合によって HER2 + 細胞のリガンド依存増殖を低減させ、その後、リガンド刺激受容体ホモおよびヘテロ二量化、ならびに erbb シグナル伝達を遮断し得ることを示している。

【0421】

実施例 28 : 侵襲性腺管乳房癌のトラスツズマブ抵抗性および化学療法抵抗性 HER2⁺ 3 + 患者由来 (PDX) の転移性乳癌異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗 HER2 抗体の効果

20

侵襲性腺管ヒト乳癌からの HER2⁺ (ER - PR 陰性) 患者由来の異種移植片モデル HBCx - 13B を、例示的な二重パラトピック抗 HER2 抗体 v7187 の抗腫瘍有効性を評価するために使用した。v7187 は、v5019 の非フコシル化バージョンである。

【0422】

上記モデルは、単一薬剤トラスツズマブ、トラスツズマブおよびペルツズマブの組み合わせ (実施例 31 を参照されたい)、カペシタピン、ドセタキセル、ならびにアドリアマイシン/シクロホスファミドに対して抵抗性である。

30

【0423】

雌の無胸腺ヌードマウスに、20 mm³ 腫瘍断片を皮下接種した。次いで、140 mm³ の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターした。次いで、各群に動物 8 匹で、動物を 2 つの処置群、すなわち、ビヒクル対照および v7187 に無作為割当した。静脈内投与は次のとおりであった。ビヒクル対照を、試験 43 日目まで週 2 回、製剤緩衝液 5 ml / kg で静脈内投与した。v7187 を、試験 43 日目まで週 2 回、10 mg / kg で静脈内投与した。表 27 において示すとおり、腫瘍体積を、試験を通じて測定し、他のパラメータを 43 日目に評価した。

【0424】

結果を図 30 および表 27 において示す。結果は、ビヒクル対照で処置した腫瘍は、継続した進行を示し、試験 43 日目までに 1600 mm³ を超えたことを示している。v7187 で処置したマウスは、43 日目に 740 mm³ の平均腫瘍体積で、有意により大きな腫瘍増殖阻害 (T/C - 0.44) を示した。v7187 は、腫瘍の 5/8 において応答を誘発し、その際、ただ 1 つの腫瘍が、試験 43 日目に、ゼロ残留疾患で完全な退縮を示した。v7187 で処置した動物は、優れた奏功率を有し、その際、ビヒクル対照で処置したマウスの 0/8 と比較して、腫瘍の 5/8 が治療に応答した。加えて、v7187 での処置は、ビヒクル対照と比較して、腫瘍進行を有意に遅延したが、その際、倍加時間はそれぞれ、19 および 11 日であった。

40

(表 27)

腫瘍応答		ビヒクル	V7087
43日目	平均腫瘍体積(mm ³) (基線からの変化%)	1683 (+1079%)	740 (+422%)
	T/C 比	1	0.44
	応答動物(腫瘍体積が対照の50%未満)	0/8	5/8
	PR (10%超の基線からの退縮)	0/8	1/8
	ZRD (腫瘍体積20mm ³ 未満)	0/8	1/8
進行までの 時間	倍加時間(日数)	11	19

10

【0425】

これらのデータは、例示的な抗HER2二重パラトピック(v7187)がトラスツズマブ+ペルツズマブ抵抗性HER2³⁺転移性乳癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効であることを示している。V7187処理は、高い奏功率を有し、標準治療抵抗性HER2³⁺乳癌の腫瘍進行を有意に減速させ得る。

【0426】

実施例29: HER2+腫瘍細胞系への二重パラトピック抗HER2 ADCの結合の 20
評価

HER2陽性3+、2+乳房および卵巣腫瘍細胞系に結合し、それらを飽和させる例示的な二重パラトピック抗HER2 ADCの能力を、実施例6において記載されており、FACSによって分析した。

【0427】

データを図31において示す。図31Aは、v6363が、飽和濃度で、T-DM1(v6246)よりも約2.0倍大きなBmax(MFI)で、SKOV3腫瘍細胞系に結合することを示している。図31Bは、v6363が、飽和濃度で、T-DM1(v6246)よりも約1.6倍大きなBmax(MFI)で、JIMT-1腫瘍細胞系に結合することを示している。これらのデータは、v6363(ADC)が、コンジュゲートされていない親のv5019抗体と比較して、同様の、細胞表面結合の増大という腫瘍細胞結合特性を有することを示している(実施例6)。SMCC-DM1(v6363)とのv5019のコンジュゲーションは、抗体の抗原結合性特性を変えるものではない。

30

【0428】

例示的な二重パラトピック抗体(v5019、v7091、およびv10000)およびADC(v6363、v7148、およびv10553)との直接的な比較を含めるために、FACS結合アッセイを繰り返した。データを図31Cおよび図31Dにおいて示す。例示的な二重パラトピック抗HER2 ADC(v6363、v7148、およびv10553)は、未標識二重パラトピック抗体(v5019、v7091、およびv10000)と比較して同等の細胞表面飽和(Bmax)を有した。

40

【0429】

これらのデータは、SMCC-DM1との例示的な二重パラトピック抗体(v5019、v7091、およびv10000)のコンジュゲーションが、結合特性を変えないことを示している。例示的な抗HER2二重パラトピック抗HER2 ADC(v6363、v7148、およびv10553)は、単一特異性抗HER2 ADC(v6246、T-DM1)と比較して約1.5倍(またはそれ以上)の細胞表面結合の増大を有する。

【0430】

実施例30: HER2³⁺(ER-PR陰性)患者由来の異種移植片モデルにおける
例示的な抗HER2二重パラトピック-ADCの用量依存性腫瘍増殖阻害

例示的な二重パラトピック抗HER2 ADC、v6363の抗腫瘍有効性を評価する

50

ために、HER2 3+ (ER - PR 陰性) 患者由来の侵襲性腺管ヒト乳癌からの異種移植片モデルHBCx - 13Bを使用した。このモデルは、単一薬剤のトラスツズマブ、トラスツズマブおよびペルツズマブの組み合わせ(実施例31を参照されたい)、カペシタピン、ドセタキセル、ならびにアドリアマイシン/シクロホスファミドに対して抵抗性である。

【0431】

雌の無胸腺ヌードマウスに、20 mm³ 腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。次いで、160 mm³ の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし; 次いで、動物を5つの処置群、すなわち、非特異的ヒトIgG対照、および4群のv6363の漸増用量に無作為割当した。各群には、8~10匹の動物が含まれた。各群での投与は次のとおりであった。IgG対照を、試験29日目まで週2回、10 mg/kgで静脈内投与した。v6363を、試験1、15、および29日目に、0.3、1、3、または10 mg/kgで静脈内投与した。表29に示すとおりに、腫瘍体積を、試験を通じて評価し、パラメータを評価した。

10

【0432】

結果を図32および表28において示す。これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピックADC(v6363)が、トラスツズマブ抵抗性HBCx - 13b PDXモデルにおいて、用量依存性腫瘍増殖阻害を媒介することを示している(図32A)。加えて、v6363は、IgG対照での43日間と比較して、3 mg/kgおよび10 mg/kg用量では、63日間超の生存期間中央値時間で、用量依存的に全体生存率を改善した(図32Bおよび表28)。3 mg/kg用量は、対照(0/8)と比較して、奏功率の上昇(5/10)と関連した。10 mg/kg用量のv6363で処理したマウスはすべて、治療(9/9)に应答しただけではなく、腫瘍進行の予防も示した。さらに、腫瘍の大部分が、客観的な部分的应答(7/9)を有し、試験の終了時には、多くが、ゼロ残留疾患(6/9)を有した。v6363は、すべての用量で忍容性が良好であり、有害事象は観察されず、体重減少は観察されなかった。

20

(表28)

腫瘍応答		IgG	6363 0.3 mg/kg	6363 1 mg/kg	6363 3 mg/kg	6363 10 mg/kg
43日目	平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの 変化%)	1963 (+1119%)	1916 (+1073%)	1613 (+895%)	1268 (+682%)	84 (-49%)
	T/C (IgG) 比	1	0.97	0.82	0.64	0.04
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	0/8	0/10	2/10	5/10	9/9
	PR (10%超の 基線からの 退縮)	0/8	0/10	0/10	0/10	7/9
	ZRD (腫瘍体積 20mm ³ 未満)	0/8	0/10	0/10	0/10	6/9
進行までの 時間	腫瘍倍加時間 (日数)	9	9	14	17	52
生存応答	中央生存日数	43	41	50	>63	>63
体重	基線からの 変化%	+10%	+10%	+9%	+5%	+0%

【0433】

これらのデータは、例示的な抗HER2二重パラトピックADC (v6363) が、トラスツズマブ+ペルツズマブ抵抗性HER2⁺転移性乳癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効であることを示している。v6363処置は、標準治療抵抗性HER2⁺乳癌において、高い奏効率と関連し、腫瘍進行を有意に減速させ、生存期間を延長させる。

【0434】

実施例31: トラスツズマブ抵抗性PDX HBCx-13bにおける二重パラトピック抗HER2-ADCと標準治療の組み合わせとの比較

ER-PR陰性トラスツズマブ抵抗性患者由来のHER2⁺乳癌異種移植片モデル (HBCx-13b) におけるv6363の有効性を評価し、Herceptin (商標) + Perjeta (商標); およびHerceptin (商標) + ドセタキセルの組み合わせと比較した。

【0435】

雌の無胸腺ヌードマウスに、20mm³腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。100mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし; 次いで、動物を4つの処理群 (動物8~10匹/群)、すなわち、非特異的ヒトIgG対照、Herceptin (商標) + ドセタキセル、Herceptin (商標) + Perjeta (商標)、およびv6363に無作為割当した。各群での投与は次のとおりであった。IgG対照

10

20

30

40

50

を、試験29日目まで週2回、10mg/kgで静脈内投与した。Herceptin(商標)+ドセタキセルの組み合わせでは、Herceptin(商標)を、試験29日目まで週2回、10mg/kgで静脈内投与し、ドセタキセルを、試験1日目および22日目に20mg/kgで腹腔内投与した。Herceptin(商標)+Perjeta(商標)の組み合わせでは、Herceptinを、試験29日目まで週2回、5mg/kgで静脈内投与し、Perjeta(商標)を、試験29日目まで週2回、5mg/kgで静脈内投与した。Herceptin(商標)およびPerjeta(商標)の投与は同時であった。v6363を、試験1、15、および29日目に10mg/kgで静脈内投与した。

【0436】

結果を図33および表29において示す。図33Aは、腫瘍体積を経時的に示しており、図33Bは、生存率のプロットを示している。これらの結果は、Herceptin(商標)+Perjeta(商標)の組み合わせが、対照IgGと比較して何らの腫瘍増殖阻害も生じず、39日目には1800mm³を超えたことを示している。Herceptin(商標)+ドセタキセルの組み合わせは、腫瘍増殖を有意に低減することはなかったが、生存期間中央値を、IgG対照での43日間と比較して53日間まで延長した。v6363は、有意な腫瘍増殖阻害(T/Cは0.04)を生じ、その際、すべての腫瘍が治療に应答し、腫瘍の7/10が、完全な退縮(ゼロ残留疾患)を経験した。v6363は、併用療法の両方と比較して、生存率を有意に延長した。コホート全体で、体重は、処理によって有意な影響を受けなかった。

(表29)

腫瘍応答		IgG	Herceptin(商標) +	Herceptin(商標) +	v6363
			Perjeta(商標)	ドセタキセル	10mg/kg
39日目	平均腫瘍体積(mm ³) (基線からの 変化%)	1809 (+1023%)	1975 (+1085%)	1328 (+714%)	76 (-54%)
	T/C (IgG) 比	1.0	1.10	0.73	0.04
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	0/8	0/8	1/10	9/9
	PR (10%超の 基線からの退縮)	0/8	0/8	0/10	8/9
	ZRD (腫瘍体積20mm ³ 未満)	0/8	0/8	0/10	6/9
生存応答	中央生存日数	43	39	53	>63
体重	基線からの 変化%	+10%	+7%	+3%	-2%

【0437】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピックADC(v6363)が、この

異種移植片モデルにおいて試験したすべてのパラメータに関して、標準治療の組み合わせよりも優れていることを示している。

【0438】

実施例32：HER2+トラスツズマブ抵抗性乳癌細胞由来の腫瘍異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗HER2-ADCの有効性

HER2³⁺トラスツズマブ抵抗性乳癌細胞由来の(JIMT-1、HER2²⁺)異種移植片モデルにおけるv6363の有効性を評価した(Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592)。

【0439】

雌のRAG2マウスに、腫瘍を皮下接種した。次いで、115mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を2つの処理群、すなわち、トラスツズマブ(n=10)およびv6363に無作為割当した。各群での投与は次のとおりであった。トラスツズマブを試験1日目に15mg/kgで、かつ試験26日目まで週2回、10mg/kgで静脈内投与した。v6363を、試験1日目および15日目に5mg/kgで、かつ23日目および30日目に10mg/kgで、かつ37および44日目に9mg/kgで静脈内投与した。

【0440】

結果を、図34および表30において示す。これらの結果は、v6363が、試験36日目に、トラスツズマブと比較して腫瘍増殖を有意に阻害した(T/Cは0.74)ことを示している。v6363およびトラスツズマブ処理は、体重を有意に変化させなかった。v6363血清曝露は、初回の10mg/kg用量から7日後に、17.9μg/mlであった。

(表30)

腫瘍応答		トラスツズマブ	6363
36日目	平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの 変化%)	718 (+541)	532 (+335%)
	T/C (Tras) 比	1	0.74
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	1/10	2/13
	PR (10%超の 基線からの退縮)	0/10	0/13
	ZRD (腫瘍体積 20mm ³ 未満)	0/10	0/13
体重	基線からの 変化%	+5.8%	+3.1%
薬物曝露 (7日目)	平均血清濃度 (μg/ml)	187.2	17.9

【0441】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピックADC(v6363)がトラスツズマブ抵抗性乳癌において有効であり、現行の標準治療に対して抵抗性である乳癌の処置において潜在的な有用性を有することを示している。

【0442】

実施例33：抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCのヘテロ二量体FcへのFcR結合

ヒトFcRへの、ヘテロ二量体Fcを有する抗HER2二重パラトピック抗体(v5019、v7019、v10000)およびADC(v6363、v7148、およびv10553)の結合を評価し、ホモ二量体Fcを有する抗HER2 FSA(v506)およびADC(v6246)と比較した。

10

【0443】

抗体Fc領域へのFcRの親和性を、Protein XPR36(BIO-RAD)を使用してSPRによって測定した。HER2を、標準的なアミンカップリングによってCM5チップ上に固定化した(3000RU)。抗体は、HER2表面上で抗原捕捉された。精製したFcRを、様々な濃度(20~30µl/分)で2分間にわたって注入し、続いて、4分間解離させた。センソグラムを、1:1Langmuir結合モデルに全体的にフィットさせた。実験を25で行った。

【0444】

結果を表31において示す。例示的なヘテロ二量体抗HER2二重パラトピック抗体およびADCは、同等の親和性でCD16aF、CD16aV158、CD32aH、CD32aR131、CD32bY163、およびCD64Aに結合した。SMCC-DM1との抗体のコンジュゲーションは、FcR結合にマイナスの影響を及ぼさない。ヘテロ二量体抗HER2二重パラトピック抗体は、CD16aF、CD32aR131、CD32aHに対して、ホモ二量体抗HER2 FSA(v506)およびADC(v6246)と比較して約1.3~2倍高い親和性を有する。これらの結果は、ヘテロ二量体抗HER2二重パラトピック抗体およびADCが、野生型ホモ二量体IgG1と同様か、またはそれよりも高い親和性で、免疫エフェクター細胞上のFcRの異なる多形形態に結合することを示している。

20

(表31) SPRによるヒトFcR結合

変異体	10uM CD16a v158		10uM CD16aF		10uM CD32aR131		10uM CD32aH		10uM CD32b Y163		100nM CD64A	
	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD
v506	1.5E-07	2E-08	7.1E-07	1.E-08	7.6E-07	1.E-07	6.3E-07	2E-08	2.4E-06	1.E-07	8.64E-10	4.33E-10
v6246	1.6E-07	2E-08	7.0E-07	9.E-09	7.4E-07	7.E-08	6.3E-07	2E-08	2.1E-06	7.E-08	1.08E-09	5.13E-10
v10000	1.2E-07	1E-08	4.8E-07	2.E-08	5.1E-07	9.E-08	4.6E-07	2E-08	1.5E-06	7.E-08	8.41E-10	4.74E-10
v10553	1.2E-07	2E-08	4.9E-07	2.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.6E-07	4E-09	1.2E-06	7E-08	4.95E-10	1.41E-10
v7091	1.2E-07	1E-08	5.1E-07	2.E-08	5.6E-07	9.E-08	5.0E-07	3E-08	1.7E-06	8E-08	9.68E-10	5.05E-10
v7148	1.2E-07	2E-08	5.4E-07	2.E-07	3.7E-07	1.E-07	4.2E-07	1E-08	1.5E-06	1.E-07	5.77E-10	2.02E-10
v5019	1.3E-07	1E-08	5.2E-07	1.E-08	5.6E-07	6.E-08	4.7E-07	2E-08	1.6E-06	2.E-07	8.44E-10	4.88E-10
v6363	1.2E-07	2E-08	4.5E-07	1.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.4E-07	1E-08	1.2E-06	5.E-08	4.58E-10	1.13E-10

30

【0445】

実施例34：トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来の腫瘍異種移植片モデルにおけるin vivoでの例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の有効性

40

例示的な二重パラトピック抗HER2抗体v5019、v7091、およびv10000の抗腫瘍有効性を評価するために、実施例17において記載したヒト卵巣癌細胞由来の確立された異種移植片モデルSKOV3を使用した。

【0446】

雌の無胸腺ヌードマウスに、左側腹部で、HBSs中の325,000細胞の腫瘍懸濁液を皮下接種した。次いで、190mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし、無作為割当および交互様式で、4つの処置群、すなわち、非特異的ヒトIgG対照、v5019、v7091、およびv10000に登録した。各群での投与は次のとおりであった。非特異的ヒトIgGを、試験1日目に開始して、試験26日目まで週2回、10mg/kgで静脈内投与した。V5019、v7091、およびv10000を、試験1日目

50

を開始して、試験 26 日目まで週 2 回、3 mg / kg で静脈内投与した。腫瘍体積を、試験を通じて測定し、表 3 2 において列挙するパラメータを 29 日目に測定した。

【 0 4 4 7 】

データを図 3 5 A (腫瘍増殖)、図 3 5 B (生存率プロット)、および表 3 2 において提示するが、これらは、v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、および v 1 0 0 0 0 での処置が、I g G 対照と比較して匹敵する腫瘍増殖阻害 (T / C : 0 . 5 3 ~ 0 . 7 1)、応答腫瘍数、進行までの時間、および試験 29 日目での生存率をもたらしたことを示している。v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、および v 1 0 0 0 0 の血清曝露は、試験 7 日目で、同様であった (3 1 ~ 4 1 μ g / m l)。

(表 3 2)

腫瘍応答		IgG (n=8)	v5019 (n=11)	V7091 (n=11)	V10000 (n=11)
29日目	平均腫瘍体積 (mm ³) (基線からの 変化%)	1903 (+899%)	1001 (+416%)	1354 (+618%)	1114 (+503%)
	T/C (Tras) 比	1	0.53	0.71	0.58
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	1/8	5/11	4/11	6/11
	PR (10%超の 基線からの退縮)	0/8	1/11	0/11	0/11
	ZRD (腫瘍体積 20mm ³ 未満)	0/8	0/11	0/11	0/11
進行する までの時間	腫瘍倍加時間 (日数)	12	15	16	15
生存率	中央生存日数	29	Na	37	41
薬物曝露 (7日目)	平均血清濃度 (ug/ml)	na	31.2	41.0	31.2

【 0 4 4 8 】

これらの結果は、例示的な抗 H E R 2 二重パラトピック抗体 v 5 0 1 9、v 7 0 9 1、および v 1 0 0 0 0) が、中等度トラスツズマブ感受性 H E R 2 過剰発現卵巣癌の処置において、潜在的な有用性を有することを示している。

【 0 4 4 9 】

実施例 3 5 : 例示的な二重パラトピック抗 h e r 2 抗体は、トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来の腫瘍異種移植片において、腫瘍増殖を用量依存的に阻害する

例示的な二重パラトピック抗 H E R 2 抗体 v 1 0 0 0 0 の用量依存性有効性を評価するために、実施例 1 7 において記載したヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデル S K O V 3 を使用した。

【 0 4 5 0 】

雌の無胸腺ヌードマウスに、左側腹部で、HBS S中の325,000細胞の腫瘍懸濁液を皮下接種した。次いで、190 mm³の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし、無作為割当および交互様式で、6つの処置群、すなわち、非特異的ヒトIgG対照およびv10000の5つの漸増用量に登録した。各群は、動物9~13匹を含んだ。各群での投与は次のとおりであった。IgG対照を、試験26日目まで週2回、10 mg/kgで静脈内投与した。V10000を、週2回、0.1、0.3、1、3、または10 mg/kgで静脈内投与した。

【0451】

データを、図36および表33において提示するが、これらは、v10000での処置が、対照IgGと比較して、腫瘍増殖阻害(T/C:0.28~0.73)を用量依存的に誘発することを示している。加えて、v10000は、研究29日目で、応答腫瘍(10 mg/kgで7/9、および0.1 mg/kgで3/11)と用量依存的に関連し、進行するまでの時間を増大させた(10 mg/kgでは24日間、および0.1 mg/kgでは12日間)。7日目でv10000の血清曝露は、用量依存的であり、0.1 mg/kg用量での0.46 µg/mlから、10 mg/kg用量での79.3 µg/mlまで増大した。

(表33)

腫瘍応答		IgG (n=8)	V10000, 10 mg/kg (n=9)	V10000, 3 mg/kg (n=11)	V10000, 1 mg/kg (n=11)	V10000, 0.3 mg/kg (n=13)	V10000, 0.1 mg/kg (n=11)
29日目	平均腫瘍体積(mm ³) (基線からの変化%)	1903 (+899%)	543 (+281%)	1114 (+503%)	1534 (+688%)	1535 (+694%)	1385 (+643%)
	T/C比	1	0.28	0.58	0.81	0.81	0.73
	応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	1/8	7/9	6/11	2/11	3/13	3/11
	PR (10%超の基線からの退縮)	0/8	1/9	0/11	0/11	0/13	0/11
	ZRD (腫瘍体積20mm ³ 未満)	0/8	0/9	0/11	0/11	0/13	0/11
進行するまでの時間	腫瘍倍加時間 (日数)	12	24	15	14	12	12
薬物曝露 (7日目)	平均血清濃度 (ug/ml)	na	79.3	31.2	4.7	1.5	0.46

【0452】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体v10000が、用量依存的に腫瘍進行を阻害することを示している。

【0453】

実施例36: HER2、ならびにEGFRおよび/またはHER3を3+、2+、または1+レベルで発現する細胞系の増殖を阻害する抗HER2二重パラトピック抗体および抗HER2二重パラトピック-ADCの能力

IHCによって定義されているとおり、HER2、ならびにEGFRおよび/またはHER3を3+、2+、1+、または0+レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頸部、子宮、および膀胱腫瘍細胞系から選択されたものの増殖を阻害する例示的な二重パラトピック抗HER2抗体(v10000)および対応する二重パラトピック抗HER2 ADC(v10553)の能力を測定するために、次の実験を行った。

【0454】

実験を、次のとおりに行った。各細胞系について最適な播種密度を独自に決定して、72時間のアッセイ後に、集密度約60～90%をもたらす播種密度を特定した。各細胞系を、96ウェルプレート内で細胞系ごとに適切な増殖培地中に最適な播種密度で播種し、36および5%CO₂で、24にわたってインキュベートした。陽性対照およびビヒクル対照のほかに、抗体を、3つの濃度で(v10000は300、30、および0.3nMで；v10553は300、1、0.1nMで)添加した。陽性対照である化学療法薬カクテル(chemococktail)薬物組合せは、5-FU(5-フルオロウラシル)、パクリタキセル、シスプラチン、エトポシド(25μM)からなり、ビヒクル対照は、PBSからなった。抗体処理および対照を、細胞培養インキュベーター中、36および5%CO₂で、72時間にわたって細胞と共にインキュベートした。プレートを1200RPMで10分間にわたって遠心し、培養培地を吸引によって完全に除去した。RPMI 1640培養培地(200μL)およびMTS(20μL)を各ウェルに添加し、36および5%CO₂で3時間にわたってインキュベートした。光学密度を490nmで読取り、増殖阻害率を、ビヒクル対照に対して決定した。

10

【0455】

結果を図37において示し、すべての試験結果の概要を図38において示す。図37Aは、v10000の増殖阻害結果を示している。これらの結果は、v10000が、HER2ならびに同時発現のEGFRおよび/またはHER3を3+、2+、1+、または0+レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頸部、子宮、および子宮内膜腫瘍細胞系の増殖を阻害し得ることを示している。300nMでのv10000およびv10553の活性を図38においてまとめているが、この際、「+」は、300nMで、ビヒクル対照の5%超である細胞生存率の低減を示した細胞系を示し、「-」は、ビヒクル対照の5%以下の生存率を示している。

20

【0456】

図37Bは、v10553の増殖阻害結果を示している。これらの結果は、v10553が、HER2、ならびに同時発現のEGFRおよび/またはHER3を3+、2+、1+、または0+レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頸部、子宮、および膀胱腫瘍細胞系の増殖を阻害し得ることを示している(図38も参照されたい)。図37Bにおいてプロットした結果は、300および1nMで最低の用量依存性増殖阻害を示した細胞系によって定義されており、1nMでの増殖阻害は、5%以上である(図37B)。

30

【0457】

これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗体v10000およびADCのv10553が、HER2を3+、2/3+、2+、1+、および0/1+レベルで発現し、かつEGFRおよび/またはHER3を2+、1+レベルで同時発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頸部、子宮、および膀胱組織に由来する腫瘍細胞の増殖を阻害し得ることを示している。

【0458】

実施例37：HER2 2+、1+、および0/1+癌細胞のADCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力

40

HER2を2+、1+、および/または0/1+レベルで発現し、かつEGFRおよび/またはHER3を2+または1+レベルで同時発現する腫瘍細胞のADCを媒介する抗HER2二重パラトピック抗体の能力を決定するために、次の実験を行った。試験した抗HER2二重パラトピック抗体は、対照としてのHerceptin(商標)およびv506と共に、5019、10000、および10154(v10000の非フコシル化バージョン)であった。

【0459】

ADC実験を、NK-92エフェクター細胞を用いて5:1のE/Tで実施例11および実施例25において記載されているとおりに(図39)、かつPBMCエフェクター

50

細胞を用いて30 : 1のE / Tで実施例26において記載されているとおりに行った。

【0460】

結果を、図39 (NK-92エフェクター細胞) および図40 (PBMCエフェクター細胞) において示す。図39Aは、HER2²⁺ + 頭頸部腫瘍細胞系(下咽頭癌) FaDuのADCC結果を示しており、この際、抗HER2二重パラトピックは、約15%の最大細胞溶解を誘発している。図39Cは、HER2¹⁺ + BxPC3膵臓腫瘍細胞系のADCC結果を示しており、図39Dは、HER2²⁺ + MiaPaca2膵臓腫瘍細胞系の結果を示している。図39Bは、HER2^{0/1+} + A549 NSCLC(非小細胞肺癌)腫瘍細胞系のADCC結果を示している。BxPC3、MiaPaca2、およびA549腫瘍細胞系において、v10000は、約5%の最大腫瘍細胞溶解を媒介した。

10

【0461】

図40は、A549、NCI-N87、およびHCT-116細胞におけるADCC結果を示しており、この際、PBMCをエフェクター細胞として使用した。図40Aは、HER2^{0/1+} + A549 NSCLC腫瘍細胞系のADCC結果を示しており、この際、v10000は、約28%の最大細胞溶解を誘発し、これは、N-連結グリカンにおいて同等レベルのフコース含有率を有するHerceptin(商標)に匹敵した。例示的な100%非フコシル化(フコース0%)二重パラトピックv10154は、N-連結グリカン中にフコース約88%を有するv10000およびHerceptinと比較して、最大細胞溶解の増大(40%の最大細胞溶解)および効力の増大を示している。

20

【0462】

図40Bは、HER2³⁺ + 胃腫瘍細胞系NCI-N87のADCC結果を示している。図40Bは、例示的な二重パラトピックv5019(約88%フコシル化)が約23%の最大細胞溶解を媒介し、トラスツズマブv506(約98%フコシル化)と比較して低いEC50を有することを示している。

【0463】

図40Cは、HER2¹⁺ + HCT-116結腸直腸腫瘍細胞系のADCC結果を示している。図40Cは、例示的な二重パラトピックv5019(約88%フコシル化)が約25%の最大細胞溶解を媒介し、トラスツズマブv506(約98%フコシル化)と比較して効力があることを示している。

30

【0464】

これらの結果は、例示的な抗HER2二重パラトピック抗体が、頭頸部、胃、NSCLC、および膵臓腫瘍病理に由来するHER2^{0/1+}、²⁺、および³⁺腫瘍細胞のADCCを誘発し得ることを示している。エフェクター細胞としてのNK-92細胞の存在下でのADCCは、比較的高い(5%超)パーセンテージの最大細胞溶解を示すために、明らかなHER2²⁺ + 受容体レベル要求(すなわち、²⁺以上)を示した。しかしながら、PBMC細胞をエフェクター細胞として使用した場合には、比較的高いレベルの最大細胞溶解が達成され(それぞれv10000およびv10154で、5%超および最高28%または40%)、かつこれは、^{0/1+}、¹⁺、および³⁺のHER2受容体密度レベルでも5%超ADCCが見られたので、HER2受容体密度には依存していなかった。

40

【0465】

実施例38：SPRによって測定したHER2結合親和性および反応速度

実施例1において示したとおり、種々の抗原結合性部分の形式を有する抗HER2二重パラトピック抗体を、表1において記載したとおりに構築した。それらの形式には、scFv-scFv形式(v6717)、Fab-Fab形式(v6902およびv6903)の他にも、Fab-scFv形式(v5019、v7091、およびv10000)が含まれた。次の実験を、これらの例示的な抗HER2二重パラトピック抗体形式のHER2結合親和性および反応速度を比較するために行った。

【0466】

マウスHER2 ECD(Sino Biological 50714-M08H)へ

50

の親和性および結合反応速度を、Biacore (GE Healthcare) 製の T200 SPR システムを用いて単一サイクル反応速度によって測定した。抗ヒトFc2000~4000RUを、標準的なアミンカップリングを使用してCM5チップ上に固定化した。5019は、50RUで抗ヒトFc表面上に捕捉された。組換えHER2ECD(1.8~120nM)を50 μ l/分で3分間にわたって注入し、最終の注入後に、30分の解離を続けた。HER2希釈を二つ組で分析した。センサーグラムを、1:1Langmuir結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を室温の25で行った。

【0467】

表34における結果は、Fab-scFv二重パラトピック抗体(v5019およびv7091)、Fab-Fab変異体(v6902およびv6903)、およびscFv-scFv変異体(v6717)が同等の結合親和性(1~4nM)を有することを示している。Fab-scFv変異体v10000は、約0.6nMの比較的高い結合親和性(低いKD)を示した。単一特異性抗HER2ECD4抗体(v506)および抗HER2ECD2抗体(v4184)は、対照としてアッセイに含まれた。これらの結果は、v6717、v6902、v6903、v5019、および/またはv7091を含む分子形式が、同等の結合親和性を有し、したがって、これらの抗体間での機能の差違は、形式の差異から生じていると考えることができることを示している。

(表34)

抗体変異体	平均			標準偏差		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
v506	7.34E+04	4.08E-05	5.56E-10	1.13.E+03	3.04E-06	3.28E-11
v4184	3.61E+04	5.46E-04	1.56E-08	7.78.E+03	2.80E-05	4.12E-09
v5019	6.01E+04	7.77E-05	1.29E-09	1.30.E+03	8.56E-07	4.24E-11
v7091	5.17E+04	1.19E-04	2.31E-09	2.70.E+03	1.49E-05	4.09E-10
v10000	6.44E+04	3.69E-05	5.79E-10	6.18.E+03	6.72.E-06	1.42.E-10
v6902	6.83E+04	1.72E-04	2.72E-09	1.93E+04	4.49E-05	1.43E-09
v6903	7.10E+04	1.71E-04	2.75E-09	3.60E+04	3.96E-06	1.34E-09
v6717	1.50E+05	5.33E-04	4.45E-09	1.28E+05	2.54E-04	2.11E-09

【0468】

実施例39：HER2+腫瘍細胞への結合に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果

次の実験を、種々の分子形式(例えば、v6717ではscFv-scFv IgG1; v6903およびv6902ではFab-Fab IgG1; v5019、v7091、およびv10000ではFab-scFv IgG1)を有する例示的な抗HER2ECD2xECD4二重パラトピック抗体の細胞全体結合特性(Bmaxおよび見掛けKD)を比較するために行った。

【0469】

実験を、実施例6において記載したとおりに行った。結果を、図41および表35~38において示す。図41Aおよび表35は、BT474 HER2³+乳房腫瘍細胞系への例示的な二重パラトピック抗体のFACS結合結果を示している。結果は、すべての抗HER2抗体が、単一特異性二価抗HER2抗体v506と比較した場合に高いBmax(1.5~1.7倍高い)を有することを示している。Fab-scFv(v5019、v7091、およびv10000)およびFab-Fab(v6903)形式は、v506と比較して、約1.7倍増大したBmaxを有し、scFv-scFv形式(v67

17) は、1.5倍増大したBmaxを有した。v506およびv4184のFSAの等モルの組み合わせは、Bmaxにおいて1.7倍の増大をもたらした。例示的な抗HER2二重パラトピック抗体の見掛けKDは、単一特異性v506と比較して約2~3倍高かった。

(表35) FACS結合BT-474

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	9.0	23536
v10000	16	39665
v506+ v4184	16	40320
v5019	21	39727
v7091	22	36718
v6717	30	36392
v6903	31	40321

10

20

【0470】

図41Bおよび表36は、JIMT-1 HER2²+乳房腫瘍細胞系へのFACS結合結果を示している。結果は、すべての抗HER2抗体が、単一特異性二価抗HER2抗体v506と比較した場合に、高いBmax(1.5~1.8倍高い)を有することを示している。v506と比較して、Fab-scFv(v7091およびv10000)およびFab-Fab(v6903)形式は、約1.7倍増大したBmaxを有し、scFv-scFv形式(v6717)は、1.5倍増大したBmaxを有し、Fab-scFv(v5019)およびFSAの組み合わせ(v506+v4184)は、1.8倍増大したBmaxを有した。例示的な抗HER2二重パラトピックFab-scFv抗体の見掛けKDは、単一特異性v506と比較して約2~4倍高く; Fab-Fab(v6903)およびscFv-scFv(v6717)のKDは、v506と比較して約8倍高かった。

30

(表36) FACS結合JIMT-1

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	3.5	2574
v10000	7.6	4435
v506+ v4184	8.0	4617
v5019	12	4690
v7091	14	4456
v6717	26	3769
v6903	28	4452

40

【0471】

図41Cおよび表37は、HER2¹+MCF7乳房腫瘍細胞系への例示的な二重

50

パラトピック抗体のFACS結合結果を示している。結果は、抗HER2抗体v10000およびFSAの組み合わせ(v506+v4184)が、単一特異性二価抗HER2抗体v506と比較して1.6倍高いBmaxを有することを示している。v506と比較して、Fab-scFv(v5019、v7091)は、約1.4倍；scFv-scFv形式(v6717)は、1.3倍、かつFab-Fab形式(v6903)は、1.2倍増大したBmaxを有した。例示的な抗HER2二重パラトピックFab-scFv、Fab-Fab(v6903)、およびFSAの組合せ(v506+v4184)の見掛けKDは、v506と比較して約2~3分の1であったが；scFv-scFv(v6717)のKDは、v506と比較して約3倍高かった。

(表37) FACS結合MCF7

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506+ v4184	4.5	1410
v7091	6.1	1216
v5019	6.3	1201
v10000	6.8	1381
v6903	7.1	1105
v506	12	889
v6717	32	1167

10

20

【0472】

図41Dおよび表38は、HER2 0/1+ MDA-MB-231乳房腫瘍細胞系への例示的な二重パラトピック抗体のFACS結合結果を示している。結果は、例示的な二重パラトピック抗HER2抗体が、単一特異性二価抗HER2抗体v506と比較して約1.3~1.4倍増大したBmaxを有したことを示している。FSAの組み合わせ(v506+v4184)は、1.7倍増大したBmaxを有した。例示的な抗HER2二重パラトピックFab-scFv抗体(v5019、v7091、v10000)およびFSAの組み合わせ(v506+v4184)の見掛けKDは、v506と比較してほぼ同等のKDを有し；Fab-Fab(v6903)およびscFv-scFv(v6717)は、v506と比較してそれぞれ約4および16倍高いKDであった。

30

(表38) FACS結合MDA-MB-231

抗体変異体	K _D (nM)	Bmax
v506	4.8	395
v10000	5.6	558
v506+ v4184	7.3	662
v7091	7.9	525
v5019	8.7	548
v6903	17	534
v6717	77	524

40

【0473】

腫瘍細胞結合結果は、種々の分子形式を有する抗HER2二重パラトピック抗体が、H

50

HER2 3+、2+、1+、および0/1+腫瘍細胞に対して、二価単一特異性抗HER2抗体と比較して増大したBmaxを有することを示している。種々の抗HER2二重パラトピック抗体のうち、scFv-scFv形式は、HER2 3+、2+、1+、および0/1+腫瘍細胞に対して、v506と比較して、最も低いBmaxの増大を有した。これらの結果はまた、scFv-scFvおよびFab-Fab形式が、HER2 3+、2+、1+、および0/1+腫瘍細胞に対して、単一特異性v506（3~16倍の上昇）および二重パラトピックFab-scFv形式（約2倍以上）と比較して、KDの最大の増大を有することを示している。KDの増大は、積極的な結合の低減の指標であり、種々の二重パラトピック形式が、細胞表面上のHER2への結合について特有の機構を有することを示唆している。

10

【0474】

実施例40：HER2+細胞における内部移行に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果

様々なレベルでHER2を発現するHER2+細胞において内部移行する、種々の分子形式（例えば、v6717ではscFv-scFv IgG1；v6903およびv6902ではFab-Fab IgG1；v5019、v7091、およびv10000ではFab-scFv IgG1）を有する例示的な抗HER2 ECD2×ECD4二重パラトピック抗体の能力を比較するために、次の実験を行った。

【0475】

実施例9において詳述したとおりに、実験を行った。結果を図42および表39~41において示す。図42Aおよび表39は、HER2 3+ BT-474における内部移行結果を示している。これらの結果は、Fab-scFv形式（v10000）およびFSAの組み合わせ（v506+v4184）が、単一特異性抗HER2 v506と比較して2.2倍多い量の細胞内抗体を有していることを示している。v506と比較して、scFv-scFv形式（v6717）は1.9倍多い量；Fab-scFv形式（v5019およびv7091）は1.5~1.7倍多い量；かつFab-Fab形式（v6902およびv6903）は1.2~1.3倍多い量の細胞内抗体蓄積を有した。（表39）内部移行BT-474

20

抗体変異体	表面4°C	表面37°C	内部37°C
v506	2156	1590	3453
v6902	2407	2077	4035
v6903	2717	986	4573
v7091	2759	2227	5111
v5019	2867	2675	5710
v6717	2006	1212	6498
v10000	3355	2851	7528
v506+v4184	3998	2326	7569

30

40

【0476】

図42Bおよび表40は、HER2 2+ JIMT-1における内部移行結果を示している。これらの結果は、Fab-scFv形式（v10000）およびFSAの組み合わせ（v506+v4184）が、単一特異性抗HER2 v506と比較して、それぞれ1.8倍および1.9倍多い量の細胞内抗体を有することを示している。v506と比較して、scFv-scFv（v6717）およびFab-scFv形式（v5019）は1.4倍多い量；Fab-scFv（v7091）およびFab-Fab形式（v6902およびv6903）は1.2倍多い量の細胞内抗体蓄積を有する。

50

(表40) 内部移行 J I M T - 1

抗体変異体	表面		
	表面 4°C	37°C	内部 37°C
v506	337	-7.1	759
v6902	389	152	926
v7091	426	102	935
v6903	392	130	945
v5019	437	5.2	1035
v6717	247	31	1082
v10000	474	103	1375
v506 + v4184	583	89	1449

10

【0477】

図42Cおよび表41は、HER2¹⁺ MCF7における内部移行結果を示している。これらの結果は、scFv-scFv形式およびFab-scFv形式が、単一特異性抗HER2 v506と比較して3.0および2.8倍多い量の細胞内抗体を有することを示している。v506と比較して、Fab-scFv形式(v10000)およびFSAの組み合わせ(v506+v4184)は約2.0倍；Fab-scFv(v7091)およびFab-Fab(v6903)形式は1.8倍多い量の細胞内抗体蓄積を有する。

20

(表41) 内部移行 MCF7

抗体変異体	表面 4°C	表面	
		37°C	内部 37°C
v506	48	10	48
v7091	77	27	87
v6903	81	35	89
v10000	78	20	96
v506 + v4184	87	19	103
v5019	81	17	134
v6717	48	31	145

30

【0478】

これらの結果は、抗原結合性ドメインの構造および形式に関して異なる種々の分子形式を有する抗HER2二重パラトピック抗体が、HER2³⁺、²⁺、および¹⁺腫瘍細胞において、特有の程度の内部移行を有することを示している。一般に、v506およびv4184の単一特異性FSAの組み合わせ、Fab-scFv(v10000、v7091、およびv5019)およびscFv-scFv(v6717)二重パラトピック形式は、HER2³⁺、²⁺、および¹⁺腫瘍細胞において比較的高い内部移行値を有した。それに対して、Fab-Fab二重パラトピック形式(v6902およびv6903)は、HER2³⁺、²⁺、および¹⁺腫瘍細胞において、最も低い内部移行値を有した。これらのデータは、抗原結合性ドメインの分子形式および幾何学的スペーシングが、HER2受容体を架橋し、引き続いて、HER2+腫瘍細胞に内部移行する二重パラトピ

40

50

ック抗体の能力に対して影響を有することを示唆している。2つの抗原結合性ドメインの間の距離が最大であるFab-Fab二重パラトピック形式は、最も低い内部移行程度をもたらしたが、抗原結合性ドメインの間の距離がより短いFab-scFvおよびscFv-scFv形式は、HER2+細胞においてより多い内部移行を有した。これは、Jost et al 2013, Structure 21, 1979-1991)において記載されたとおりの効力および比較的短いリンカー長さの相関と一致している。

【0479】

実施例41: HER2+細胞におけるADCCに対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果

HER2を様々なレベルで発現するHER2+細胞においてADCCを媒介する、種々の分子形式を有する例示的な抗HER2 ECD2×ECD4二重パラトピック抗体(例えば、v6717ではscFv-scFv IgG1; v6903およびv6902ではFab-Fab IgG1; v5019、v7091、およびv10000ではFab-scFv IgG1)の能力を比較するために、次の実験を行った。

【0480】

ADCCアッセイを行う前に、N-連結グリコペプチドにおけるフコース含有率を定量化するために、グリコペプチド分析を抗体試料で行った。実施例23において記載したとおりに、方法を行った。結果を表42において示す; データは、例示的な二重パラトピック変異体v5019、v6717、v6903が、N-連結グリカンにおいて同等のフコース含有率(91~93%)を有することを示している。ADCCアッセイ結果を解釈する際にフコース含有率を正規化するために、N-グリカン中に同等レベルのフコースを有する抗体試料をADCCアッセイのために選択した。

(表42) LC-MSトリプシンペプチド分析

変異体	フコースを伴って観察されたグリコペプチドのパーセンテージ	フコースを伴わずに観察されたグリコペプチドのパーセンテージ
v6903	90.7	9.3
v6717	92.8	7.2
v5019	91.3	8.7

【0481】

NK-92エフェクター細胞を用いて5:1のE/Tで実施例11において記載したとおりに、ADCC実験を行った。ADCC結果を、図43および表43~45において示す。図43Aおよび表43は、HER2²⁺JIMT-1乳房腫瘍細胞におけるADCC結果を示している。これらのデータは、v5019、v6717、およびv6903が同様のレベルの最大細胞溶解を誘発すること、およびHER2²⁺腫瘍細胞がターゲットである場合、scFv-scFv形式(v6717)が、v5019およびv6903と比較して低い効力を有することを示している。

(表43) JIMT-1 ADCC

抗体変異体	EC50 (nM)	最大細胞溶解%
v6903	約0.03	48
v5019	約0.16	47
v6717	約0.72	51

【0482】

図43Bおよび表44は、HER2¹⁺ MCF7乳房腫瘍細胞におけるADCC結果を示している。これらのデータは、v5019およびv6717が、v6903(24%)と比較してやや高い最大細胞溶解(27~30%)を有することを示している。これらのデータはまた、v6717が最も効力が低く、より低いEC₅₀値を有するv6903およびv5019が続くことを示している。

(表44) MCF7 ADCC

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)	最大細胞溶解%
v5019	約0.69	27
v6717	109	30
v6903	0.94	24

10

【0483】

図43Cおよび表45は、HER2^{0/1+} MDA-MB-231乳房腫瘍細胞におけるADCC結果を示している。これらのデータは、v5019がv6903(62%)およびv6717(63%)と比較してやや高い最大細胞溶解(77%)を示すことを示している。これらのデータはまた、v6717が、効力が最も低く、より低いEC₅₀値を有するv6903およびv5019が続くことを示している。

20

(表45) MDA-MB-231 ADCC

抗体変異体	EC ₅₀ (nM)	最大細胞溶解% (トップのみ)
v5019	0.20	71
v6717	10	63
v6903	0.79	62

【0484】

これらのデータは、例示的な抗HER2 ECD2×ECD4二重パラトピック抗体がHER2²⁺および1⁺腫瘍細胞において、ADCCによる同様のレベルの最大細胞溶解を誘発することを示している。最大細胞溶解における類似性にもかかわらず、これらのデータはまた、種々の分子形式が特有のADCC効力を有することを示している。scFv-scFvは、HER2²⁺およびHER2¹⁺において効力が最も低かった(最大のEC₅₀値)。これら3つの形式での効力の差が、HER2¹⁺細胞をターゲットとするADCCデータにおいて見られ、EC₅₀値は、v6717 > v6903 > v5019であった。これらのデータは、実施例40(FACS結合)において示された観察と一致し、K_Dの増大(親和性の低下)が、Fab-FabおよびscFv-scFv形式で見られた。

30

40

【0485】

実施例42: HER2⁺腫瘍細胞の増殖に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果

基礎増殖か、またはリガンド刺激されたHER2³⁺、2⁺、および1⁺腫瘍細胞の増殖に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を比較するために、次の実験を行った。基礎増殖は、実施例15において記載したとおりに測定し、リガンド刺激増殖は、実施例27において記載したとおりに測定した。両方の種類の実験において、増殖を、対照処理に対する生存%として測定した。

【0486】

図44および表46は、外因性増殖刺激リガンド(EGFおよびHRG)の存在下での

50

HER2 3 + 乳癌細胞 (BT - 474) の増殖に対する例示的な抗HER2 ECD2 × ECD4 二重パラトピック抗体の効果を示している。EGFまたはHRGの不在下では、抗HER2二重パラトピック抗体は、BT - 474細胞の増殖を阻害することができ、各処理群の生存率は、次のとおりにランキングされた：v6903 < v506 + v4184 < 506 < v7091 < v5019 < v10000 < v6717。HRGの存在下では、偽対照に対する増殖阻害は、v506 + v4184のFSAの組み合わせでのみ達成された。EGFの存在下では、偽対照に対する増殖阻害が達成され、各処理群の生存率は、次のとおりにランキングされた：v6903 < v506 + v4184 < 7091 < v10000 < 5019。

(表46)

処理	生存%		
	抗体のみ	+HRG	+EGF
偽	100	143	131
v6717	113	126	129
v10000	70	118	78
v5019	67	133	81
v7091	61	119	61
v506	53	141	118
v506 + v4184	43	89	45
v6903	32	120	39

【0487】

図45は、SKBR3 HER2 3 + 細胞系の増殖阻害に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の用量依存性効果を示している。データは、図44において示されている結果と一致し、二重パラトピック形式の効力/有効性の順位序列は、HER2 3 + 腫瘍細胞では、Fab - Fab > Fab - scFv > scFv - scFvのとおりである。

【0488】

HER2 + 細胞の生存に対する抗HER2二重パラトピック抗体形式の効果を図46において示し、この際、図46Aは、300 nMでのトラスツズマブ感受性SKOV3 HER2 2 + / 3 + 細胞系における結果を示しており；図46Bは、300 nMでのJIMT - 1 HER2 2 + (トラスツズマブ抵抗性) 細胞における結果を示しており、図46Cは、300 nMでのMCF7 HER2 1 + 細胞系における結果を示している。SKOV3細胞系では、増殖阻害の規模において、二重パラトピック形式のうちでわずかな差異しか観察されず、JIMT - 1およびMCF7細胞では、いずれの試験抗体によっても、増殖阻害は観察されなかった。

【0489】

図44および図45におけるデータは、Fab - scFvおよびFab - Fab形式を有する抗HER2 ECD2 × ECD4二重パラトピック抗体 (v5019、v7091、v10000、v6903) が、EGFまたはHRGの不在下、および存在下で、HER2 3 + 腫瘍細胞を増殖阻害し得ることを示している。HER2 3 + 細胞系BT - 474およびSKBR3では、偽対照に対する増殖阻害は、次のとおりに順位序列された：v506 + v4184 > v6903 > v7091 > v10000 > v5019 > v506 > v6717。抗原結合性ドメイン間の距離 (Fab - Fab > Fab - scFv > scFv - scFv) が、HER2 3 + 腫瘍細胞における増殖阻害の順位序列と相関する。トラスツズマブ感受性腫瘍細胞BT - 474およびSKBR3におけるデータに基づき、

10

20

30

40

50

形式による増殖阻害の差違は、HER2 3+レベルにおいては有意であるが、HER2 2+またはHER2 1+レベルではそれほど有意ではないと予測され得る。

【0490】

実施例43： 様々な抗体捕捉レベルでのHER2結合親和性および反応速度の評価

SPRによって、様々な表面密度で捕捉された場合の例示的な抗HER2 ECD2×ECD4二重パラトピック抗体のHER2結合反応速度(k_d 、オフ速度)を比較するために、次の実験を行った。オフ速度が低下する(ゆっくりになる)と、抗体捕捉レベル(表面密度)が上昇するという相関が、トランス結合(すなわち、実施例12において記載されている、2個のHER2分子への1個の抗体分子結合)の指標である。この実験において、Fab-Fab形式(v6903)をFab-scFv形式(v7091)と比較して、変異体内で、トランス結合における潜在的な差異を決定した。抗原結合性ドメイン間の比較的広い空間的距離に起因して、Fab-Fab形式はシス結合し得る(1個のHER2分子上のECD2および4を連結する)のに対して; Fab-scFvは、その抗原結合性ドメイン間の比較的短い距離に起因して、シス結合し得ないであろうと仮定される。抗HER2単一特異性v506が、対照として含まれた。

10

【0491】

実験を、実施例12において記載したとおりにSPRによって行った。データを図47において示す。図47Aは、v6903およびv7091の種々の抗体捕捉レベルでの k_d (1/s)のプロットおよび線形回帰分析を示している。v7091およびv6093は両方とも、表面捕捉レベルの上昇につれてオフ速度が低下する傾向を示しているが; しかしながら、この相関は、Fab-scFv変異体(v7091; P値=0.023)では有意であるが、Fab-Fab形式(v6093; P値=0.053)では有意ではない。オフ速度は、抗HER2単一特異性対照v506では様々な抗体捕捉レベルで、変化しないままであった。

20

【0492】

図47Bは、v6903およびv7091の種々の抗体捕捉レベルでの K_D (M)のプロットおよび線形回帰分析を示している。オフ速度比較と同様に、v7091およびv6093は両方とも、表面捕捉レベルの上昇につれて親和性が増大する傾向を示している(より低い K_D 値)。しかしながら、この相関は、Fab-scFv変異体(v7091; P値=0.04)では有意であるが、Fab-Fab形式(v6093; P値=0.51)では有意ではない。 K_D は、抗HER2単一特異性対照v506では様々な抗体捕捉レベルで、変化しないままであった。図47におけるデータは、Fab-FabおよびFab-scFv抗HER2二重パラトピック抗体形式が、抗体表面捕捉レベルの上昇につれてオフ速度が低下する傾向を示すことを示しており; これらの傾向は、単一特異性抗Her2抗体と比較して特有である。

30

【0493】

実施例44： ペルツズマブFabの親和性および安定性の操作

表1において示したとおり、1種の変異体(v10000)は、ペルツズマブFabにおいて変異を含む。このFabは、in silicoでの尽力による親和性および安定性の操作に由来し、一価またはワンアーム(One-Armed)抗体(OAA)として実験的に測定された。

40

【0494】

変異体9996: HER2結合性ドメインが、VL領域にY96Aを有し、かつVH領域にT30A/A49G/L69F(Kabat付番)を有する鎖A上の、ペルツズマブから誘導されたFabであり、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異(EU付番)を有し、鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異(EU付番)を有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域がC226Sの変異を有し; 抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する一価抗HER2抗体。

【0495】

50

変異体10014: HER2結合性ドメインが、VL領域にY96Aを有し、かつVH領域にT30A(Kabat付番)を有する鎖A上の、ペルツズマブから誘導されたFabであり、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異(EU付番)を有し、鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異(EU付番)を有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域がC226Sの変異を有し;抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する一価抗HER2抗体。

【0496】

変異体10013: HER2結合性ドメインが、鎖A上の、野生型ペルツズマブから誘導されたFabであり、Fc領域が、鎖AにT350V__L351Y__F405A__Y407Vの変異(EU付番)を有し、鎖BにT350V__T366L__K392L__T394Wの変異(EU付番)を有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域がC226Sの変異を有し;抗原結合性ドメインがHER2のドメイン4に結合する一価抗HER2抗体。

10

【0497】

次の実験を、操作されたペルツズマブ変異体のHER2結合親和性および安定性を比較するために行った。

【0498】

OAA変異体を、実施例1において記載したとおりにクローニングし、発現させた。

【0499】

OAAを、実施例1において記載したとおりにプロテインAクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

20

【0500】

ヘテロ二量体純度(すなわち、ヘテロ二量体Fcを含むOAAの量)を、Caliper LabChip GXII(Perkin Elmer #760499)を使用する非還元型ハイスループットタンパク質発現アッセイによって評価した。HT Protein Express LabChip User Guide version 2 LabChip GXII User Manualに従って、ただし、次の変更を加えて、手順を実施した。2 μ lまたは5 μ l(濃度範囲は5~2000ng/ μ l)のいずれでも、ヘテロ二量体試料を、96ウェルプレート(BioRad #HSP9601)の別々のウェルに、HT Protein Express Sample Buffer 7 μ l(Perkin Elmer #760328)と共に添加した。次いで、ヘテロ二量体試料を、70 $^{\circ}$ Cで15分間にわたって変性した。LabChip機器を、HT Protein Express Chip(Perkin Elmer #760499)およびAb-200アッセイ設定を使用して操作する。使用後に、チップをMilliQ水で洗浄し、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

30

【0501】

実施例24において示したプロトコルでDSCによって決定されるとおりに融解温度またはT_mを測定することによって、試料の安定性を評価した。DSCを、SEC精製の前後に測定した。

【0502】

40

試料のHER2ECDに対する親和性を、実施例12によるプロトコルに従ってSPRによって測定した。SPRを、SEC精製の前後に測定した。表47Aおよび47Bにおいてまとめるとおり、可変ドメインにおける変異は、野生型安定性を維持しつつ、野生型ペルツズマブと比較して、FabのHER2親和性を増大させている。(¹ Caliper LabChipによって決定された純度; ² KD(野生型)/KD(変異体)(表47A)

OAA 変異体	Fab HC 変異	LC 変異	プロテインA 収量 (mg/L)	SEC前のSPR				SEC後の Het 純度 ¹	SEC後のSPR			
				KD 平均 (nM)	KD 標準偏差 (nM)	n	野生型に 対する 倍数 ²		KD 平均 (nM)	KD 標準偏差 (nM)	n	野生型に 対する 倍数
v9996	T30A/A49G /L69F	Y96A	22	1.7E-09	1.7E-10	5	9.6	93%	1.8E-09	1.6E-11	2	8.4
v10014	T30A	Y96A	20	2.0E-09	3.1E-10	4	8.1	81%	2.1E-09	5.2E-10	3	7.0
v10013	WT	WT	18	1.6E-08	5.1E-09	16	1.0	91%	1.5E-08	3.5E-09	4	1.0

(表 4 7 B)

OAA 変異体	SEC前のDSC		SEC後のDSC	
	Tm (C)	野生型に 対する ΔT_m (C)	Tm (C)	野生型に 対する ΔT_m (C)
v9996	77.2	-0.2	77.2	-0.7
v10014	75.5	-1.9	75.5	-2.4
v10013	77.4	0.0	77.9	0.0

10

【 0 5 0 3 】

実施例において使用した試薬は一般に、市販されているか、または当技術分野で公知の市販の計器、方法、または試薬を使用して調製することができる。上述の実施例は、本明細書に記載の様々な態様および本明細書に記載の方法の実行を例示している。これらの実施例は、本発明の多くの種々の実施形態の包括的な記載を提供することを意図したものではない。したがって、前述の発明は、理解を明瞭にすることを目的として実例および実施例によって多少詳細に記載されているが、当業者であれば、添付の請求の範囲に記載の意図および範囲から逸脱することなく、本明細書に多くの変化および変更を成すことができることを容易に了解するであろう。

20

【 0 5 0 4 】

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に、参照によって本明細書に組み込まれると示されている場合と同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。

【 0 5 0 5 】

配列の表

30

変異体	H1 クローン名	H2 クローン名	L1 クローン名	L2 クローン名
792	1011	1015	-2	-2
5019	3057	720	1811	NA
5020	719	3041	NA	1811
7091	3057	5244	1811	NA
10000	6586	5244	3382	NA
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	NA	NA
1040	4560	4553	NA	4561
630	719	716	NA	NA
4182	4560	3057	NA	1811
506	642	642	-2	-2
4184	3057	3041	1811	1811
9996	4372	6586	NA	3382

10

20

SEQ ID NO.	クローン	説明	配列(アミノ酸または)
1	642	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	642	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATAACCCGGTATGCGGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGACCGT

30

40

			GAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGACAGTGCCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAAC GTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTITTCGCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCTAGTATGATTTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTC CTGTATCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAAGTAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
3	642	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWRVQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRaedTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
4	642	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGGCG CGCTTCAGGATTCACATCAAGGACACCTACATTCCTGGTGCAGCAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGCCGAAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTGTGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGCAGTGTGCTCC
5	642	H1	GFNIKDITY
6	642	H1	GGATTCACATCAAGGACACCTAC
7	642	H3	SRWGGDGFYAMDY
8	642	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
9	642	H2	IYPTNGYT
10	642	H2	ATCTATCCCCTAATGGATACACC
11	642	CH1	ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
12	642	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
13	642	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
14	642	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
15	642	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSPFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
16	642	CH3	GGCCAGCAAGGAGCCCCAGGTGACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCTAGTATGATTTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTA CAAGACCACCTCCAGTGTGACAGCGATGGCAGCTTCTCTCTGTATTC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTTAGTTGTTTCAAGTATGATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGACCTGTCCCTGTCTCCCGGC
17	3468	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWRVQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRaedTAVVYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLKSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

10

20

30

40

			NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRNQQGNVFSQSVMHREALHNHTQKSLSLSPG
18	3468	全長	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGGCCGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCCTGGAGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCTGTCACTGGACCGGAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTACTATTGGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGACAGGAACTC TGGTACCGGTGAGCTCCGCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCT TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCTGCACTGCTGAAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTCTGTGGTACCGTGCACAGTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAAGTGGAAACCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCTTGTCTGACCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAGTCAATGCGTGGTGGAGCGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGTGTCAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGAAGTGAAGTGAAGTCTGCCCCGACCTATCGAGAAAAACAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTGAGCCTGTGTGTGTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCACTCATGCA CGAGGCCTGCACAACCAATACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
19	3468	VH	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLLEWVADVNPNSGGSIYQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMSLRAEDTAVVYCARNLGSPFYFDYWGQGLVTVSS
20	3468	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGGCCGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCCTGGAGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCTGTCACTGGACCGGAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTACTATTGGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGACAGGAACTC TGGTACCGGTGAGCTCC
21	3468	H1	GFTFTDYT
22	3468	H1	GGTTCACTTTTACCGACTACACC
23	3468	H3	ARNLGPSFYFDY
24	3468	H3	GCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
25	3468	H2	VNPNSGGS
26	3468	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
27	3468	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
28	3468	CH1	GCCTCCCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCTGCACTGCTGAAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCAACCGTCCCAAGTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
29	3468	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
30	3468	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCAGAAGTCAATGCGTGGTGGAGCGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTGTGTCAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG

10

20

30

40

			CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAAAATTTCCAAGGCAAAA
31	3468	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	3468	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTAGTTGTTTCTGATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACCAGGG
33	1811	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFLTISSSLQPEDFATYYCQQYIYIPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
34	1811	全長	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCACAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCAGCCAGCGTGGTCTGTCTGTGCTG AACAAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCTCTCTCT GTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
35	1811	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFLTISSSLQPEDFATYYCQQYIYIPYTFGQGTKEIK
36	1811	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCACAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
37	1811	L1	QDVSIG
38	1811	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
39	1811	L3	QQYIYIPYT
40	1811	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCATATACC
41	1811	L2	SAS
42	1811	L2	AGCGCCTCC
43	1811	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLS SSTLTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	1811	CL	AGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACA TCAGGGGCTGTCTCTCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
45	5034	全長	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLTSLKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
46	5034	全長	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGT GGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGTGTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGGCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCAGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA

10

20

30

40

			TCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGCA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCACCTTGACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTC ACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCAACCAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
47	5034	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHTPPPTFGQGTKVEIK
48	5034	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
49	5034	L1	QDVNTA
50	5034	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
51	5034	L3	QQHYHTPPPT
52	5034	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCTACT
53	5034	L2	SAS
54	5034	L2	AGTGCATCA
55	5034	CL	RTVAAPSVFIFPPSDERLKSQTASVTVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	5034	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGCAACAAG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCTTGACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACACA TCAGGGGCTGTCATCACCAGTCAACCAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
57	5037	全長	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHTPPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDERLKSQ TASVTVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDYSLSRLTSLKADYKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
58	5037	全長	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGT GGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTCCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCCTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGCA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCAGACTGACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTC ACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCAACCAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
59	5037	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHTPPPTFGQGTKVEIK
60	5037	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
61	5037	L1	QDVNTA
62	5037	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
63	5037	L3	QQHYHTPPPT
64	5037	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCTACT

10

20

30

40

65	5037	L2	SAS
66	5037	L2	AGTGCATCA
67	5037	CL	RTVAAPSVFIFPPSDERLKSQTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSYSTLS SSRLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	5037	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGACACAACG CTCTGCAGAGTGGCAAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTACACACA TCAGGGGCTGTCTATCACAGTCAACAAATCATCAATCGGGGGGAGTGC
69	3382	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAVYQKPKKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFRSGSGS TDFTLTISSLPEDFATYYCQYYIYPATFGQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
70	3382	全長	GATATTAGATGACCCAGTCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAAAGCACCACAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTACAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTTCAATTTTCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGTCTG AACAAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTACACATCAGGGGCTGTCTCTCTCT GTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
71	3382	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAVYQKPKKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFRSGSGS TDFTLTISSLPEDFATYYCQYYIYPATFGQGTQKVEIK
72	3382	VL	GATATTAGATGACCCAGTCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAAAGCACCACAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTACAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
73	3382	L1	QDVSIG
74	3382	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
75	3382	L3	QYYIYPAT
76	3382	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCAGCCACC
77	3382	L2	SAS
78	3382	L2	AGCGCCTCC
79	3382	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS SS'LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
80	3382	CL	AGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGCTTTCATTTTCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAGTGTATGCCTGCGAAGTACACACA TCAGGGGCTGTCTCTCTCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
81	5065	全長	EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFNIDKTYIHWRVQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSKDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTIS KAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVLDSGGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	5065	全長	GAGGTGCAGCTGGTCAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGC

10

20

30

40

			AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGCCCTGG AGTGGGTGGCAGCAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTCTGCAGATACAAGTAAAAAAGTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGAGCCGAAGATAAC AGCCGTGACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCAACAAAAGGGGCTAGCGTGTTCCTACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGGAACAGCAGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCAGAGCCCGTCACTGT GAGCTGGAACCTCCGGCCCTGCATCTGGGGTCCATACTTTTCTGTGTGTGCAGTCAAGCGGCC TGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCATCCAATACCAAAGTCGACAAGAAAGTGAAACCAAGTCTTGTGATAAAACACA TACTTGGCCCCCTTGTCTGCACCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTGTGTTTCCACCCAAAGC CTAAAGACACCCTGATGATTAGTAGGACTCCAGAAGTCACTCGCTGGTGTGGACGTTGAGCCACGAG GACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTGCACCCAGGACTGGTGA ACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCC AAGGCTAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAA GAACAGGTCACTGTGACATGTCTGGTAAAGGGTTCTATCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAAT CCAATGGACAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCC CTGGTGTAGTAAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGTTTCACTGAT GCACGAAGCACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGC
83	5065	VH	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
84	5065	VH	GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGC AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGCCCTGG AGTGGGTGGCAGCAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTCTGCAGATACAAGTAAAAAAGTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGAGCCGAAGATAAC AGCCGTGACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCC
85	5065	H1	GFNIKDTY
86	5065	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
87	5065	H3	SRWGGDGFYAMDY
88	5065	H3	AGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
89	5065	H2	IYPTNGYT
90	5065	H2	ATCTATCCAATAATGGATACACC
91	5065	CH1	ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPVLQSSGLYLSVV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
92	5065	CH1	GCATCAACAAAAGGGGCTAGCGTGTTCCTACTGGCCCCCTTAGTAAATCCACCTCTGGGGAAACAGC AGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCAGAGCCCGTCACTGTGAGCTGGAACCTCCGGCGCCC TGACATCTGGGGTCCATACTTTTCTGTGTGTGTGCAGTCAAGCGCCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCTGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACCAAAGTCGACAAGAAAGTG
93	5065	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
94	5065	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGAT TAGTAGGACTCCAGAAGTCACTGCGTGGTGTGAGCGTGAAGCCAGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTGCACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCTAAA
95	5065	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	5065	CH3	GGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGTCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGAC

10

20

30

40

			AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCCCTGGTGAGT AAGCTGACCGTCGATAAATCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGTGTTTCAGTGATGCACGAAGC ACTGCACAACCACTACACCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGC
97	6586	全長	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFADYTMQWVRQAPGKGLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHPTFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
98	6586	全長	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGGGGCCCTGGTGCAGCCCGGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTTCGAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTTCAGTGGACAGAAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCCTGAGGGCCGAAGATA CGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACCC TGGTGACAGTCACTCCGCTAGCACTAAGGGGCCCTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACCTCTGGAGGCACAGCTGCAGTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACAGTCAAGTGGAG TTGGAATCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGTGAGTCAAGCGGACTGT ACTCCCTGTCTCTGTGGTCAACCGTCCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATA CTGCCACCTTGTCCGGCCGAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCTA AAGACACCTGATGATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCGGA GGAAACAGTACAACCTACCTATAGAGTGTGAGTGTCTGACAGTGTGACACCAGGACTGGCTGAATG GGAAAGGAGTATAAGTGAAGTGAAGTGAAGCAAAAAGCCCTGCCCGCCCAATCGAAAAACAATCTCTAAA GCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAA TCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTA ACGGCCAGCCCGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTG GTGTCAAAGCTGACCGTCGATAAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGCTCCGTATGCA CGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
99	6586	VH	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFADYTMQWVRQAPGKGLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSS
100	6586	VH	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGGGGCCCTGGTGCAGCCCGGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTTCGAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTTCAGTGGACAGAAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCCTGAGGGCCGAAGATA CGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACCC TGGTGACAGTCACTCC
101	6586	H1	GFTFADYT
102	6586	H1	GGGTTCACTTTTCGAGACTACACA
103	6586	H3	ARNLGPSFYFDY
104	6586	H3	GCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTAT
105	6586	H2	VNPNSGGS
106	6586	H2	GTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGT
107	6586	CH1	ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHPTFAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
108	6586	CH1	GCTAGCACTAAGGGCCCTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGC TGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACAGTCAAGTCAAGTGGAGTTGGAATCAGGGGCTC TGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGTGAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTCAACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG

10

20

30

40

109	6586	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
110	6586	CH2	GCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTCCACCCCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGAT TTCCCGGACTCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCCAAGACCAACCCCGGAGGAACAGTACAACCTCT ACCTATAGAGTCTGAGTGTCTGACAGTGTGCACCCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTG TAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCAATCGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAA
111	6586	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
112	6586	CH3	GGACAGCCTCGCGAACACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAATCAGGT CTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAAACGCC AGCCCGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGGAGTTCGCTCTGGTGTCA AAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGCTCCGTATGCACGAAGC CCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
113	3904	全長	YPYDVPDYATGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEE LKSGTASVVCCLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDYSLSTLELSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
114	3904	全長	TATCCCTACGATGTGCTGACTACGCTACTGGCTCCGATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCT GAGTGCATCAGTGGGGACCGAGTCAACATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCCG CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCAAGCTGTGATCTACAGCGCCTCTACCCGGTATACT GGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGAACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCA GCCCGAGGATTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCCTTATACCTTTGGCCAGGGGA CAAAAGTGGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTCCCCCTTCCGACGAAGAG CTGAAAAGTGGAACTGCTTCAAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCGAAGCCAAAGTCA GTGGAAGGTGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAATCCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAG ATTCAACTTATAGCCTGTCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTAT GCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGGCTGTCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
115	3904	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK
116	3904	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGAGTGCATCAGTGGGGACCGAGTCAACATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCCAAGC TGCTGATCTACAGCGCCTCTACCCGGTATACTGGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCCGAGGATTTCCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCCTTATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
117	3904	L1	QDVSIG
118	3904	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
119	3904	L3	QYYIYPYT
120	3904	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCCTTATACC
121	3904	L2	SAS
122	3904	L2	AGCGCCTCC
123	3904	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVVCCLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDYSL SSTLELSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
124	3904	CL	AGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTCCCCCTTCCGACGAAGAGCTGAAAAGTGGAACTGC TTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTGCATAACG CTCTGCAGAGCGGCAATCCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAGATTCAACTTATAGCCTG TCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCTGCGAAGTCAACCA TCAGGGGCTGTCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
125	4553	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWRVQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN

10

20

30

40

			VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
126	4553	全長	GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGAAAAGCCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCAGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAAGCTCCGCATCTACAAAAGGGGCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGGAAACAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCCAGAGCCCGTCACTGT GAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACATCCGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGTGTCAGTCAAGCGGCC TGTAATCACAGCCCAAGCAATACAAAAGTTCGACAAGAAAGTGAACCCCAAGAGCTGTGATAAAACACA TACTTGGCCCCCTTGTCTGCACAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTGTTCCACCCAAAGC CTAAAGACACCCCTGATGATTTCCAGGACTCCAGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGAACAGTACAACCTCAACTTATCGCGTCGTGAGCGTCTGACCGTGTGACACAGGACTGGCTGA ACGGCAAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTGAAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACATTAGC AAGGCCAAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAA GAACAGGTCTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTTACCCAGTGTATCGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCTGAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCT CTGGTCTCCAAGCTGACTGTGGATAAACTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGTGTTCAGTGAT GCATGAGGCACTGCACAATCATACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
127	4553	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPNIKDTHHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTLTVSS
128	4553	VH	GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGAAAAGCCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCAGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAAGCTCC
129	4553	H1	GFNIKDTY
130	4553	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
131	4553	H3	SRWGGDGFYAMDY
132	4553	H3	AGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
133	4553	H2	IYPTNGYT
134	4553	H2	ATCTATCCAACCTAATGGATACACC
135	4553	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKVV
136	4553	CH1	GCATCTCAAAGGGGCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGAAACAGC AGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCAGAGCCCGTCACTGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCC TGACATCCGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGCCCTGTACTCTCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAAGTTCAAGCCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
137	4553	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
138	4553	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAGCCTAAAGACACCTGATGAT TTCCAGGACTCCAGAAGTCAACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACAGGACCCCGAAGTCAAGTTC ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGAGGAACAGTACAACCTCA ACTTATCGCGTCGTGAGCGTCTGACCGTGTGCACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG

10

20

30

40

			CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCCAAA
139	4553	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
140	4553	CH3	GGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTTTACCCAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCTGAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCTCTGGTCTCC AAGCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAGGC ACTGCACAATCATTACACCAGAAGAGCTGTCCCTGTCTCCCGGC
141	716	全長	EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLI CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFS SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
142	716	全長	GAGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACC TAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTGACCT GCCTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAA GTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCTGAGCGTGT GACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGCCCTGC CTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGAGCCCGAGTGTACACTG CCACCCAGCAGAGACGAACCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCC TAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCCTCAG TGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAG GGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTC CCTGTCTCCCGGCAAA
143	716	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
144	716	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTC ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTC ACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
145	716	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLI CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
146	716	CH3	GGCCAGCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTGATATCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCTGTCCCTGTCTCCCGGC
147	719	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTLISSLPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGTKVEIKGGSGGSGGGSGGSGGSGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKLSL LSPGK
148	719	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAAACCCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAACCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGCATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGTGACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATAC

10

20

30

40

			TTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCGCACGTATTTATCCCAAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAAC ACCGGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTACCCTCTCCTCAGCCGCG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCT AGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGGAG TGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCTGTGAGCGTGTG ACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACATACC CACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGCACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACCTCCAGT GCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG GGAACGTGTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGCAA
149	719	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
150	719	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGC TCTGATCTATCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTCTGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTTCGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
151	719	L1	QDVNTA
152	719	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
153	719	L3	QQHYTTPPT
154	719	L3	CAACAGCATTACACTACCCACCCACT
155	719	L2	SAS
156	719	L2	TCTGCATCC
157	719	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRLEDTAIVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
158	719	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCACGTATTTATCCCAAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCGACGACTTCCAAGAACCACCGGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCAACCGTCTCCTCA
159	719	H1	GFNIKDTY
160	719	H1	GGATTCAACATTAAGATACTTAT
161	719	H3	SRWGGDGFYAMDY
162	719	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
163	719	H2	IYPTNGYT
164	719	H2	ATTTATCCCAAAATGGTTACACA
165	719	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
166	719	CH2	GCTCCAGAAGTCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
167	719	CH3	GQPREPQVYTPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDEEDGSFALVS

10

20

30

40

			KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNHYTQKSLSLSPG
168	719	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGACACATACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTAACAAGACCACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACTGTTTAGTTGTTTCACTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
169	720	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDVNTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNHYTQKSLSL LSPGK
170	720	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAAACCCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATAC TTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGACGTATTATCCCAAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAAC ACCGCGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCGCGG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCT AGCGTGTTCCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAA TGATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTTCGTGAGCGTGTG ACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTCAATAAGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGAGCCCCAGGTGTACACACTGC CACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGT GCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG GGAACTGTTTAGTTGTTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGGCAA
171	720	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVNTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK
172	720	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAAACCCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
173	720	L1	QDVNTA
174	720	L1	CAGGACGTTAAACCCGCT
175	720	L3	QQHYTTPPT
176	720	L3	CAACAGCATTACACTACCCACCCACT
177	720	L2	SAS
178	720	L2	TCTGCATCC
179	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS

10

20

30

40

180	720	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG AGTGGGTGCGACGTATTTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTTC ACCATCTCCGAGACACTTCCAAGAACACCGGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
181	720	H1	GFNIKDTY
182	720	H1	GGATTCAACATTAAGATACTTAT
183	720	H3	SRWGGDFYAMDY
184	720	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
185	720	H2	IYPTNGYT
186	720	H2	ATTTATCCCACAAATGGTTACACA
187	720	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
188	720	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
189	720	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
190	720	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAAACGTGTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGC
191	4561	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQHWKDNLQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
192	4561	全長	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAA GTGTCTTCATTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGTCTG AACAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTGCATAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAG CCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCCCTGACACTGA GCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCATCAGGGGCTGTCTTCTCCC GTGACCAAGTCTTTCAACCAGGCGAATGT
193	4561	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTQKVEIK
194	4561	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
195	4561	L1	QDVNTA
196	4561	L1	CAGGATGTGAACACCGCA
197	4561	L3	QQHYTTPPT

10

20

30

40

198	4561	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCTACT
199	4561	L2	SAS
200	4561	L2	AGTGCATCA
201	4561	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
202	4561	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAGATTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCA TCAGGGGCTGTCTTCTCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGAGGCGAATGT
203	3041	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVPLAPSSK TSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSKCDKHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK AKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
204	3041	全長	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACITTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGAAAAGGGCCCTGG AGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAGATAAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACTC TGGTACCCGTGAGCTCCGCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGT TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGTCCACACCTTTCTCTGAGTGTGCAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTCTGTGTTACCGTGCCAAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCAAGTCTTGTGATAAAAACCCATAC ATGCCCCCTTGTCTCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAAGCCTA AAGATACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGTGTGAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGCAAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACACAGGTGTACGTGCTGCCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTGAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCACTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCAATTAACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
205	3041	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSS
206	3041	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACITTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGAAAAGGGCCCTGG AGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAGATAAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACTC TGGTACCCGTGAGCTCC
207	3041	H1	GFTFTDYT
208	3041	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
209	3041	H3	ARNLGPSFYFDY
210	3041	H3	GCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
211	3041	H2	VNPNSGGSI
212	3041	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC

10

20

30

40

213	3041	CH1	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
214	3041	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTACAGTGTCTTGGAAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTCTGTCAGTGTGTCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
215	3041	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
216	3041	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCAGAAAGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTGGTGTGAGTCCGTCAGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAAAATTTCCAAGGCAAAA
217	3041	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
218	3041	CH3	GGACAGCTAGAGAACACAGGTGACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAAATGGCC AGCCTGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTAGTTGTTTCACTATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
219	3057	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCARNLGSPFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
220	3057	全長	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCCTGG AGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCACTGGACCGGAGCAAAAACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAGGATA TGCTGTGACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAATC TGCTCACCGTGAAGCTCCGCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCAAGTGT TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGTCCACACCTTTCTGTCAGTGTGTCAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTCTGTGGTCAACGTGCCAAGTTCAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAAGCCATCCAATACAAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCTTGTCTGCAACAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAAGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGGTGTGAGTCTGACAGTGTGTCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAAAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACACAGGTGTACGTGTATCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTGAGCCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGCCAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCCGCGCTG GTGAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCACTCATGCA CGAGGCACTGCAACCAATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
221	3057	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVVYCARNLGSPFYFDYWGQGLVTVSS
222	3057	VH	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCCTGG

10

20

30

40

			AGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCACTGGACCGGAGCAAAAACACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGACGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCC
223	3057	H1	GFTFTDYT
224	3057	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
225	3057	H3	ARNLGPSTFYFDY
226	3057	H3	GCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
227	3057	H2	VNPNSGGS
228	3057	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
229	3057	CH1	ASTKGPSTVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
230	3057	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCTTGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTCTGTCAGTGTGTCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
231	3057	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
232	3057	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCAGAAAGTCAACATGCGTGGTCTGAGCGTGAAGCCACGAGGACCCCAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCTGTCTGAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAAAATTTCCAAGGCAAAA
233	3057	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFSALVS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	3057	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCAAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAAATGGCC AGCCTGAGAACAAATTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCGCTGGTGAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTGTGTTTCTGATGACAGGAGC ACTGCACAACCATTACACCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
235	1011	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRLEDTAIVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSTVPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFSAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	1011	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGOGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCGATACATCCAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTAATAATTGCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAAGTCCCGCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTAATCATAAGCCCTCAAATACAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGAGCGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG

10

20

30

40

			AGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCC CTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTGTTCAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA
237	1011	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
238	1011	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCCGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCAGCAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCCGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGCCGAGGATAAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
239	1011	H1	GFNIKDTY
240	1011	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
241	1011	H3	SRWGGDGFYAMDY
242	1011	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
243	1011	H2	IYPTNGYT
244	1011	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
245	1011	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
246	1011	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGACACATTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
247	1011	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK
248	1011	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTC ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
249	1011	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG
250	1011	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTAACAAGACCACACTCCAGTGTGCTGGCAGCGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTAGTTGTTCACTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCGGC
251	4560	全長	EPKSSDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYVYV PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
252	4560	全長	GAACCTAAAAGCAGCGACAAGACCACACATGCCCCCTGTGCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACC AAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAACTCCCAGGTCACCT GCGTGGTGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCTACATATAGAGTGTGAGTGTCTCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC

10

20

30

40

			CTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAGGGCAGCCCAGGGAACTCAGGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCTATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAACGCTCTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAG TCTGTACCTGGCAA
253	4560	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
254	4560	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAACTCCCAGGTCACCTGCGTGGTCTGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGCGCTGAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCTCT ACATATAGAGTCTGAGTGTCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAA
255	4560	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
256	4560	CH3	GGGAGCCAGGGAACTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCACTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGC
257	3317	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASRYRGTVPSPRFGSGSG TDFLTLISSLPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSRLRSCAASGFTFTDYTMDWRQAPGKLEWVADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ MNSLRLEDTAIVYFCARNLGPSFYFDYWGQGTLLVTVSSAAEPKSSDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
258	3317	全長	GACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTCGGGACAGGGTGAATACACTG CAAGGCTTCACAGGATGTGACGATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCACCACAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACTGACTTTACTACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTCCGCCACATACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCTTATACTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATTAAGGGCGGAGGAGGCTCCCGAG GAGGAGGTCTGGAGGAGGAGGAAGTGAAGTCCAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGTCCTGAGGCTGTCTTGTCCGCTAGTGGCTTCACTTTTACAGACTACACAATGGATTGGGT GCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAATGGGTGCTGATGTGAACCCCTAATAGCGGAGGCTCCATCT ACAACCAGCGGTTCAAAGGACGGTTCACCCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAGAACAACCCCTGTATCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACTGCTGTGTACTATTGGCCAGGAATCTGGGCCAAAGCTTCTA CTTTGACTATTGGGGGACGGAACTGCTGCTCAAGCGCAGCCGAAACCCAAATCCTCTGATA AGACTCACACCTGCCACCTGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCA CCCAAGCCAAAAGACACTCFGATGATTTCTAGAACCCTGAAGTGACATGTGTGGTCTGTGGACGTCAG TCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCACCTGGTACGTTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCA AACCCGAGAGGAACAGTACAACCTCAACCTATCGGGTCTGTGAGCGTCTGACAGTGTGCATCAGGAC TGGCTGAACGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAAGCAACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGAC CATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCCCCGCAACCTCAGGTCTACGTTGATCTCTCAAGCCGAGATGAGC TGACAAAAAACAGGCTCTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGATTTTACCAAGTGACATCGCAGTGGAG TGGGAATCAAATGGCCAGCCGAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAG TTTCGCACTGGTCTCAAACCTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGCTTTTAGCTGTT CCGTGATGCACAGGCGCTGCACAATCATTACACACAGAAATCTCTGAGTCTGTACCTGGCAAAG
259	3317	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASRYRGTVPSPRFGSGSG TDFLTLISSLPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK
260	3317	VL	GACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTCGGGACAGGGTGAATACACTG CAAGGCTTCACAGGATGTGACGATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCACCACAAGC

10

20

30

40

			TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGCGTGCCATCCCCTTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACTGACTTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCCCGAGATTTCCGCACATACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCTTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATTAAG
261	3317	L1	QDVSIG
262	3317	L1	CAGGATGTCAGCATTGGC
263	3317	L3	QQYYIYPYT
264	3317	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCTTATACT
265	3317	L2	SAS
266	3317	L2	AGCGCCTCC
267	3317	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDVTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYICARNLGPSPFYFDYWGQGLVTVSS
268	3317	VH	GAGGTCCAGCTGGTGGAACTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGAGGCTGTCTTGTC CGCTAGTGGCTTACCTTTACAGACTACACAATGGATTGGGTGCGCCAGGCACCCAGGAAAGGGACTGG AATGGGTGCTGATGTGAACCCCTAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACAGCGGTTCAAAGGACGGTTC ACCCTGTGAGTGGACCGGAGCAAGAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATAC TGCTGTGACTATTGCCAGGAATCTGGGCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACAC TGGTCACTGTGTCAAGC
269	3317	H1	GFTFTDYT
270	3317	H1	GGCTTACCTTTACAGACTACACA
271	3317	H3	ARNLGPSPFYFDY
272	3317	H3	GCCAGGAATCTGGGCCAAGCTTCTACTTTGACTAT
273	3317	H2	VNPNSGGG
274	3317	H2	GTGAACCCCTAATAGCGGAGGCTCC
275	3317	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
276	3317	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCACCAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCTAGAACCCCTGAAGTGAATGTGTGGTCTGTGGACGTGAGTCAAGGAGCCCGAAGTCAAATTC ACTGGTACGTGGATGGCGTGCAGGTGCATAATGCCAAGACCAACCCCGAGAGGAACAGTACAACCTCA ACCTATCGGGTCTGAGCGTCTGACAGTGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAACAACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCTAAA
277	3317	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFSALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
278	3317	CH3	GGGCGACCCCGAACCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGAGATGAGCTGACAAAAACAGGT CTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTTTACCCAAGTGACATCGAGTGGAGTGGGAATCAAATGGCC AGCCCGAAAAAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCACTGGTCTCC AAACTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATTACACAGAAATCTCTGAGTCTGTACCTGGC
279	1015	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDVTMDWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYICSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
280	1015	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTCGAGCCGAGGATAAC CGCTGTGACTATTGCACTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA

10

20

30

40

			TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACTCAGGCGCCTGCACAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTCAAGTAAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAGGGAGCCCAAGGTGTACGTGTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCTAGTGTATTTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTC CTGTATCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTTAGTGTTCAGTGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTAACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
281	1015	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRaedTAVVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
282	1015	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGOGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTCGCAGCCGAGATAC CGCTGTGTACTATTGCACTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAAGCTCC
283	1015	H1	GFNIDTY
284	1015	H1	GGATTCACATCAAGGACACCTAC
285	1015	H3	SRWGGDGFYAMDY
286	1015	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
287	1015	H2	IYPTNGYT
288	1015	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
289	1015	CH1	ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHPTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
290	1015	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
291	1015	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
292	1015	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
293	1015	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG
294	1015	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGCTGTGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCTAGTGTATTTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGTGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGATATCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTTAGTGTTCAGTGTGATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
295	5244	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTLISSLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGG

10

20

30

40

			GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTTISADTSKN TAYLQMNLSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPPKDITLMIKSRTEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
296	5244	全長	GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCTGTATTCTGGCGTGCCAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATAACACACCCCCCTACATTCGGACAGGGCCTAAAGTGGAGATTAAGGGCGGGTCAAGCGGAGGGA GCGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGTCTGGAGGAGGAGTGGAGAGGTCCAGCTGGTGAATCTGGAGGA GGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTAAACATCAAAGACAC ATACATTCATTGGGTCAAGCAGGCACCCAGGGAAGGACTGGAATGGTGGCCCGCATCTATCCACAA ATGGGTACACTCGATATGCCGACAGCGTGAAAGGACGGTTTACCATTTCTGCTGATACAGTAAGAAC ACAGCATACTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCAGTCGATGGGG GGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACCGTGTCAAGCGCAGCCG AACCTAAATCCTCTGACAAGACCCACACATGCCACCCTGTCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCA TCCGTGTTCCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGATTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTG TGTGTCGTGGACGTGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCCGAGG TGATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCTGTAGCGTCTCTG ACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGCGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAACAAAGCCCTGCC CGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAACCCAGGTCTACGTGCTGC CCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCT AGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGGCAGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCGT GCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTCTGTATTCCAAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG GAAACGTCTTCACTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACCCAGAACTCTCTGAGT CTGTCAACCCGGC
297	5244	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTLISSLPEDFATYYCQHYHTTPTTFGQGTKVEIK
298	5244	VL	GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCTGTATTCTGGCGTGCCAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATAACACACCCCCCTACATTCGGACAGGGCCTAAAGTGGAGATTAAG
299	5244	L1	QDVNTA
300	5244	L1	CAGGATGTCAACACCGCT
301	5244	L3	QQHYTTPPT
302	5244	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCTACA
303	5244	L2	SAS
304	5244	L2	AGCGCTTCC
305	5244	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
306	5244	VH	GAGGTCCAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGC CGCTTCCGGCTTTAACATCAAAGACACATACATTGCGGTCAAGCAGGCACCCAGGGAAGGGACTGG AATGGGTGGCCCGCATCTATCCCAAAATGGGTACACTCGATATGCCGACAGCGTGAAGGACGGTTT ACCATTTCTGCTGATACAGTAAGAACACAGCATACTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATAC AGCCGTGACTATTGCACTGATGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGA CTCTGGTCAACCGTGTCAAGC
307	5244	H1	GFNIKDTY
308	5244	H1	GGCTTTAACATCAAAGACACATAC

10

20

30

40

309	5244	H3	SRWGGDGFYAMDY
310	5244	H3	AGTCGATGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTAT
311	5244	H2	IYPTNGYT
312	5244	H2	ATCTATCCCACAAATGGGTACT
313	5244	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQVNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
314	5244	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGCCGCACTCCCGAAGTCACTGTGTGGTCTGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCA ACCTATAGGGTCTGTGAGCGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAA
315	5244	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQGNVFSCSVMEALHNNHYTQKSLSLSPG
316	5244	CH3	GGGCAGCCACGGGAACCCAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACAGGT CTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAAATGGGC AGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTCTGTATATCC AAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATTACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCAACCCGGC
317	-2	全長	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
318	-2	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAAACCCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCCAGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTTCAGTGGCAGTCTGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCAACCTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
319	-2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
320	-2	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAAACCCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCCAGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTTCAGTGGCAGTCTGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCAACCTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
321	-2	L1	QDVNTA
322	-2	L1	CAGGACGTTAACCCGCT
323	-2	L3	QQHYTTPPT
324	-2	L3	CAACAGCATTACACTACCCCAACCT
325	-2	L2	SAS
326	-2	L2	TCTGCATCC
327	-2	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
328	-2	CL	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCAAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC

10

20

30

40

			AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
329	4372	全長	EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVL PPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSQCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
330	4372	全長	GAACCTAAATCCAGCGACAAGACCCACACATGCCCCCTTGTCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACC AAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAACTCCCGAGGTACCT GCGTGGTCTGAGCGTGTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAAACAGTACAACCTCTACATATAGAGTCGTGAGTGTCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAGGGCAGCCAGGAACTCAGGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGCTGGTAAAGGATTCTATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAAAGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACCCAGAAGTCTCTGAG TCTGTACCTGGC
331	4372	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
332	4372	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAACTCCCGAGGTACCTGCGTGGTCTGAGCGTGTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAAACAGTACAACCT ACATATAGAGTCGTGAGTGTCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAA
333	4372	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
334	4372	CH3	GGGCAGCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACAGGT CTCACTGCTGTGCTGGTAAAGGATTCTATCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGAAAAGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGC

10

20

SEQ ID NO:	ペルツズマブ WT CDR	配列
335	CDR-H2	VNPNSGGS
336	CDR-H3	ARNLGPSFYFDY
337	CDR-H1	GFTFTDYT
338	CDR-L2	SAS
339	CDR-L3	QQYYIYPYT
340	CDR-L1	QDVSIG

30

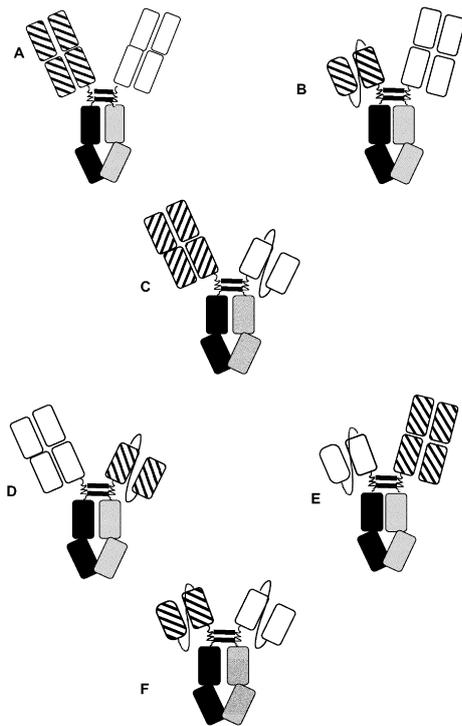
40

SEQ ID NO:	トラスツズマブ WT CDR	配列
341	CDR-H2	IYPTNGYT
342	CDR-H3	SRWGGDGFYAMDY
343	CDR-H1	GFNIKDTY
344	CDR-L2	SAS
345	CDR-L3	QQHYTTPPT
346	CDR-L1	QDVNTA

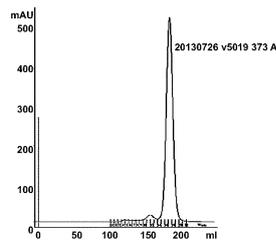
10

ペルツズマブ変異体 CDR - L3 : Q Q Y Y I Y P A T
 クローン 3 3 8 2、変異体 1 0 0 0 0 (S E Q I D N O : 3 4 7)
 ペルツズマブ変異体 CDR - H1 : G F T F A D Y T
 クローン 6 5 8 6、変異体 1 0 0 0 0 (S E Q I D N O : 3 4 8)

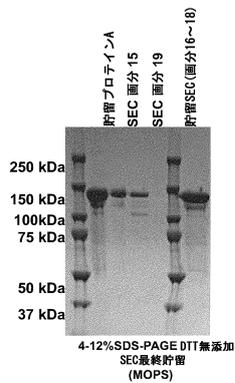
【図 1】



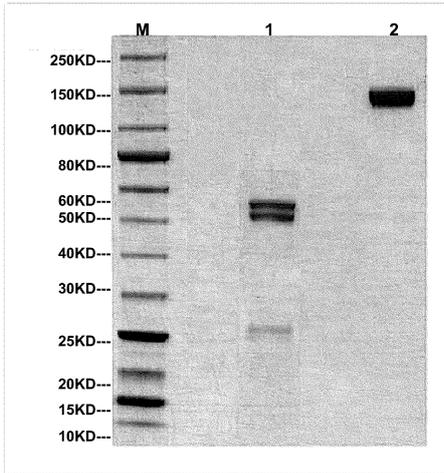
【図 2 A】



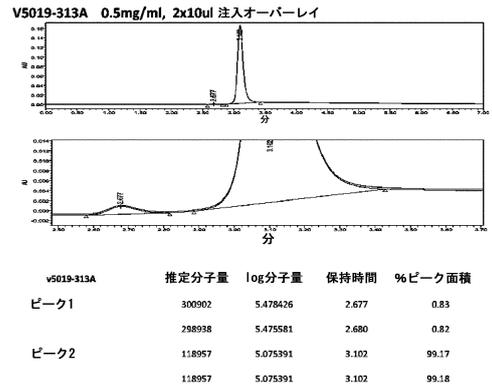
【図 2 B】



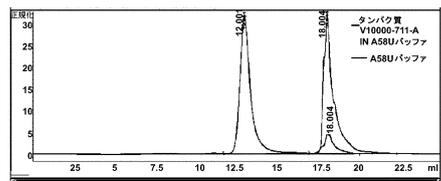
【図 2 C】



【図 3 A】

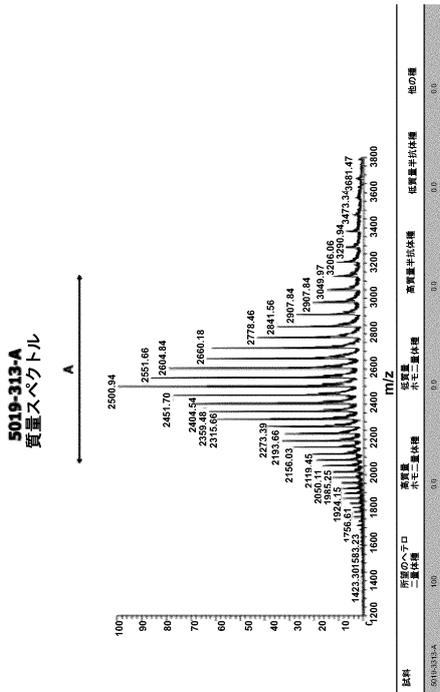


【図 3 B】

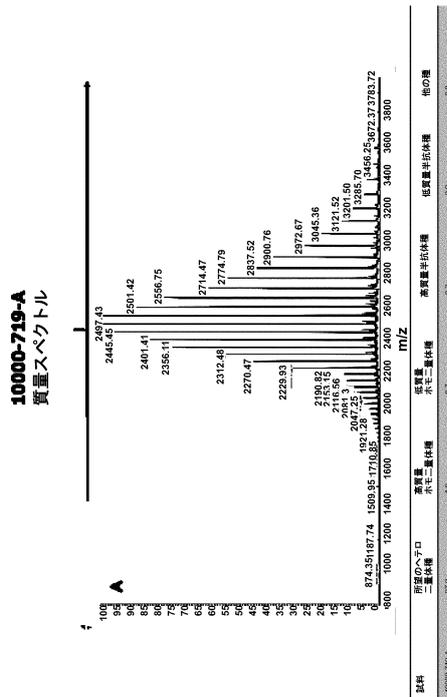


ピーク #	保持時間(分)	種類	高さ	面積	面積 %
1	8.022	MF R	0.183	22.103	1.508
2	11.059	MF R	0.179	9.708	0.662
3	12.961	MF R	30.701	1416.498	96.619
4	15.419	FM R	0.299	17.759	1.211

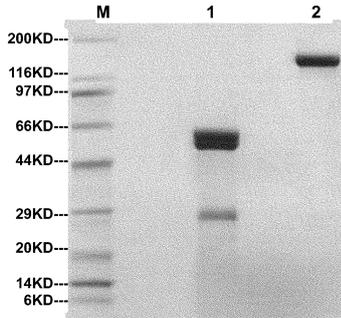
【図 4 A】



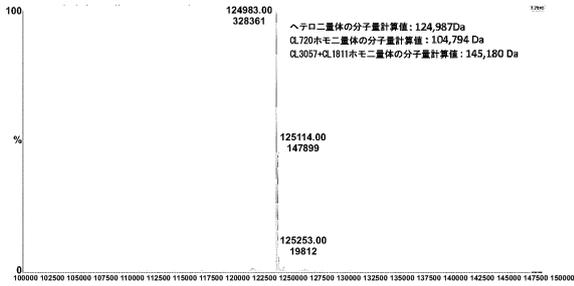
【図 4 B】



【 図 5 A 】



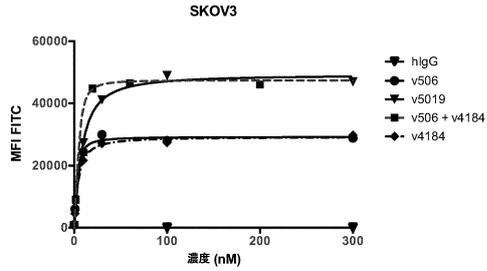
【 図 5 B 】



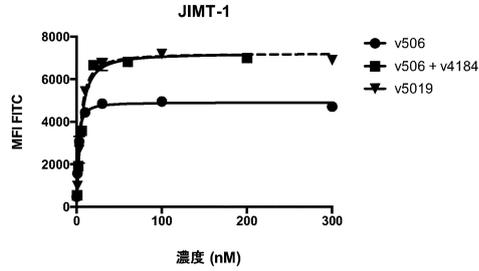
	全定量物に対するパーセンテージとしてのそれぞれの種の量				
	ヘテロ二量体	CH-A ホモ二量体	CH-B ホモ二量体	CH-B 単量体	CH-A 単量体
v5019	99.4	0.3	0.1	0	0.2

*: リシン及びD-グリカンサイドピークはこの計算に含まれなかった

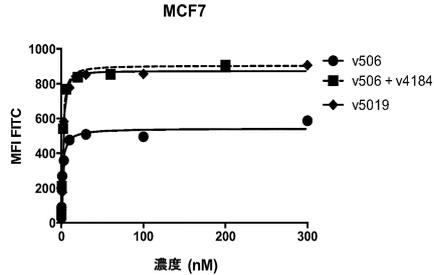
【 図 6 A 】



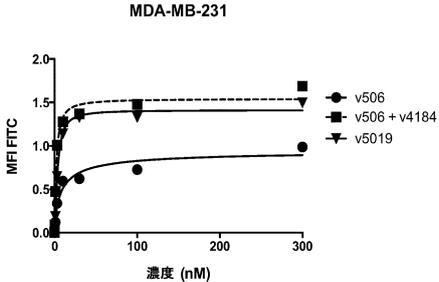
【 図 6 B 】



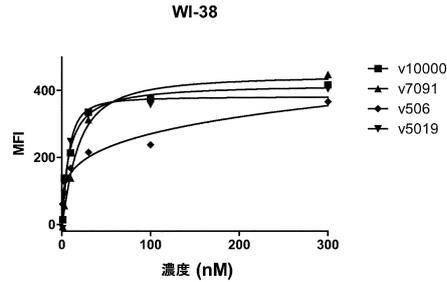
【 図 6 C 】



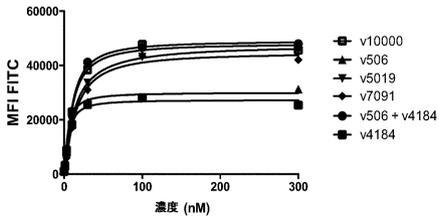
【 図 6 D 】



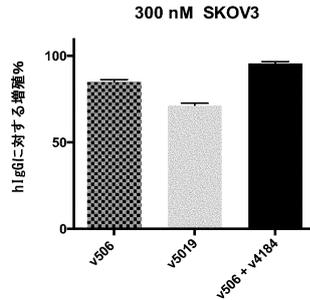
【 図 6 G 】



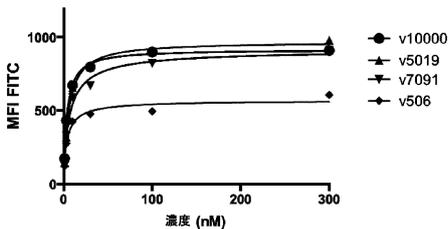
【 図 6 E 】



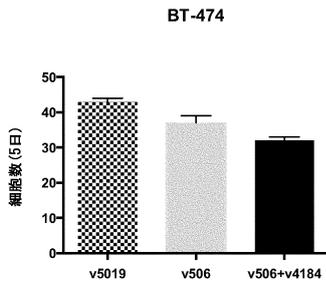
【 図 7 A 】



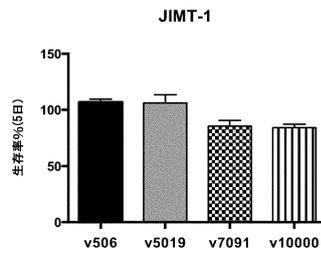
【 図 6 F 】



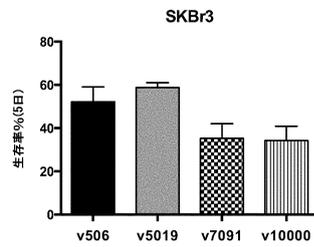
【 7 B 】



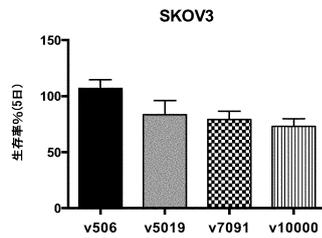
【 7 E 】



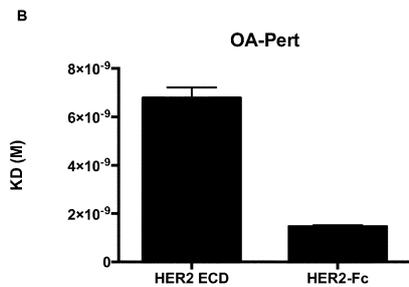
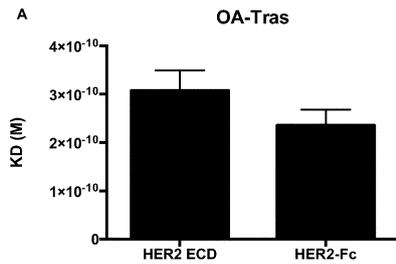
【 7 C 】



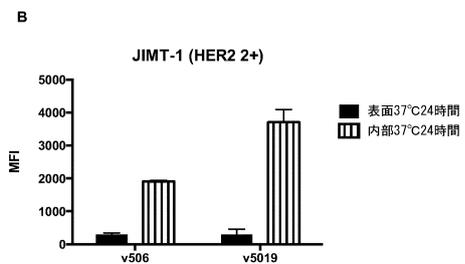
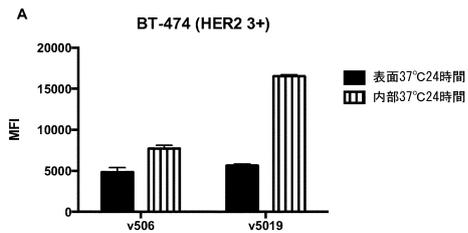
【 7 D 】



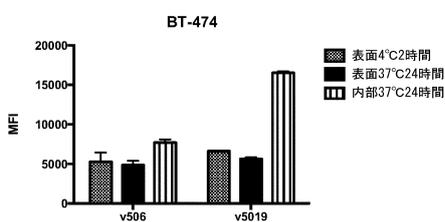
【 8 】



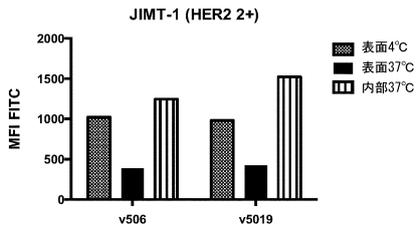
【 9 】



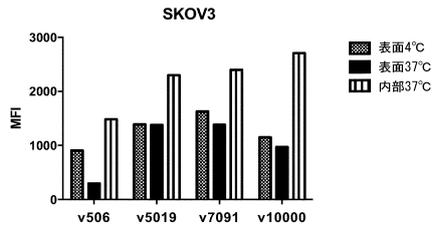
【 10 A 】



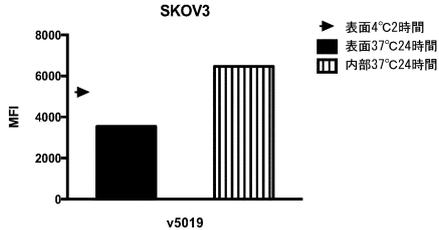
【 10 B 】



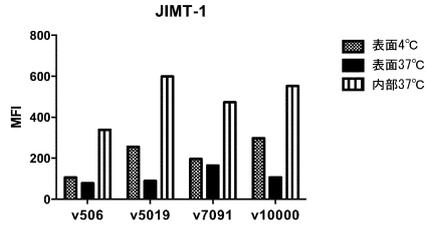
【 10 E 】



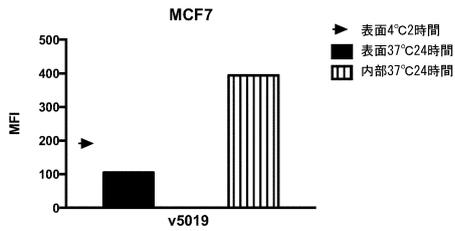
【 10 C 】



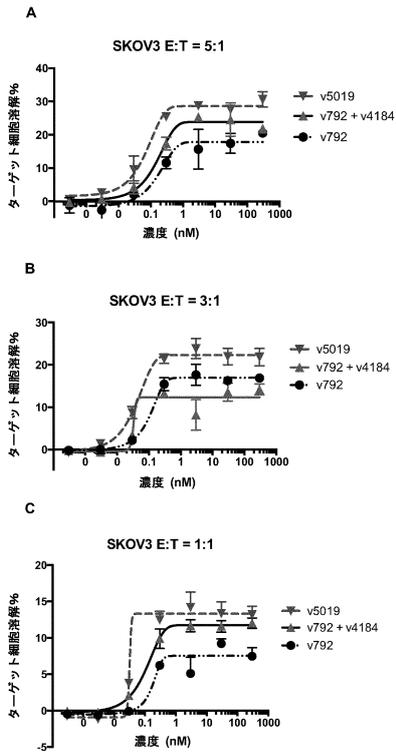
【 10 F 】



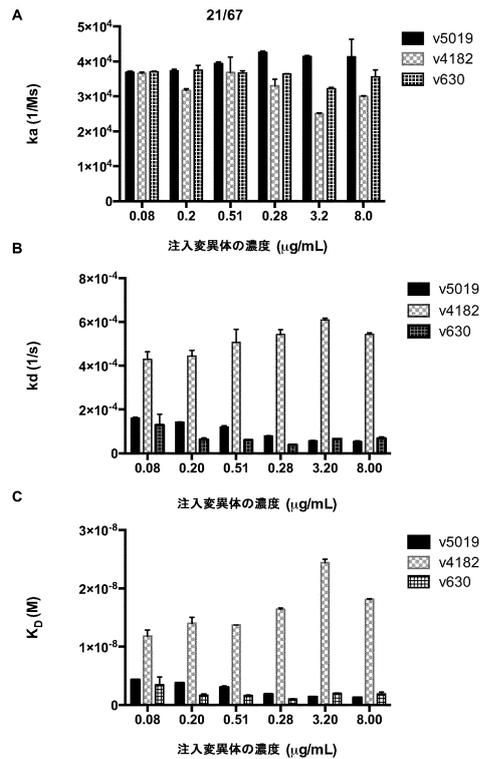
【 10 D 】



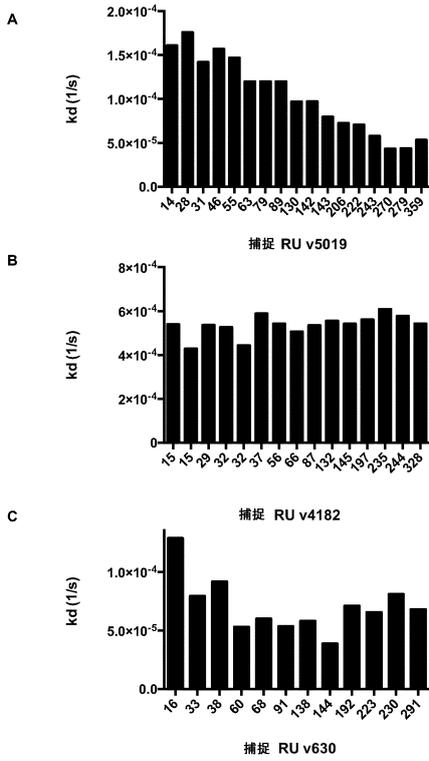
【 11 】



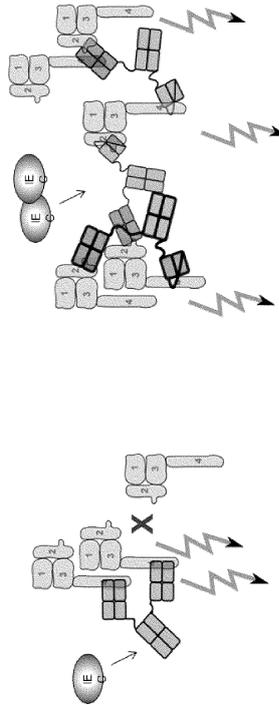
【 12 】



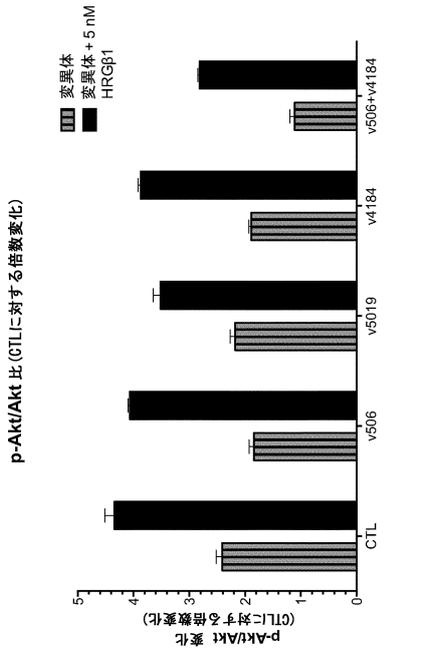
【 13 】



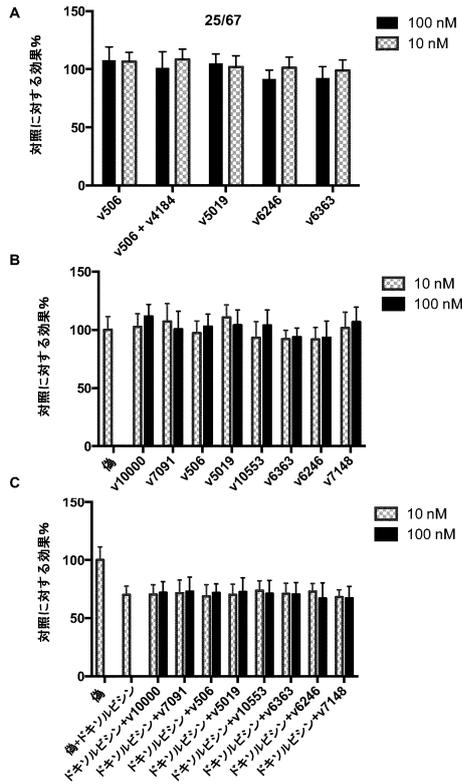
【 14 】



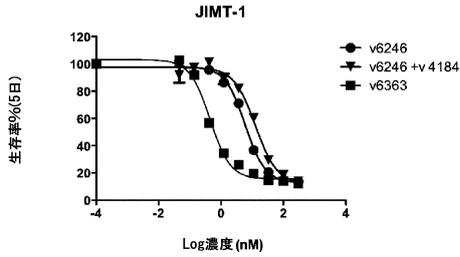
【 15 】



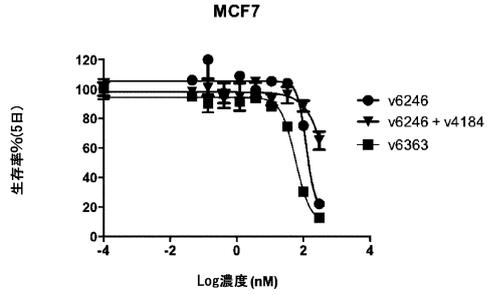
【 16 】



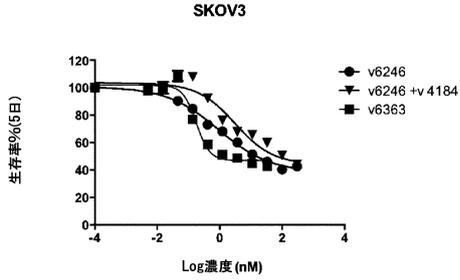
【 17 A 】



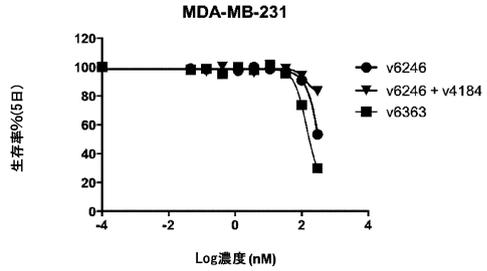
【 17 C 】



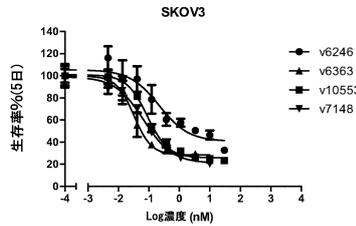
【 17 B 】



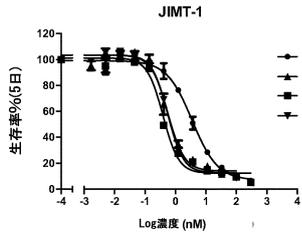
【 17 D 】



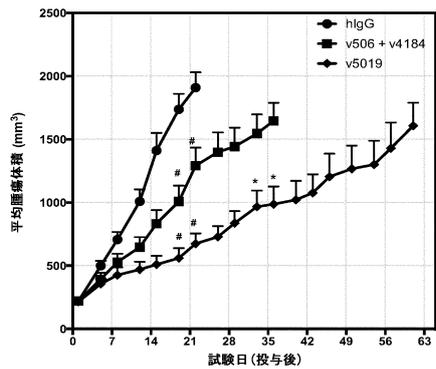
【 17 E 】



【 17 F 】

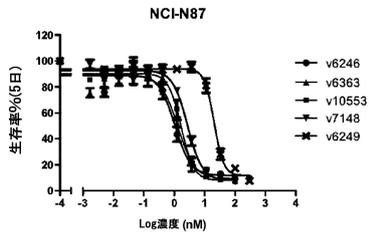


【 18 A 】

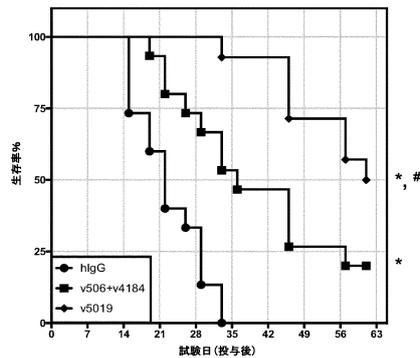


ANOVA
 †, p<0.05 対 v506
 #, p<0.05 対 IgG

【 17 G 】

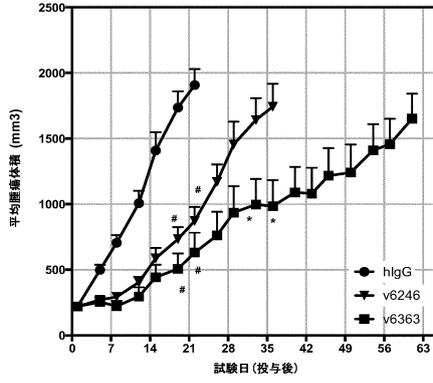


【 18 B 】

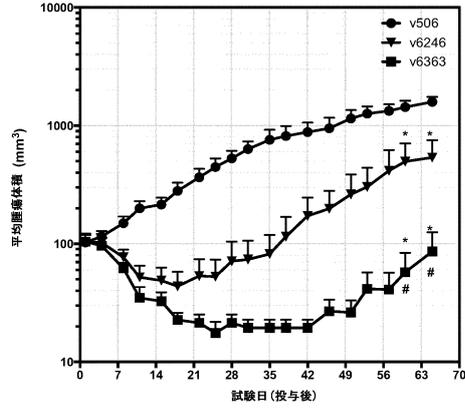


ログラント検定
 †, p<0.05 対 IgG
 #, p<0.05 対 v506+v4184

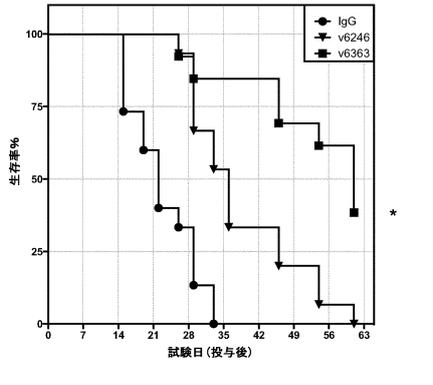
【 19 A 】



【 20 】



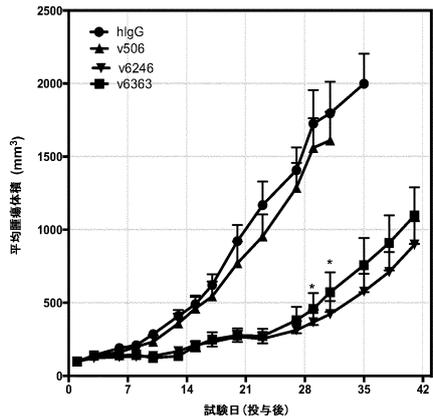
【 19 B 】



ログランク検定
*, p<0.05 対 v6246

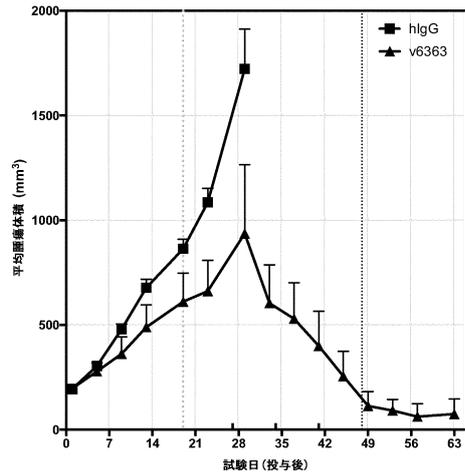
Mann-Whitney
*, p<0.05 対 v506
#, p<0.05 対 v6246

【 21 】

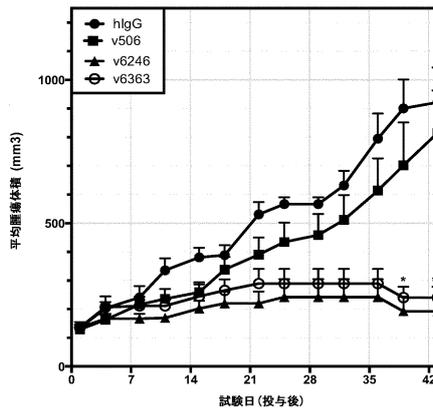


Kruskal-Wallis
*, p<0.05 対 v506

【 23 】

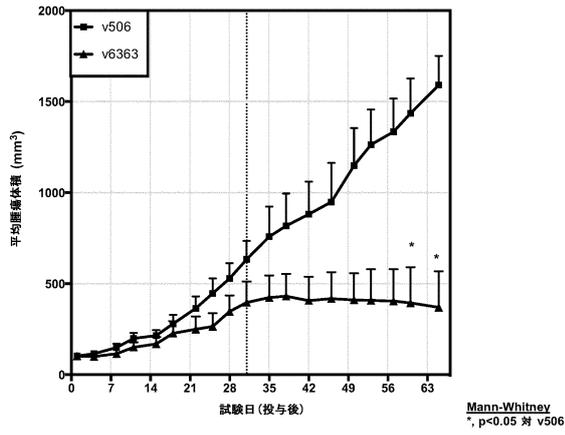


【 22 】

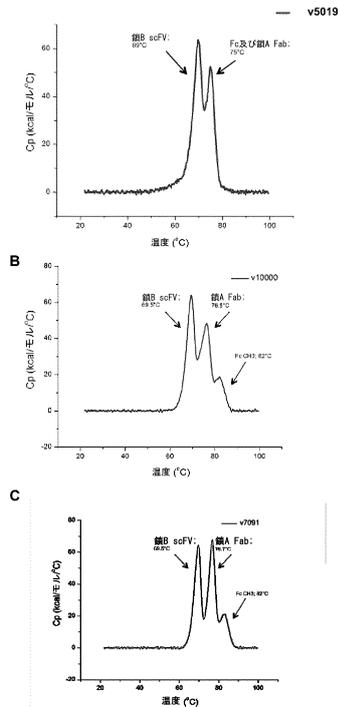


ANOVA
*, p<0.05 対 v506

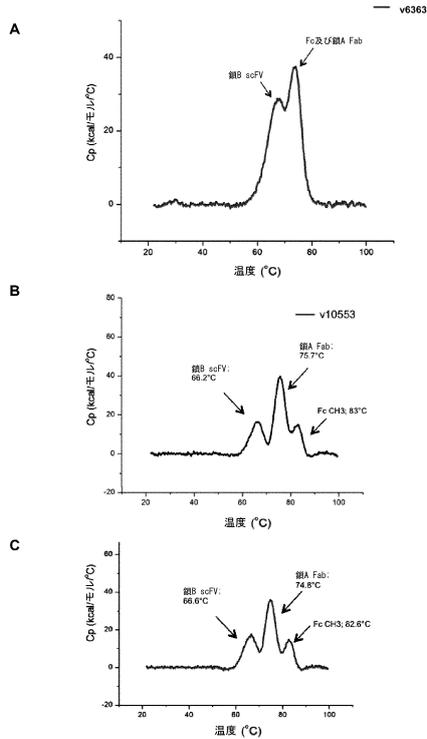
【 2 4 】



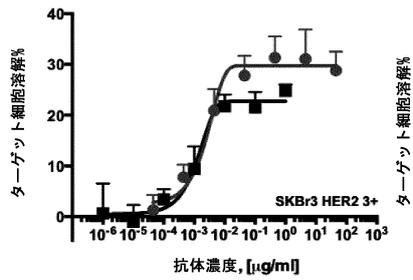
【 2 5 】



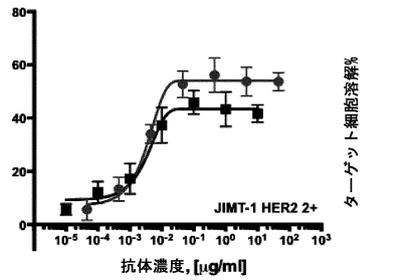
【 2 6 】



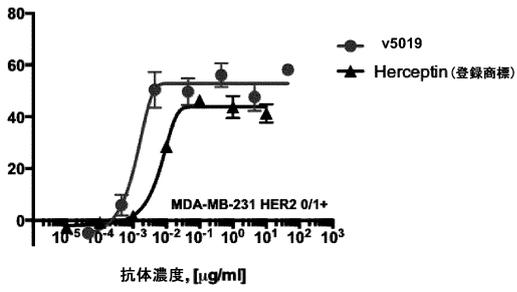
【 2 7 A 】



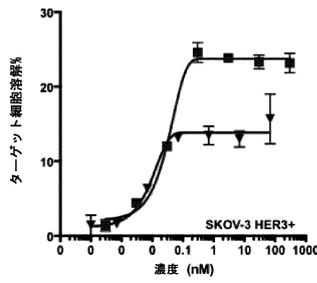
【 2 7 B 】



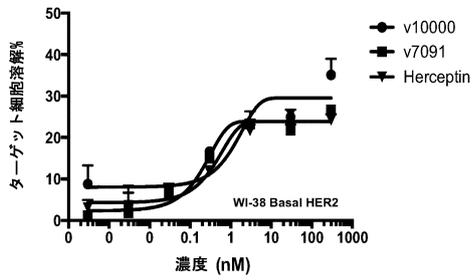
【 27C 】



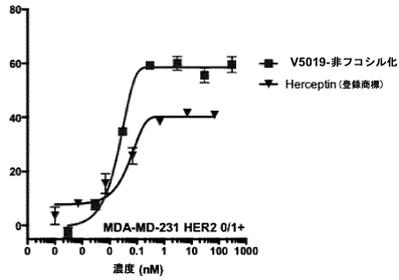
【 28A 】



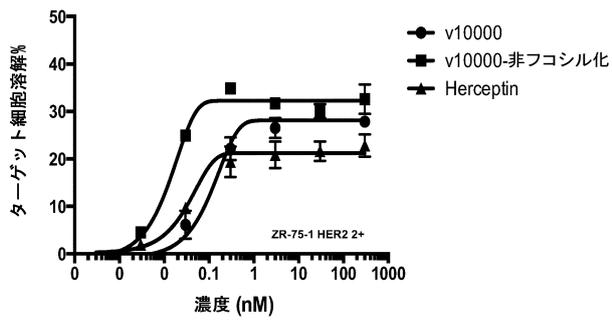
【 27D 】



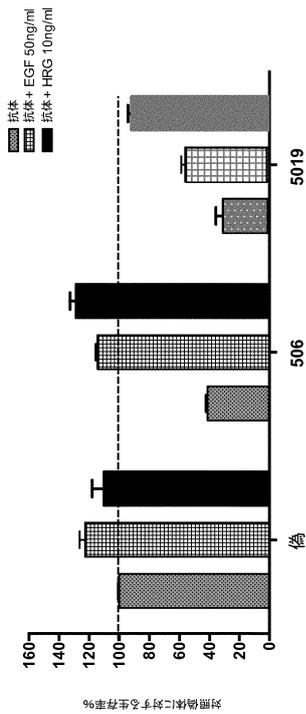
【 28B 】



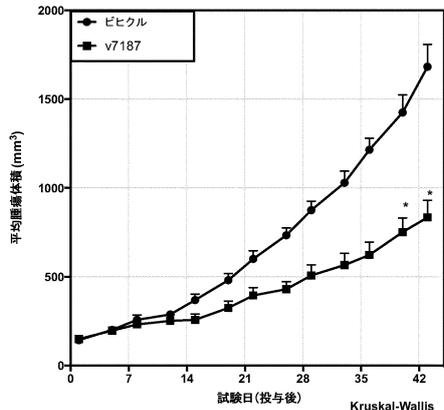
【 28C 】



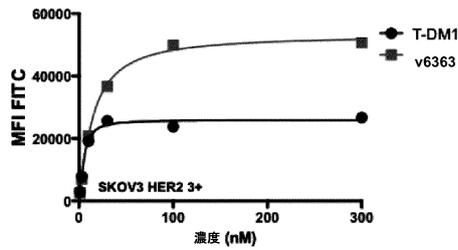
【 29 】



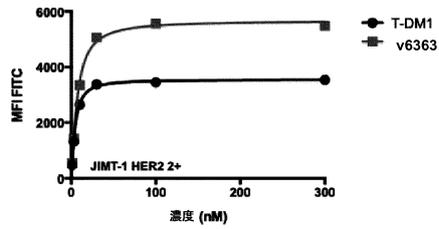
【 30 】



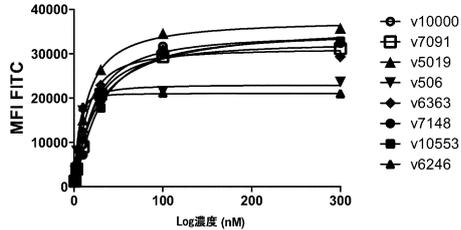
【 31 A 】



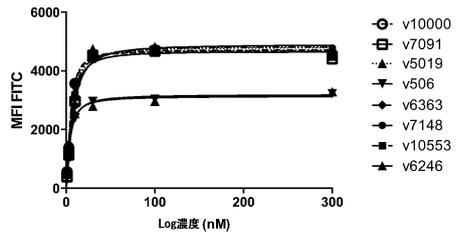
【 31 B 】



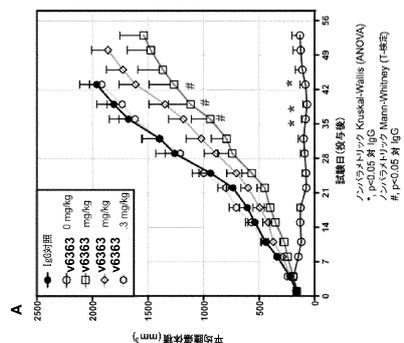
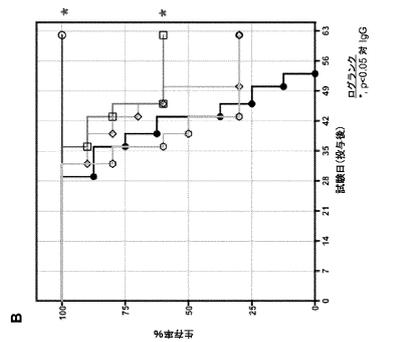
【 31 C 】



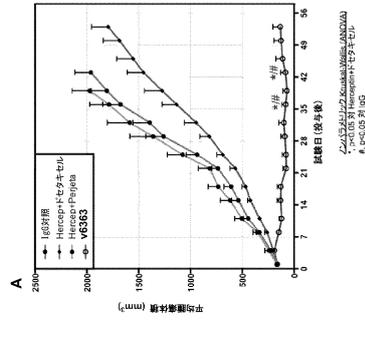
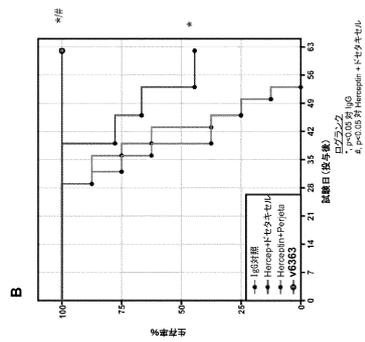
【 31 D 】



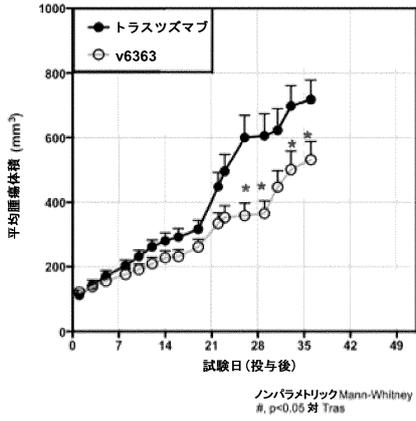
【 32 】



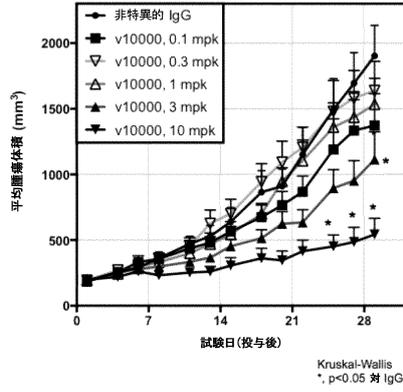
【 33 】



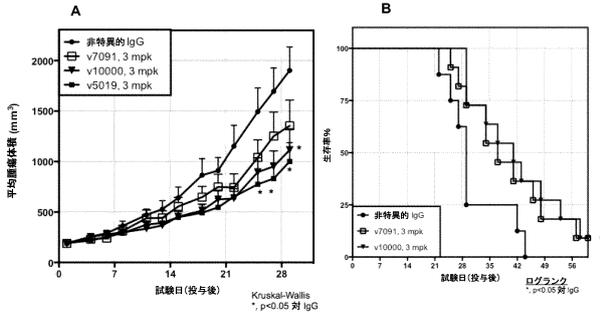
【 3 4 】



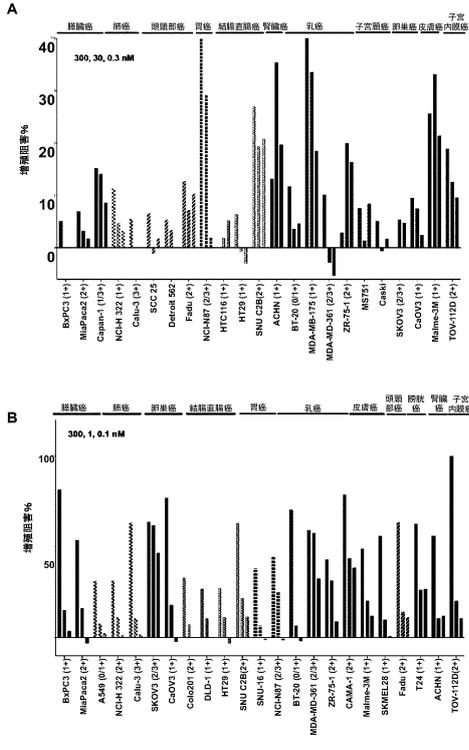
【 3 6 】



【 3 5 】



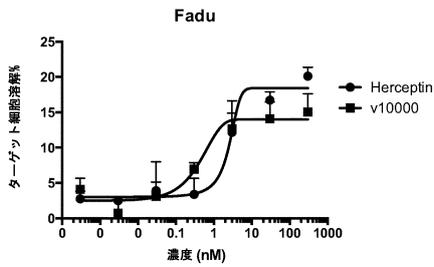
【 3 7 】



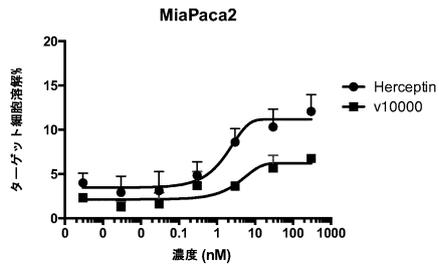
【 3 8 】

細胞系	細胞系の説明	IHC 受容体			V1000 活性	V1053 活性	参考文献
		HER2	EGFR	HER3			
BxPC3	ヒト膵臓癌	1	2	1	+	+	12,3
Capan-1	ヒト膵臓癌	1/3	1	0	+	+	14,5
MatPanc2	ヒト膵臓癌	2	1/2	0	+	+	3,4
SW 1990	転移性ヒト膵臓癌	2	1	0	+	+	2,4
Panc1	ヒト膵臓癌	1	1/2		+	+	4
A549	ヒト肺癌	0/1	1		-	-	6,7
Calu-3	ヒト肺癌	3	2	1	+	+	6,8,9
Calu-6	ヒト未分化肺癌	0			-	-	6
NCHH2126	ヒト肺癌；非小細胞肺癌				+	+	10
NCHH222	ヒト白色人種気管支肺癌	2	2		+	+	6,7,11
Detroit 562	ヒト喉頭癌				+	+	12
SCC-15	ヒト舌扁平上皮癌		2		+	+	12
SCC-25	ヒト舌扁平上皮癌		2		+	+	12
FaDu	喉頭扁平上皮癌	2	2		+	+	
Cob201	ヒト結核菌腫瘍	2	1		-	-	13
DLD-1	ヒト結核菌腫瘍；Du k e型	1	0/1		-	-	14
HCT116	ヒト結核菌腫瘍	1	0/1		-	-	14
HT 29	ヒト結核菌腫瘍	1	0		+	+	14
SNU-C2B	ヒト胃癌腸癌腫瘍	2*			+	+	
SNU-1	ヒト胃癌	0			-	-	15
SNU-16	ヒト胃癌	1			+	+	15
NCH87	ヒト胃癌	3	2	1	+	+	15
MDAMB17 5	ヒト乳房癌管癌；ER+	1	1	0/1	+	+	8,16
MDAMB36 1	ヒト乳房癌管癌；ER+；HER2増幅	2/3	1	1	+	+	9,15,17
ZR-75-1	ヒト乳房癌管上皮癌管癌；ER+；ルミナルA	2	1	1	+	+	9
BT-20	ヒト乳房癌；Basal A；TNBC	0/1	2	1	+	+	18
BT549	ヒト乳房癌管癌；Basal B；間葉種TNBC；ER-	0	0/1	0	-	-	18
CAMA-1	ヒト乳房癌管癌；ER+	2	0	1	-	-	
MDAMB45 3	ヒト転移性乳癌；ER-；HER2増幅；ルミナルA；TNBC	0	0/1	0	-	-	18
T47D	ヒト乳房癌管癌；ER+	1	0	1	-	-	19
SKUT-1	ヒト子宮中胚葉腫瘍 (混合) グレー F111				-	-	
TOV-112D	ヒト原発性悪性腫瘍；子宮内膜癌	2	1	2	+	+	20
A431	ヒト皮膚癌悪性腫瘍	1	3		-	-	21
Molme-3M	ヒト悪性黒色腫；肺転移	1	1	1	+	+	9,22
SKMEL28	ヒト悪性黒色腫	1	0		-	-	22
Caki	ヒト子宮癌	1			+	+	23
M8751	ヒト子宮頸癌悪性腫瘍				+	+	
T24	ヒト膵臓癌	1	0		-	-	19,21,2
ACIN	ヒト膵臓癌腫瘍	1	2	0/1	+	+	9,25
CaOV3	ヒト卵巣癌	1	1		+	+	26
Ovcae-3	ヒト卵巣癌	1/2	2	2	-	-	20,26
SKOV3	ヒト卵巣癌	2/3	2	0/1	-	-	

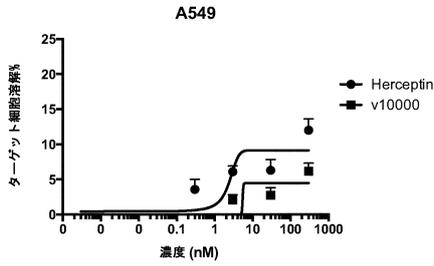
【 39 A 】



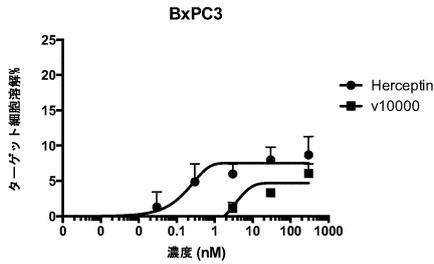
【 39 D 】



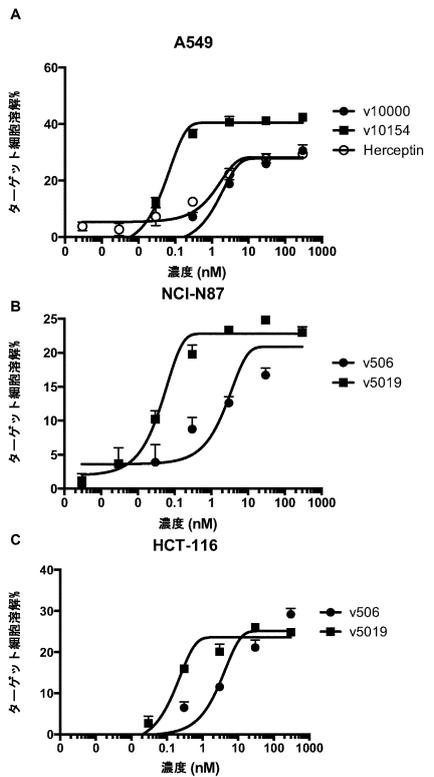
【 39 B 】



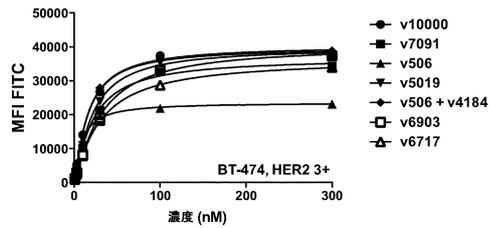
【 39 C 】



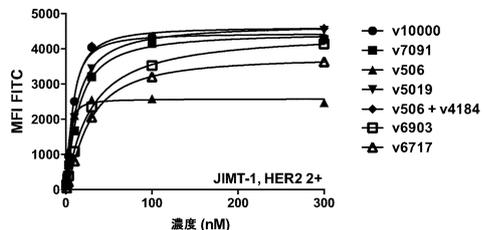
【 40 】



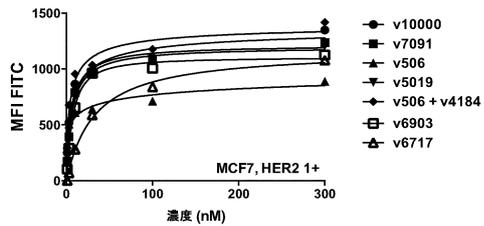
【 41 A 】



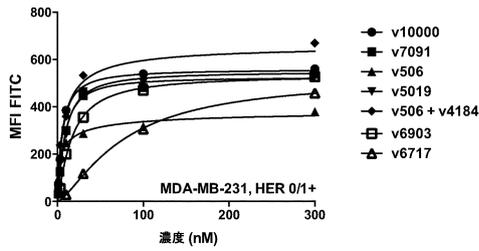
【 41 B 】



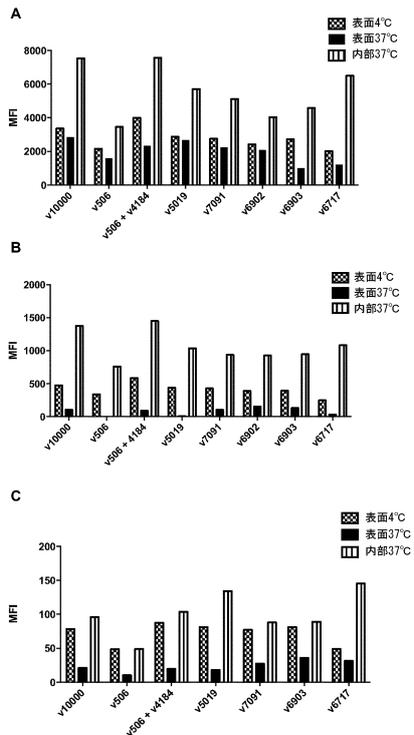
【 41 C 】



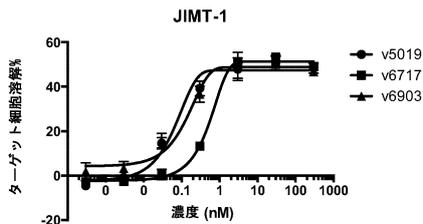
【 4 1 D 】



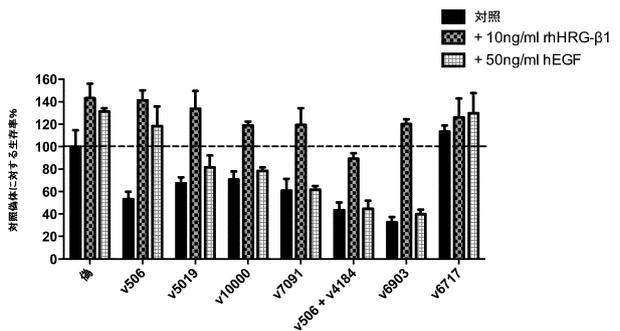
【 4 2 】



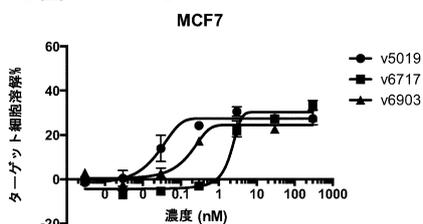
【 4 3 A 】



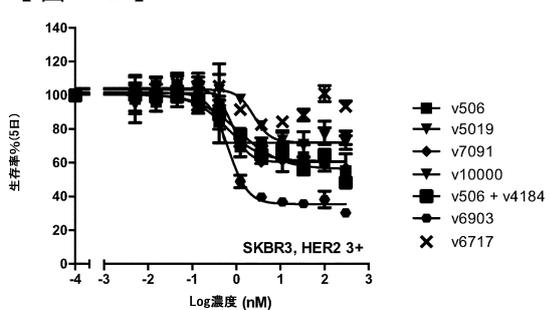
【 4 4 】



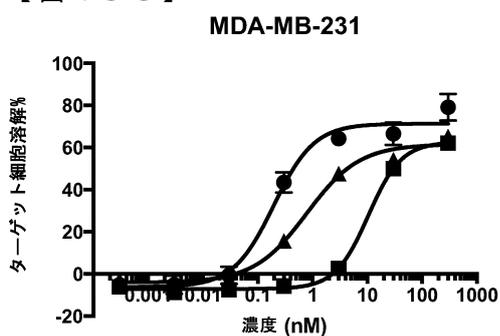
【 4 3 B 】



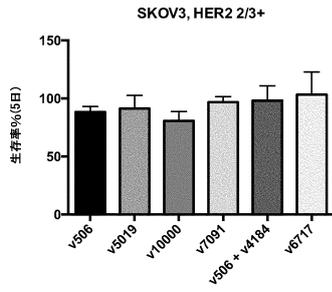
【 4 5 】



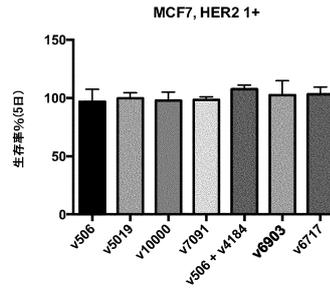
【 4 3 C 】



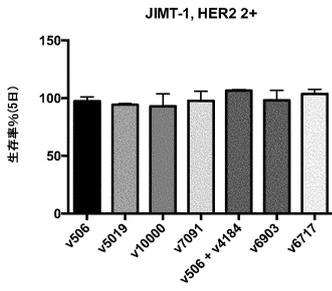
【 4 6 A 】



【 4 6 C 】

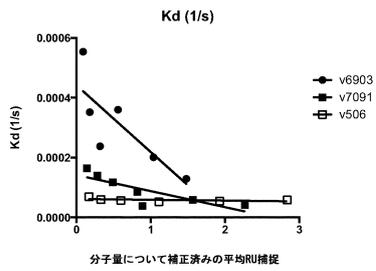


【 4 6 B 】

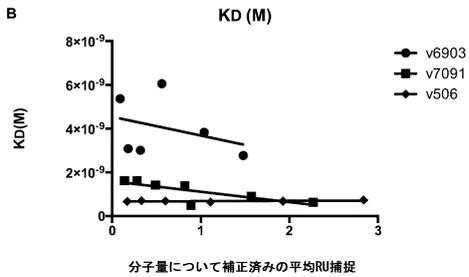


【 4 7 】

A



B



【配列表】

0006817064000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 62/009,125
 (32)優先日 平成26年6月6日(2014.6.6)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ウェイサー ニーナ イー .
 カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 デルタ クレセント ドライブ 5995
- (72)発明者 エング ゴードン イウ コン
 カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト 64ス アベニュー 1535
- (72)発明者 ウィックマン グラント レイモンド
 カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー トゥルッチ ストリート 2251
- (72)発明者 ディキシット スールジット ビーマラオ
 カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 リッチモンド キングフィッシャー ドライブ 116
 51 #51
- (72)発明者 エスコバル カブレラ エリック
 カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バーナビー ウッドリッジ プレイス 8562
- (72)発明者 サンチェス マリオ
 カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト 7ス アベニュー 3157

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 国際公開第2012/143523(WO,A1)
 国際公開第2013/055958(WO,A1)
 特表2013-523104(JP,A)
 国際公開第2012/131555(WO,A1)
 Cancer Genomics Proteomics, 2013年 2月, Vol. 10, p. 1-18

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46
 C12N 15/00 - 15/90
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq
WPIDS/WPIX(STN)