

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-531100

(P2016-531100A)

(43) 公表日 平成28年10月6日(2016.10.6)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| C07K 16/46 (2006.01) | C07K 16/46 ZNA | 4B064 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 A | 4B065 |
| C12P 21/08 (2006.01) | C12P 21/08 | 4C085 |
| C12N 5/10 (2006.01) | C12N 5/10 | 4H045 |
| C12N 5/09 (2010.01) | C12N 5/09 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-525831 (P2016-525831)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月11日 (2014. 7. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年2月19日 (2016. 2. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/046436
 (87) 国際公開番号 W02015/006749
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015. 1. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/978, 719
 (32) 優先日 平成26年4月11日 (2014. 4. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/845, 948
 (32) 優先日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/927, 877
 (32) 優先日 平成26年1月15日 (2014. 1. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

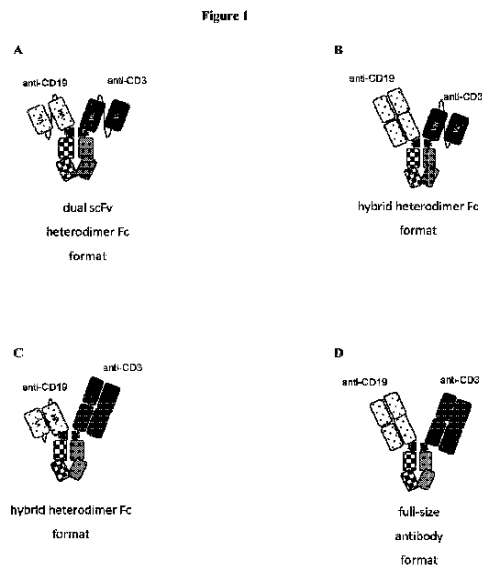
(71) 出願人 510214045
 ザイムワークス、インコーポレイテッド
 カナダ国、ブリティッシュ コロンビア州
 ブイ6エイチ 3ブイ9、バンクーバー
 , ウェスト 8番 アベニュー 540-
 1385
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異的なCD3及びCD19抗原結合構築物

(57) 【要約】

CD3、及びCD19またはCD20に結合する二重特異的抗原結合構築物を記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 1 9 抗原または C D 2 0 抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物；

C D 3 抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物；

それぞれ修飾 C H 3 ドメインを含む第 1 及び第 2 F c ポリペプチドを含むヘテロ二量体 F c であって、各修飾 C H 3 ドメインが、約 6 8 以上の融解温度 (T m) を有するヘテロ二量体 F c 及び二量体 C H 3 ドメインの形成を促進する非対称なアミノ酸修飾を含み、前記第 1 の F c ポリペプチドが、第 1 のリンカーを含んでまたは含まずに前記第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、かつ前記第 2 のモノマー F c ポリペプチドが、第 2 のリンカーを含んでまたは含まずに前記第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物に結合する、前記ヘテロ二量体 F c ；

を含む、単離二重特異的抗原結合構築物であって、

前記第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物が F a b であり、かつ前記第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物が s c F v であるか、または前記第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物が s c F v であり、かつ前記第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物が F a b である、前記単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 2】

変異体 6 7 5 4、6 7 5 1、1 8 5 3、1 0 1 5 1、6 4 7 5、6 7 4 9、1 0 1 5 2、1 0 1 5 3、6 4 7 6、5 8 5 0、5 8 5 1、5 8 5 2、または 6 3 2 5 からなる、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 3】

変異体 6 7 5 4、6 7 5 1、1 8 5 3、1 0 1 5 1、6 4 7 5、6 7 4 9、1 0 1 5 2、1 0 1 5 3、6 4 7 6、5 8 5 0、5 8 5 1、5 8 5 2、または 6 3 2 5 のうち少なくとも 3 個、少なくとも 6 個、または少なくとも 1 2 個の C D R を含む、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 4】

少なくとも 1 つのポリペプチドが、変異体 6 7 5 4、6 7 5 1、1 8 5 3、1 0 1 5 1、6 4 7 5、6 7 4 9、1 0 1 5 2、1 0 1 5 3、6 4 7 6、5 8 5 0、5 8 5 1、5 8 5 2、または 6 3 2 5 のうち少なくとも 1 つのポリペプチドに、少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 5】

a . 前記第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物が、4 G 7 ; B 4 ; B 4 3 ; B U 1 2 ; C L B - C D 1 9 ; L e u - 1 2 ; S J 2 5 - C 1 ; J 4 . 1 1 9、B 4 3、S J 2 5 C 1、F M C 6 3 (I g G 2 a)、H D 2 3 7 (I g G 2 b)、M o r - 2 0 8、M E D I - 5 5 1、及び M D X - 1 3 4 2 からなる群から選択される抗体に由来する、C D 1 9 に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

b . かつ、前記第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物が、O K T 3 ; テプリズマブ (商標) (M G A 0 3 1 , E l i L i l l y) ; M i c r o m e t、プリナツモマブ (商標) ; U C H T 1 ; N I 0 4 0 1 ; ビジリズマブ ; X 3 5 - 3、V I T 3、B M A 0 3 0 (B W 2 6 4 / 5 6)、C L B - T 3 / 3、C R I S 7、Y T H 1 2 . 5、F 1 1 1 - 4 0 9、C L B - T 3 . 4 . 2、W T 3 1、W T 3 2、S P v - T 3 b、1 1 D 8、X I I I - 1 4 1、X I I I - 4 6、X I I I - 8 7、1 2 F 6、T 3 / R W 2 - 8 C 8、T 3 / R W 2 - 4 B 6、O K T 3 D、M - T 3 0 1、S M C 2 及び F 1 0 1 . 0 1 から選択される抗体に由来する、C D 3 に特異的な前記結合ポリペプチド構築物を含み、

c . かつ / または前記抗原結合構築物が、a もしくは b に記載した抗体と競合し、

d . かつ / またはこれらのヒト化版である、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

前記第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物が、CD 19 に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物に少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一であるアミノ酸配列を含み、かつ前記第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物が、CD 3 に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物に少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 7】

表 A の前記ヘテロ二量体 Fc、または変異体 6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、もしくは 6325 を含む、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

10

【請求項 8】

少なくとも 1 つの Fc ポリペプチドが、表 A のヘテロ二量体 Fc、または変異体 6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、もしくは 6325 のうち少なくとも 1 つの Fc ポリペプチドに少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 9】

前記ヘテロ二量体 Fc が

ヒト Fc である；かつ/または

ヒト IgG1 Fc もしくは IgG4 Fc である；かつ/または

前記 CH3 ドメインのうち少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の修飾を含む；かつ/または

20

野生型ホモ二量体 Fc に相当する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する、前記 CH3 ドメインのうち少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の修飾を含む；かつ/または

表 A に記載した前記 CH3 ドメインのうち少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の修飾を含み；

少なくとも 1 つの CH2 ドメインを更に含む；かつ/または

1 つ以上の修飾を含む少なくとも 1 つの CH2 ドメインを更に含む；かつ/または

表 B に記載した前記 CH2 ドメインのうち少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の修飾を含む、少なくとも 1 つの CH2 ドメインを更に含む；かつ/または

30

Fc 受容体及び/もしくは補体の選択的結合を促進する 1 つ以上の修飾を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 10】

前記二量体化 CH3 ドメインが、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、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 11】

各ヘテロ二量体 Fc ポリペプチドが、リンカーにより各抗原結合ポリペプチド構築物に融合した、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

40

【請求項 12】

前記リンカーがポリペプチドリinkerである、請求項 11 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 13】

前記リンカーが IgG1 ヒンジ領域を含む、請求項 11 に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 14】

低下した Fc 受容体結合を示し、かつ関係する免疫細胞が仲立ちするエフェクター活性を示さない、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

50

【請求項 15】

前記二重特異的抗原結合構築物が、

FACS及び/もしくは顕微鏡検査法によりアッセイしたように、CD19 + Raji B細胞及びJurkat T細胞間でのシナプス形成並びに結合が可能である；かつ/または

ヒト全血において、T細胞が導くCD20 + B細胞の死滅の仲立ちをする；かつ/または

v875と比較して向上した生物物理学的特性を示す；かつ/または

v875と比較して、例えばSEC（サイズ排除クロマトグラフィー）後に10mg/Lを超えて発現する、向上した収量を示す；かつ/または

同等の発現条件下で、所望の均一種の10倍良好な収量を示す、かつ/または

例えば95%を超えるヘテロ二量体純度を示す、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

10

【請求項 16】

前記抗原結合構築物が薬剤に結合している、上記請求項のいずれか一項に記載の単離二重特異的抗原結合構築物。

【請求項 17】

上記請求項のいずれか一項に記載の前記単離二重特異的抗原結合構築物、及び医薬担体を含む医薬組成物。

【請求項 18】

前記担体が、緩衝液、酸化防止剤、低分子量分子、薬剤、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または賦形剤を含む、請求項17に記載の医薬組成物。

20

【請求項 19】

上記請求項のいずれか一項に記載の前記二重特異的抗原結合構築物を含む、薬で使用するための医薬組成物。

【請求項 20】

上記請求項のいずれか一項に記載の前記二重特異的抗原結合構築物を含む、がん治療に使用するための医薬組成物。

【請求項 21】

対象におけるがん治療方法であって、有効量の上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗原結合構築物を前記対象に投与する段階を含む、前記がん治療方法。

30

【請求項 22】

前記対象がヒトである、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記がんが、血球系がん、白血病、リンパ腫、血液がん、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、CD19溶解抗体、CD20溶解抗体、及びプリナツモマブのうち少なくとも1種に非応答性のがん、プリナツモマブでの治療後に退行性となるがん細胞、ALL、CLL、NHL、外套細胞リンパ腫、播種性B細胞病、並びに脳、肺、肝臓及び/または骨の転位である、請求項21に記載の方法。

40

【請求項 24】

対象における状態の治療方法であって、有効量の上記請求項のいずれか一項に記載の前記抗原結合構築物を前記対象に投与する段階を含み、前記状態が、炎症性疾患、増殖性疾患、最小残存がん、腫瘍性疾患、炎症性疾患、免疫不全、自己免疫疾患、感染症、ウイルス性疾患、アレルギー反応、寄生虫反応、移植片対宿主病もしくは宿主対移植片病、または細胞悪性疾患、B細胞に関係する疾患、抗CD19抗体及び抗CD20抗体のうち少なくとも1つによる治療に非応答性の疾患である、前記治療方法。

【請求項 25】

前記自己免疫状態が、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬性関節炎、乾癬、血管炎、ぶどう膜炎、クローン病、及び1型糖尿病の1つ以上である、請

50

求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記二重特異的抗原結合構築物の発現に好適な条件下で宿主細胞を培養する段階であって、前記宿主細胞が、上記請求項のいずれか一項に記載の前記単離二重特異的抗原結合構築物をコードするポリヌクレオチドを含む、段階、及び

前記二重特異的抗原結合構築物を精製する段階を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の前記二重特異的抗原結合構築物の作製方法。

【請求項 2 7】

サンプルにおける C D 3 及び / または C D 1 9 の検出または測定方法であって、前記サンプルを、上記請求項のいずれか一項に記載の前記二重特異的抗原結合構築物と接触させる段階、及び結合複合体を検出または測定する段階を含む、前記検出または測定方法。

10

【請求項 2 8】

有効量の上記請求項のいずれか一項に記載の前記二重特異的抗原結合構築物を前記細胞に投与する段階、及び所望により、低分子または第 2 の抗体を投与する段階を含む、細胞における C D 3 及び / または C D 1 9 シグナル伝達の阻害、低下またはブロック方法。

【請求項 2 9】

上記請求項のいずれか一項に記載の前記単離二重特異的抗原結合構築物のうち少なくとも 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。

【請求項 3 0】

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、請求項 2 9 に記載の単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 3 1】

変異体 6 7 5 4、6 7 5 1、1 8 5 3、1 0 1 5 1、6 4 7 5、6 7 4 9、1 0 1 5 2、1 0 1 5 3、6 4 7 6、5 8 5 0、5 8 5 1、5 8 5 2、または 6 3 2 5 のうち少なくとも 1 つのポリペプチドをコードする、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。

【請求項 3 2】

請求項 2 9 に記載の 1 つ以上のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含む、ベクターまたはベクターのセット。

30

【請求項 3 3】

プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、及び組換え発現ベクターからなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の 1 つ以上のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクターまたはベクターのセット。

【請求項 3 4】

請求項 2 9 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項 3 2 に記載のベクターもしくはベクターのセットを含む単離細胞。

【請求項 3 5】

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 2 9 3 細胞である、請求項 3 4 に記載の単離細胞。

40

【請求項 3 6】

v 1 8 1 3 または v 1 8 1 2 または v 1 8 2 3 からなる単離二重特異的抗原結合構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年7月12日に提出された米国特許仮出願番号第 6 1 / 8 4 5 , 9 4 8 号、及び 2 0 1 4 年 1 月 1 5 日に出願された米国仮出願番号 6 1 / 9 2 7 , 8 7 7 号、及び 2 0 1 4 年 4 月 1 1 日に出願された米国仮出願番号 6 1 / 9 7 8 , 7 1 9 号の利益

50

を主張する。これらの出願は、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本願は、E F S - W e bを通して提出された配列表を含有し、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。2014年X X月に作成された前記A S C I Iの写しはX X X X X _ C R F _ s e q u e n c e l i s t i n g . t x tという名前であり、X X X , X X X バイトのサイズである。

【0003】

発明の分野

本発明の分野は多重特異的な足場、例えば、生物学的治療薬のカスタム開発用C D 3 結合ドメインを含む抗原結合構築物の、合理的設計である。

10

【背景技術】

【0004】

発明の背景

治療用タンパク質の分野において、多価の標的結合機能を有する抗体は、薬剤候補として素晴らしい足場である。これらの機能を更に発達させることで、設計した二重特異性抗体及び他の融合多重特異的治療薬は、二重または多重標的特異性、及び新規の作用機序を有する創薬の可能性を示す。好ましい製造可能性、薬学動態及び機能活性を有する、かかる多価及び多重特異的な治療用タンパク質の開発は、難題であり続けた。

【0005】

腫瘍細胞に対してT細胞を標的指向させることが可能な二重特異的抗体が同定され、がん治療におけるその有効性が試験されてきた。プリナツモマブは、再発B細胞非ホジキンリンパ腫及び慢性リンパ性白血病等のB細胞疾患の治療のために同定された、B i T E (商標) (二重特異的T細胞誘導) と呼ばれるフォーマットの二重特異的抗C D 3 - C D 1 9抗体の例である (B a e u e r l e e t a l (2 0 0 9) 1 2 : 4 9 4 1 - 4 9 4 4 (非特許文献1))。B i T E (商標) フォーマットは、2つの異なる抗体に由来する可変ドメインが結合している、二重特異的一本鎖抗体構築物である。しかし、プリナツモマブはインビボでの不十分な半減期を有し、生産及び安定性の点で、製造するのが難しい。したがって、腫瘍細胞にT細胞を標的指向させることが可能であり、向上した製造可能性を有する、向上した二重特異的抗体が必要とされている。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】B a e u e r l e e t a l (2 0 0 9) 1 2 : 4 9 4 1 - 4 9 4 4

【発明の概要】

【0007】

C D 1 9またはC D 2 0抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第1の抗原結合ポリペプチド構築物；C D 3抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第2の抗原結合ポリペプチド構築物；それぞれ修飾C H 3ドメインを含む第1及び第2F cポリペプチドを含むヘテロ二量体F cを含む、単離された二重特異的抗原結合構築物を本明細書にて開示する。ここで各修飾C H 3ドメインは非対称なアミノ酸修飾を含み、これは約68 以上の融解温度 (T m) を有するヘテロ二量体F c及び二量体C H 3ドメインの形成を促進する。またここで第1のF cポリペプチドは、第1のリンカーを含んでまたは含まずに第1の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、かつ第2のモノマーF cポリペプチドは、第2のリンカーを含んでまたは含まずに第2の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、並びに、第1の抗原結合ポリペプチド構築物はF a bでありかつ第2の抗原結合ポリペプチド構築物はs c F vであるか、または、第1の抗原結合ポリペプチド構築物はs c F vでありかつ第2の抗原結合ポリペプチド構築物はF a bである。

40

【図面の簡単な説明】

【0008】

50

特許出願ファイルは、カラーで作成した少なくとも1つの図面を含有する。一般に入手可能であれば、カラーの図面を含む本特許出願の写しは、要請に応じて、かつ必要な料金の支払いがあり次第、米国特許及び商標事務所から提供される。

【図1】本明細書に記載される二重特異的抗原結合構築物の例示的な略図を示す。図1Aは、二重s c F vヘテロ二量体F cフォーマットを示す；図1Bは、C D 3結合ポリペプチドがs c F vフォーマットであり、C D 19結合ポリペプチドがF a bフォーマットである実施形態における、ハイブリッドヘテロ二量体F cフォーマットを示す；図1Cは、C D 19結合ポリペプチドがs c F vフォーマットであり、C D 3結合ポリペプチドがF a bフォーマットである実施形態における、ハイブリッドヘテロ二量体F cフォーマットを示す；図1Dは、フルサイズの抗体フォーマットを示す。

【図2】二重s c F v - F c（本明細書においては、二重s c F vフォーマットとも呼ばれる）、ハイブリッドまたはフルサイズモノクローナル抗体フォーマットにおける例示的なC D 3 / C D 19二重特異的変異体の一覧を提供する。この図に示す二重特異的変異体は、単一特異的抗C D 3抗体O K T 3、及び単一特異的抗C D 19抗体H D 3 7に基づく抗原結合ドメインを含む。C D Rでのシステインからセリンへの変異（C D R C S）、s c F vリンカー配列（V H V Lリンカー）への修飾、及びジスルフィド安定化修飾（V H V L S S）を含む、二重特異的変異体の生物物理学的及び機能的特徴を向上させる、抗原結合ドメインへの修飾の可能性をここで特定する。加えて、F c領域のノックアウトF c Rへの結合活性の改変も、変異体の機能的特徴を変更する手段として特定される。

【図3A】選択した二重特異的変異体に対する生物物理特性の向上のための、変異体最適化の一覧を提供する。この図は生物物理学的及び機能的特徴、並びに変異体の製造可能性を向上するために使用した最適化戦略を示し、最終精製工程後の発現収量、及びそれぞれに対するヘテロ二量体純度をまとめている。

【図3B】選択した二重特異的変異体に対する生物物理特性の向上のための、変異体最適化の一覧を提供する。この図は生物物理学的及び機能的特徴、並びに変異体の製造可能性を向上するために使用した最適化戦略を示し、最終精製工程後の発現収量、及びそれぞれに対するヘテロ二量体純度をまとめている。

【図3C】選択した二重特異的変異体に対する生物物理特性の向上のための、変異体最適化の一覧を提供する。この図は生物物理学的及び機能的特徴、並びに変異体の製造可能性を向上するために使用した最適化戦略を示し、最終精製工程後の発現収量、及びそれぞれに対するヘテロ二量体純度をまとめている。

【図4】特定の物理的性質、一時的発現によるタンパク質収量、結合特性及びバリデーション段階（即ち、インビボモデルで試験をしたかエクスピボモデルで試験をしたか）に関する、選択した変異体の一覧を提供する。

【図5】選択した変異体はC D 19+ R a j i B細胞とJ u r k a t T細胞とを架橋できることを示す。左のパネルは、対照I g Gと比較した、変異体8 7 5及び8 9 1のF A C S架橋データを示す。右のパネルは変異体8 7 5、1 8 5 3、及び6 4 7 6に対するT : B架橋分析の一覧を提供する。

【図6】選択した変異体が、偽足形成を伴ってB細胞及びT細胞を架橋する能力を示す。左側の表は、変異体8 7 5、1 6 6 1、1 8 5 3、6 4 7 6及び6 5 1 8のB : T細胞架橋分析の一覧を提供する。右側の写真は、架橋顕微鏡法（bridging microscopy）により測定した、変異体8 7 5、1 8 5 3、及び6 5 1 8における偽足の形成を示す。

【図7A】選択した変異体が、ヒト全血アッセイにおいて、自己B細胞の枯渇の仲立ちをする能力を示す。C D 2 0 + B細胞の存在は、ヒト全血における4 8時間のI L - 2インキュベーションに従って測定した（2つのドナーの平均、n = 4）。図7Aは、二重s c F vヘテロ二量体F cフォーマット、またはハイブリッドヘテロ二量体F cフォーマットを有する変異体の結果を示す。

【図7B】選択した変異体が、ヒト全血アッセイにおいて、自己B細胞の枯渇の仲立ちを

10

20

30

40

50

する能力を示す。CD20+B細胞の存在は、ヒト全血における48時間のIL-2インキュベーションに従って測定した(2つのドナーの平均、n=4)。図7Bは、フルサイズ抗体フォーマットにおける変異体の結果を示す。

【図8】選択した変異体がヒトG2ALL腫瘍細胞株に結合する能力を示す。

【図9】インビボマウスB-ALL白血病モデルにおける、対照と比較した変異型1661(FcRノックアウト変異体)の有効性を示す。パネルAは、腹臥位における全身の生物発光量を示す。パネルBは、仰臥位における全身の生物発光量を示す。パネルCは全身の生物発光の画像である。かつパネルDは脾臓内で検出した生物発光量を示す。

【図10】インビボマウスB-ALL白血病モデルにおける、対照と比較したハイブリッド変異体1853及び二重scFv-Fc変異体875の有効性を示す。パネルAは、腹臥位における全身の生物発光量を示す。パネルBは、仰臥位における全身の生物発光量を示す。パネルCは全身の生物発光の画像である。かつパネルDは脾臓内で検出した生物発光量を示す。

【図11】例示的なCD3-CD19ヘテロ二量体変異体の薬物動態分析を示す。図は、1.2mg/kgの対照抗体と比較した、NSG(NODスキッド)マウスにおける、0.8mg/kgのv875を一回経静脈投与したPKプロファイルを示す。対照抗体は、HER2に結合する単一特異的抗体である。

【図12】例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物による、T細胞活性化の、標的B細胞への依存性を示す。

【図13】ヒトPBMC内でのT細胞増殖における、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物の効果を示す。

【図14】ヒトPBMCにおけるIFN、TNF、IL-2、IL-6及びIL-10サイトカインの放出に関する、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物の効果を示す。

【図15】図15A及びBは、NSG(NODスキッド、NOD.Cg-Prkdc^sc^{id}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)マウスにおける3mg/kgの例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物1853の一回の経静脈投与が、マウスにおける半減期、分布、及びクリアランスに関して、典型的なヒトIgG様の薬学動態を有することを示す。図15Cは、3mg/kgの経静脈注射の24時間後における、二重特異的CD3/CD19変異体の血清中濃度の分析を示す。分析は、インビボ有効性研究の一部として行った(実施例10、及び図9、10を参照のこと)。

【図16】ヒト化NSGマウスのインビボヒトB-ALL異種移植モデルにおいて、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物が自己B細胞を枯渇させる能力を示す。

【図17】ヒト化NSGマウスのインビボヒトB-ALL異種移植モデルにおける、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物による治療に应答した、自己T細胞の活性化及び再分布の動態を示す。

【図18】ヒト化NSGマウスのインビボヒトB-ALL異種移植モデルにおける、ヒトサイトカインIFN、TNF、IL2、IL6、及びIL10の放出に関する、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物の効果を示す。

【図19】全血アッセイにおける自己B細胞の枯渇を仲立ちする、異種間反応性変異体5851の能力を示す。CD20+B細胞の存在は、ヒト全血における48時間のIL-2インキュベーションに従って測定した(2つのドナーの平均、n=4)。

【発明を実施するための形態】

【0009】

発明の詳細な説明

別段定めがない限り、本明細書で使用する全ての技術及び科学用語は、請求項に記載の主題が属する当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書の用語に関して複数の定義が存在する場合、このセクションのものが当てはまる。URL、または他のかかる識別子もしくはアドレスが参照される場合、かかる識別子は変化する可能性が

10

20

30

40

50

あり、かつインターネット上の特定の情報は移り変わる可能性があるが、インターネットを検索することにより同等の情報を見つけることができると理解されている。これらの参照は、かかる情報の入手可能性及び公への伝播の証拠となる。

【0010】

前述の一般的な記述及び以下の詳細の記述は、単に例示的及び説明用であり、請求項に記載のいかなる主題をも限定しないものと理解されなければならない。本願において、単数形の使用は別途特に明記しない限り、複数形を含む。

【0011】

本明細書で明示的に異なった定義がされない限り、抗体技術の当業者により理解される用語にはそれぞれ、当該技術分野において獲得された意味が付与される。

10

【0012】

アミノ酸は本明細書において、IUPAC - IUB国際生命学命名委員会により推奨される周知の3文字の記号、または1文字の記号のいずれかにより表されてよい。ヌクレオチドも同様に、一般に是認されている1文字のコードにより表されてよい。

【0013】

本明細書において、任意の濃度範囲、割合範囲、比の範囲、または整数範囲は、特に断りのない限り、引用した範囲内の任意の整数値、及び適切な場合、それらの分数（例えば整数の10分の1及び100分の1）を含むと理解されなければならない。本明細書で使用する場合、「約」とは、特に断りのない限り、示した範囲、値、配列または構造の±10%を意味する。本明細書で使用する場合、用語「一つの(a)」及び「一つの(an)」は、特に断りのない限り、または文脈で示されない限り、列挙した成分「の1つ以上」を指すと理解されるべきである。選択肢（例えば「または」）の使用は、代替物のいずれか1つ、両方、または選択肢の任意の組み合わせを意味すると理解されなければならない。本明細書で使用する場合、用語「含む(include)」及び「含む(comprise)」は同義語として使用される。加えて、本明細書に記載される構造及び置換基の種々の組み合わせに由来する、個々の単鎖ポリペプチドまたは抗原結合構築物は、各単鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体が個々に説明されているかのごとく、本出願により開示されていると理解されるべきである。したがって、個々の単鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体を形成するための特定の成分の選択は、本開示の範囲内である。

20

【0014】

本明細書で使用するセクションの見出しは単に組織的な目的のみのためであり、記載された主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

30

【0015】

本明細書に記載される方法及び組成物は、本明細書に記載される特定の方法論、手順、細胞株、構築物及び試薬に限定されず、変化し得るものと理解されなければならない。また、本明細書で使用する用語は単に特定の実施形態を記述する目的のためのものであり、本明細書に記載される方法及び組成物の範囲を限定することを意図するものではないと理解されなければならない。この方法及び組成物は添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0016】

特許、特許出願、記事、書籍、取扱説明書、及び学術論文を含むがこれらに限定されない、出願に引用される全ての文書、または文書の一部は、任意の目的のため、それら全体が本明細書に明示的に参照として組み込まれる。本明細書で触れられている全ての出版物及び特許は、例えば出版物中に説明されている構築物及び方法論を記述または開示する目的のために、それら全体が、本明細書に参照として組み込まれ、本明細書に記載される方法、組成物及び化合物と組み合わせられて使用されてよい。本明細書で論じる出版物は、本出願の出願日に先立つ開示のためだけに提供される。本明細書におけるいかなるものも、本明細書に記載される発明者らは、先行発明、または任意の他の理由のために、かかる開示に先行する権利を有しないということを認めたものである、と解釈されるべきではない。

40

50

【0017】

本出願において、アミノ酸の名前及び原子名（例えばN、O、C等）は、IUPAC命名法（Eur. J. Biochem., 152, 1 (1985)の修正を組み合わせた、IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984)）Protein Data Bank (PDB) (www.pdb.org)で定義される通りに使用される。

【0018】

抗原結合構築物

抗原結合構築物とは、任意の作用物質、例えば抗原に結合可能なポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。抗原結合構築物は単量体、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；抗体もしくは抗体断片；scFvなどであることができる。

【0019】

用語「二重特異的な」とは、2つの異なる結合特異性を有する作用物質、例えば抗原結合構築物を含むことを目的としている。例えば、いくつかの実施形態では、作用物質は（a）細胞表面標的分子及び（b）エフェクター細胞表面のFc受容体と、結合または相互作用してよい。別の実施形態において、作用物質は（a）第1の細胞表面標的分子及び（b）第1の細胞表面ターゲット分子とは異なる第2の細胞表面標的分子と、結合または相互作用してよい。別の実施形態において、作用物質は2つの細胞を結合及び架橋してよい、即ち、（a）第1の細胞上の第1の細胞表面標的分子及び（b）第1の細胞表面標的分子とは異なる第2の細胞上の第2の細胞表面標的分子と、相互作用してよい。

【0020】

用語「多重特異的な」または「異種特異的な」とは、3つ以上の異なる結合特異性を有する任意の作用物質、例えば、抗原結合構築物を含むことを目的としている。例えば、作用物質は（a）これに限定されるわけではないが、細胞表面抗原等の細胞表面標的分子、（b）エフェクター細胞表面上のFc受容体、及び所望により（c）少なくとも1つの他の成分と、結合または相互作用してよい。別の実施形態では、作用物質は（a）これに限定されるわけではないが、細胞表面抗原等の細胞表面標的分子、（b）エフェクター細胞表面上の標的分子、及び/または（c）生物学的に関係性のある他の分子成分の2つ以上と、結合または相互作用してよい。したがって、本明細書に記載される抗原結合構築物の実施形態は、二重特異的、三重特異的、四重特異的、及び他の多重特異的分子を含むがこれらに限定されない。ある種の実施形態において、これらの分子は、例えばCD3抗原及び/またはCD19抗原、CD20抗原、並びに、エフェクター細胞上のFc受容体といった他の標的を対象にする。

【0021】

本明細書で使用する場合、「単離された」とは、同定され、その天然での細胞培養環境における成分から分離及び/または回収された作用物質を意味する。その自然環境における不純物成分は、診察または治療での抗原結合構築物の使用を妨げる材料であり、酵素、ホルモン、及びタンパク質または非タンパク質の溶質を含みうる。

【0022】

抗体

抗原結合構築物は抗体とすることができる。本明細書で使用する場合、「抗体」または「免疫グロブリン」とは、検体（抗原）に特異的に結合してこれらを認識する、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされたポリペプチドまたはこれらの断片を意味する。認識されている免疫グロブリン遺伝子は、
、
、
、
及び μ 定常領域遺伝子、並びに種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は または のいずれかに分類される。抗体または免疫グロブリンの「クラス」とは、その重鎖により保有される定常ドメインまたは定常領域の種類を意味する。

10

20

30

40

50

抗体には5つの主なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらの幾つかは更に、例えばI g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁及びI g A₂等のサブクラス（アイソタイプ）に分割されてもよい。異なる免疫グロブリンのクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、
、
、
、及びμと呼ばれる。

【0023】

例示的免疫グロブリン（抗体）構造ユニットは2対のポリペプチド鎖で構成され、各対は1つの「軽」鎖（約25 kD）及び1つの「重」鎖（約50～70 kD）を有する。各鎖のN末端領域は、主に抗原認識を行う約100～110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語「可変軽鎖」（V L）及び「可変重鎖」（V H）とは、それぞれこれらの軽鎖及び重鎖ドメインを意味する。I g G₁重鎖は、NからC末端にかけてそれぞれ、V H、C H₁、C H₂及びC H₃ドメインを含む。軽鎖はNからC末端にかけて、V L及びC Lドメインを含む。I g G₁重鎖は、C H₁とC H₂ドメインの間にヒンジを含む。ある種の実施形態において、免疫グロブリン構築物は、治療用ポリペプチドに接続したI g G、I g M、I g A、I g D、またはI g Eのうち、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構築物に見出される免疫グロブリンドメインは、ダイアボディまたはナノボディ等の構築物に基づく免疫グロブリンからのものであるか、またはこれらに由来する。ある種の実施形態において、本明細書に記載される免疫グロブリン構築物は、ラクダ抗体等の重鎖抗体のうち少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。ある種の実施形態において、本明細書において提供する免疫グロブリン構築物は、ウシ抗体、ヒト抗体、ラクダ抗体、マウス抗体または任意のキメラ抗体等の哺乳類抗体のうち、少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。

10

20

【0024】

「F a b分子」とは、免疫グロブリンの重鎖のV H及びC H₁ドメイン（「F a b重鎖」）、並びに軽鎖のV L及びC Lドメイン（「F a b軽鎖」）からなるタンパク質を意味する。

【0025】

本明細書において、「F cドメイン」または「F c領域」は、定常領域の少なくとも一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然配列のF c領域と変異体のF c領域とを含む。I g G重鎖のF c領域の境界は僅かに変わりうるが、ヒトI g G重鎖F c領域は通常、C y s 2 2 6またはP r o 2 3 0から、重鎖のカルボキシル末端に伸びているように定義される。しかし、F c領域のC末端リジン（L y s 4 4 7）は存在しても、存在しなくてもよい。本明細書で特に指示がない限り、F c領域または定常領域のアミノ酸残基のナンバリングは、K a b a t e t a l , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D , 1 9 9 1に記載されている、E Uインデックスとも呼ばれるE Uナンバリングシステムに従う。本明細書で使用する場合、F cドメインの「サブユニット」とは、二量体のF cドメインを形成する2つのポリペプチドの1つ、即ち、免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含み、安定した自己会合が可能なポリペプチドを意味する。例えば、I g GのF cドメインのサブユニットはI g G C H₂、及びI g G C H₃定常ドメインを含む。

30

40

【0026】

「融合した」または「結合した」とは、成分（例えばF a b分子及びF cドメインサブユニット）がペプチド結合により、直接または1つ以上のペプチドリンカーを介して結合されていることを意味する。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「単鎖」とは、文字通りペプチド結合により結合したアミノ酸単量体を含む分子を意味する。ある種の実施形態において、抗原結合部位の1つは単鎖F a b分子、即ちF a b分子であり、F a b軽鎖及びF a b重鎖はペプチドリンカー

50

により接続し、単一のペプチド鎖を形成している。かかる特定の実施形態において、F a b 軽鎖の C 末端は、単鎖 F a b 分子内の F a b 重鎖の N 末端に接続している。他の特定の実施形態において、抗原結合部位の 1 つは、単鎖 F v 分子 (s c F v) である。本明細書でより詳細に記載されるように、s c F v は、ポリペプチド鎖によりその C 末端から重鎖可変ドメイン (V H) の N 末端側に接続した軽鎖可変ドメイン (V L) を有する。あるいは s c F v は、ポリペプチド鎖により V H の C 末端側が V L の N 末端側に結合したポリペプチド鎖を含む。

【 0 0 2 8 】

「クロスオーバー」F a b 分子 (「 C r o s s f a b 」とも称される) は、F a b 重鎖及び軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されている F a b 分子を意味する。即ち、クロスオーバー F a b 分子は軽鎖可変領域及び重鎖定常領域で構成されるペプチド鎖並びに重鎖可変領域及び軽鎖定常領域で構成されるペプチド鎖を含む。明確にするために、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変領域が交換されたクロスオーバー F a b 分子においては、重鎖定常領域を含むペプチド鎖は本明細書において、クロスオーバー F a b 分子の「重鎖」と呼ばれる。逆に、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の定常領域が交換されたクロスオーバー F a b 分子においては、重鎖可変領域を含むペプチド鎖は本明細書において、クロスオーバー F a b 分子の「重鎖」と呼ばれる。

10

【 0 0 2 9 】

「フレームワーク」または「F R」とは、超可変領域 (H V R) 残基以外の可変領域残基を意味する。可変領域の F R は通常、4 つの F R ドメイン : F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4 からなる。したがって、H V R 及び F R 配列は通常、V H (または V L) の以下の配列に現れる : F R 1 - H 1 (L 1) - F R 2 - H 2 (L 2) - F R 3 - H 3 (L 3) - F R 4。

20

【 0 0 3 0 】

「F c ドメインの第 1 及び第 2 のサブユニットの会合を促進する修飾」とは、F c ドメインサブユニットを含むポリペプチドの、同一のポリペプチドとの会合を低下または防止する F c ドメインサブユニットのペプチド骨格を操作または翻訳後修飾することで、ホモ二量体を形成することである。本明細書で使用する場合、会合を促進する修飾は特に、会合を所望する 2 つの F c ドメインサブユニット (即ち、F c ドメインの第 1 及び第 2 のサブユニット) それぞれを別々に修飾することを含み、2 つの F c ドメインサブユニットの会合及びヘテロ二量体の形成を促進する。例えばある種の実施形態において、会合を促進する修飾は、会合を好ましいものにするために、F c ドメインサブユニットの 1 つまたは両方の構造または電荷を変化させる場合がある。

30

【 0 0 3 1 】

用語「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域に起因するこれらの生物活性を意味し、抗体のアイソタイプを変える場合がある。抗体のエフェクター機能の例としては、C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害 (C D C)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、抗体依存性細胞貪食 (A D C P)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体が仲立ちする抗原取込、細胞表面受容体 (例えば B 細胞受容体) の下方制御、並びに B 細胞活性化が挙げられる。

40

【 0 0 3 2 】

「活性化 F c 受容体」は、抗体の F c ドメインによるその後の関わりが、受容体を有する細胞を刺激してエフェクター機能を遂行するシグナル伝達を誘発する F c 受容体である。ヒト活性化 F c 受容体としては、F c R I I I a (C D 1 6 a)、F c R I (C D 6 4)、及び F c R I I a (C D 3 2) が挙げられる。

【 0 0 3 3 】

抗体依存性細胞傷害 (A D C C) は、免疫エフェクター細胞により抗体に被覆された標的細胞の細胞溶解を引き起こす免疫機構である。標的細胞は、F c 領域を含む抗体または誘導体が、一般的に F c 領域の N 末端であるタンパク質部分を介して特異的に結合する細胞である。本明細書で使用する場合、用語「低下した A D C C」は、上記で定義した A D

50

C Cのメカニズムにより、所与の時間、標的細胞を取り囲む媒質中の所与の濃度の抗体で溶解した標的細胞の数の減少、及び/または、A D C Cのメカニズムにより、所与の時間内に所与の標的細胞数の溶解を達成するのに必要な、標的細胞を取り囲む媒質における抗体濃度の増加のいずれかとして定義される。A D C Cの低下は、同一の標準的な（当業者に知られている）産生、精製、処方及び貯蔵方法を用いる、同一タイプの宿主細胞から産生した同一抗体により仲立ちされるA D C Cに関係しているが、未だに開発されていない。例えば、F cドメインにA D C Cを低下させるアミノ酸置換を含む抗体により仲立ちされるA D C Cの低下は、F cドメインにこのアミノ酸置換を有しない同一の抗体により仲立ちされるA D C Cに関係している。

【0034】

F c

本発明の抗原結合構築物は、二量体のF cを含む。いくつかの態様では、F cは少なくとも1つまたは2つのC_{H3}配列を含む。いくつかの態様では、F cは1つ以上のリンカーと共に、またはそれ無しで、第1のヘテロ二量体及び/または第2のヘテロ二量体と一体化している。いくつかの態様では、F cはヒトF cである。いくつかの態様では、F cはヒトIgGまたはIgG1 F cである。いくつかの態様では、F cはヘテロ二量体F cである。いくつかの態様では、F cは少なくとも1つまたは2つのC_{H2}配列を含む。

【0035】

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

【0036】

いくつかの態様では、F cは、2011年11月4日に出願された国際出願CA2011/001238号、または2012年11月2日に出願された国際出願CA2012/050780号に記載されているF cであり、これらそれぞれの開示全体があらゆる目的のため、参照として本明細書に組み込まれる。

【0037】

修飾C_{H3}

いくつかの態様では、本明細書に記載される構築物は、非対称に修飾された修飾C_{H3}ドメインを含むヘテロ二量体F cを含む。ヘテロ二量体F cは2つの重鎖定常ドメインポリペプチド：第1の重鎖ポリペプチド及び第2の重鎖ポリペプチドを含むことができ、これらは、F cが1つの第1の重鎖ポリペプチド及び1つの第2の重鎖ポリペプチドを含むのであれば、交換可能に用いることができる。一般に、第1の重鎖ポリペプチドは第1のC_{H3}配列を含み、第2の重鎖ポリペプチドは第2のC_{H3}配列を含む。

【0038】

2つのC_{H3}配列が二量体化する場合、非対称に導入された1つ以上のアミノ酸修飾を含む2つのC_{H3}配列は通常、ホモ二量体ではなくヘテロ二量体F cをもたらす。本明細書で使用する場合、「非対称なアミノ酸修飾」とは、第1のC_{H3}配列の特定の位置におけるアミノ酸が同じ位置の第2のC_{H3}配列のアミノ酸と異なり、第1及び第2のC_{H3}配列が好ましくは、対をなしてホモ二量体ではなくヘテロ二量体を形成する、あらゆる修飾を意味する。このヘテロ二量体化は、各配列の、それぞれ同一のアミノ酸位置における2つのアミノ酸の1つのみの修飾、または第1及び第2のC_{H3}配列のそれぞれにおける、それぞれ同一の位置における各配列のアミノ酸の両方の修飾の結果であることができる。ヘテロ二量体F cの第1及び第2のC_{H3}配列は、1つ以上の非対称なアミノ酸修飾を含むことができる。

【0039】

表Aは、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231~447に対応する、ヒトIgG1 F c配列のアミノ酸配列を提供する。C_{H3}配列は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸341~447を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

通常、Fcは二量体化可能な2つの連続した重鎖配列（A及びB）を含むことができる。いくつかの態様では、Fcの配列の一方または両方は、以下の位置で1つ以上の変異または修飾を含む：EUナンバリングを使用したL351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400、及び/またはN390。いくつかの態様では、Fcは表Xに示す変異配列を含む。いくつかの態様ではFcは、変異体1A - Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体2A - Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは、変異体3A - Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは変異体4A - Bの変異を含む。いくつかの態様では、Fcは変異体5A - Bの変異を含む。

10

【 0 0 4 1 】

(表A) IgG1 Fc配列

| | | |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| ヒトIgG1 Fc配列231~447 (EUナンバリング) | APELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:370) | |
| 変異体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 |

20

【 0 0 4 2 】

第1及び第2のCH3配列は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231~447に関して、本明細書に記載したアミノ酸変異を含むことができる。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、F405及びY407の位置にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列、並びにT394の位置にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含む。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351Y、F405A及びY407Vから選択される1つ以上のアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列、並びにT366L、T366I、K392L、K392M、及びT394Wから選択される1つ以上のアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含む。

30

【 0 0 4 3 】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407の位置にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列、並びにT366、K392及びT394の位置にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列、並びにQ347のアミノ酸修飾を更に含む前記第1及び第2のCH3配列の1つ、並びにK360を含む他のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407の位置にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列、並びにT366、K392及びT394の位置にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列、並びにQ347のアミノ酸修飾を更に含む前記第1及び第2のCH3配列の1つ、並びにK360を含む他のCH3配列、並びに、T350Vを含む、前記CH3配列の一方または両方、を有する修飾CH3ドメインを含む。

40

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407の位置にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列、並びにT366、K392及びT394の位置にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列、並びにD399RまたはD399Kのアミノ酸修

50

飾を更に含む前記第 1 及び第 2 の C H 3 配列の 1 つ、並びに T 4 1 1 E、T 4 1 1 D、K 4 0 9 E、K 4 0 9 D、K 3 9 2 E 及び K 3 9 2 D の 1 つ以上を含む他の C H 3 配列を有する修飾 C H 3 ドメインを含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体 F c は、L 3 5 1、F 4 0 5 及び Y 4 0 7 の位置にアミノ酸修飾を有する第 1 の C H 3 配列、並びに T 3 6 6、K 3 9 2 及び T 3 9 4 の位置にアミノ酸修飾を有する第 2 の C H 3 配列を有する修飾 C H 3 ドメインを含み、前記第 1 及び第 2 の C H 3 配列の 1 つは更に、D 3 9 9 R または D 3 9 9 K のアミノ酸修飾、及び T 4 1 1 E、T 4 1 1 D、K 4 0 9 E、K 4 0 9 D、K 3 9 2 E 及び K 3 9 2 D の 1 つ以上を含む他の C H 3 配列を含み、前記 C H 3 配列の一方または両方は更に、T 3 5 0 V のアミノ酸修飾を含む。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、ヘテロ二量体 F c は、L 3 5 1、F 4 0 5 及び Y 4 0 7 の位置にアミノ酸修飾を有する第 1 の C H 3 配列、並びに T 3 6 6、K 3 9 2 及び T 3 9 4 の位置にアミノ酸修飾を有する第 2 の C H 3 配列を有する修飾 C H 3 ドメインを含み、前記 C H 3 配列の一方または両方は更に、T 3 5 0 V のアミノ酸修飾を含む。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、ヘテロ二量体 F c は以下のアミノ酸修飾を含む修飾 C H 3 ドメインを含み、「A」は第 1 の C H 3 配列へのアミノ酸修飾を表し、「B」は第 2 の C H 3 配列への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, 及び/または

B:T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

【 0 0 4 7 】

1 つ以上の非対称なアミノ酸修飾はヘテロ二量体 F c の形成を促進することができ、ここでヘテロ二量体の C H 3 ドメインは、野生型ヘテロ二量体の C H 3 ドメインに相当する安定性を有する。一実施形態において、1 つ以上の非対称なアミノ酸修飾はヘテロ二量体の F c ドメインの形成を促進し、ここでヘテロ二量体の F c ドメインは、野生型ホモ二量体の F c ドメインに相当する安定性を有する。一実施形態では、1 つ以上の非対称なアミノ酸修飾はヘテロ二量体の F c ドメインの形成を促進し、ここでヘテロ二量体の F c ドメインは示差走査熱量計調査において融解温度 (T m) により観察された安定性を有し、融解温度は、対応する対称な野生型ホモ二量体 F c ドメインで観察される融解温度の 4 以内である。いくつかの態様では、F c は、C H 3 配列のうち少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の修飾を含み、これは野生型ホモ二量体 F c に相当する安定性を有するヘテロ二量体 F c の形成を促進する。

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、C H 3 ドメインの安定性は、例えば示差走査熱量計 (D S C) により C H 3 ドメインの融解温度を測定することにより評価することができる。したがって、更なる実施形態において、C H 3 ドメインは約 6 8 以上の融解温度を有する。別の実施形態において、C H 3 ドメインは約 7 0 以上の融解温度を有する。別の実施形態において、C H 3 ドメインは約 7 2 以上の融解温度を有する。別の実施形態において、C H 3 ドメインは約 7 3 以上の融解温度を有する。別の実施形態において、C H 3 ドメインは約 7 5 以上の融解温度を有する。別の実施形態において、C H 3 ドメインは約 7 8 以上の融解温度を有する。いくつかの態様では、二量体化した C H 3 配列は約 6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 7 . 5、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4 または 8 5 以上の融解温度 (T m) を有する。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、修飾 C H 3 配列を含むヘテロ二量体 F c は、発現した生成物

10

20

30

40

50

内のホモ二量体Fcと比較して、少なくとも約75%の純度で形成されることができる。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは約80%より高い純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは約85%より高い純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは約90%より高い純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは約95%より高い純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは約97%より高い純度で形成される。いくつかの態様では、Fcは発現した際、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%より高い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は単一細胞を介して発現した際、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%より高い純度で形成されるヘテロ二量体である。

10

【0050】

単量体Fcポリペプチドを修飾してヘテロ二量体Fcの形成を促進する更なる方法は、PCT国際公開特許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)、及び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 U S A. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-50に記載されている。

20

30

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される単離された構築物は、抗原に結合する抗体構築物；並びに同じFcポリペプチドを含まない抗体構築物と比較して、安定性及び製造の容易さといった、優れた生物物理学的特性を有する二量体のFcポリペプチド構築物を含む。異なるFc受容体に対する抗体Fcの親和性を選択的に変化させるための、Fcの重鎖配列におけるいくつかの変異が、当技術分野において既知である。いくつかの態様では、Fcは、Fc受容体の選択的結合を促進するための1つ以上の修飾を含む。

【0052】

CH2ドメイン

FcのCH2ドメインは、表aに示す配列のアミノ酸231~340である。代表的な変異を以下に示す：

40

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

・ F243L / R292P / Y300L / V305I / P396L , F243L / R292P / Y300L / L235V / P396L (Stavenghagen 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. 2007

50

2011 Nov 30;13(6):R123);

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

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

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

・ S239D/D265S/S298A/I332E、S239E/S298A/K326A/A327H、G237F/S298A/A330L/I332E、S239D/I332E/S298A、S239D/K326E/A330L/I332E/S298A、G236A/S239D/D270L/I332E、S239E/S267E/H268D、L234F/S267E/N325L、G237F/V266L/S267D並びにWO2011/120134及びWO2011/120135にて記載されている他の変異(本明細書に参考として組み込まれる)。Therapeutic Antibody Engineering (by William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) の283頁の変異一覧。

【0053】

いくつかの実施形態では、CH2ドメインは1つ以上の非対称なアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、Fc Rの選択的結合を促進する1つ以上の非対称なアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、本明細書に記載される単離された構築物の分離及び精製を可能にする。

【0054】

エフェクター機能を向上させるための追加の修飾

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される構築物を修飾して、エフェクター機能を向上させることができる。かかる修飾は、当技術分野において既知であり、アフコシル化、または活性化受容体(主にADCCに関するFCGR3a)、及びCDCに関するC1qへの抗体のFc部分の親和性のエンジニアリングを含む。以下の表Bは、エフェクター機能エンジニアリングの文献中で報告されている種々の設計についてまとめている。

【0055】

したがって、一実施形態において、本明細書に記載される構築物は、向上したエフェクター機能を付与する表Bに記載した1つ以上のアミノ酸修飾を含む二量体Fcを含むことができる。別の実施形態では、構築物をアフコシル化してエフェクター機能を向上させることができる。

【0056】

(表B) CH2及びエフェクター機能のエンジニアリング

10

20

30

40

| 参照 | 変異 | 効果 |
|--|-------------------------------|---------|
| Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011 | アフコシル化 | 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, 非特異的変異 | ADCCの増大 |
| Heider, 2011 | 37.1, 変異は開示されない | ADCCの増大 |
| Moore, 2010 | S267E/H268F/S324T | CDCの増大 |

10

20

【 0 0 5 7 】

FcRn 結合及びPKパラメータ

従来技術で公知のように、FcRnへの結合により、エンドサイトーシスにより取り込まれた抗体がエンドソームから血流に戻り再利用される (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12: 181 - 220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18: 739 - 766)。このプロセスは、完全長分子が大型サイズであるために腎臓濾過されないことと組み合わせ、1~3週間の範囲にわたる、抗体血清の好ましい半減期をもたらす。FcがFcRnに結合することはまた、抗体輸送でも重要な役割を果たす。したがって、一実施形態において、本発明の構築物はFcRnに結合可能である。

30

【 0 0 5 8 】

Fc R補体結合及び/またはエフェクター機能を低下させるFc修飾は、当技術分野において既知である。近年の出版物は、受容体活性を低下させるかなくした抗体をエンジニアリングするために使用されている戦略を記載している (Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20: 685 - 691、及びStrohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225 - 249を参照のこと)。これらの戦略としては、グリコシル化修飾によるエフェクター機能の低下、IgG2/IgG4足場の使用、または抗体のFc領域のヒンジもしくはCH2領域での変異の導入が挙げられる。例えば、米国特許公報2011/0212087 (Strohl)、PCT国際公開特許WO2006/105338 (Xencor)、米国特許公報2012/0225058 (Xencor)、米国特許公報2012/0251531 (

40

50

Genentech)、及びStrop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420:204-219)は、FcR、またはFcへの補体結合を減少させるための特異的な修飾について記載している。

【0059】

特異的な既知のアミノ酸修飾の非限定例としては、以下の表で特定されるものが挙げられる。

【0060】

(表C) FcR、またはFcへの補体結合を低下させるための修飾

| 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/IGG4combo |
| 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、おそらくC226S/P230S |

10

20

30

【0061】

一実施形態では、Fcは、上記表で同定された少なくとも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のうち少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234、L235及びD265のアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234A、L235A及びD265Sのアミノ酸修飾を含む。

40

【0062】

リンカー

本明細書に記載される構築物は、本明細書に記載されるFcに機能的に結合した、本明細書に記載される1つ以上のヘテロ二量体を含むことができる。いくつかの態様では、Fcは1つ以上のリンカーにより、またはそれ無しで、1つ以上のヘテロ二量体に結合する。いくつかの態様では、Fcは1つ以上のヘテロ二量体に直接結合する。いくつかの態様では、Fcは1つ以上のリンカーにより、1つ以上のヘテロ二量体に結合する。いくつかの態様では、Fcはリンカーにより、各ヘテロ二量体の重鎖に結合する。

50

【0063】

いくつかの態様では、1つ以上のリンカーは1つ以上のポリペプチドリンカーである。
いくつかの態様では、1つ以上のリンカーは1つ以上のIgG1ヒンジ領域を含む。

【0064】

フォーマット s c F v

本明細書に記載される抗原結合構築物は二重特異的であり、例えば、これらは、それぞれが2つの異なる抗原に特異的に結合可能な少なくとも2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。1つの抗原結合ポリペプチド構築物は s c F v フォーマットである。(即ち、抗原結合ドメインは重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインで構成される)一実施形態では、前記 s c F v 分子はヒトである。別の実施形態において、前記 s c F v 分子はヒト化されている。

10

【0065】

s c F v 分子において、軽鎖可変領域のC末端は重鎖可変領域のN末端へと接続されてもよい、または、重鎖可変領域のC末端は軽鎖可変領域のN末端へと接続されてよい。

【0066】

可変領域は直接、または典型的には、機能性抗原結合部位の形成を可能にするリンカーペプチドを介して接続されてよい。典型的なペプチドリンカーは約2~20個のアミノ酸を含み、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において既知である。好適な非免疫原性のペプチド類としては例えば、(G4S)_n、(SG4)_n、(G4S)_n、G4(SG4)_n または G2(SG2)_n リンカーペプチドが挙げられ、式中nは通常1~10の数字、典型的には2~4の数字である。

20

【0067】

s c F v 分子は更に、例えば Reiter et al. (Nat Biotechnol 14, 1239-1245 (1996)) に記載されているように、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間のジスルフィド架橋により安定化されてもよい。したがって、一実施形態において、T細胞を活性化する本発明の二重特異的抗原結合分子は、s c F v 分子を含み、重鎖可変ドメインのアミノ酸と軽鎖可変ドメインのアミノ酸は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間にジスルフィド架橋を形成可能なように、システインにより置き換えられている。特異的な実施形態においては、軽鎖可変ドメインの44番目の位置のアミノ酸、及び重鎖可変ドメインの100番目の位置のアミノ酸はシステインで置換されている(Kabatナンバリング)。

30

【0068】

従来技術で公知なように、[Miller et al., Protein Eng Des Sel. 2010 Jul; 23(7): 549-57; Igawa et al., MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 243-5; Perchiai & Tessier, Annu Rev Chem Biomol Eng. 2012; 3: 263-86.] に記載されている通り、s c F v は CDR 配列の変異によっても安定化することができる。

【0069】

HVR及びCDR

用語「超可変領域」または「HVR」は、本明細書で使用する場合、配列内で超可変性である、及び/または構造的に規定されるループ(「超可変ループ」)を形成する、抗体可変領域の各領域を意味する。一般に、内在性の4鎖抗体は6つのHVR; VH(H1、H2、H3)内の3つ、及びVL(L1、L2、L3)内の3つを含む。HVRは一般に、超可変ループからの、及び/または相補性決定領域(CDR)からのアミノ酸残基を含み、後者は配列変動性が最も高く、かつ/または抗原認識に関係する。VHにおけるCDR1の例外はあれど、CDRは通常、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「相補性決定領域」(CDR)とも呼ばれ、これらの用語は、抗原認識領域を形成する可変領域の部分に関して、本明細書では同じ意味で用いられる。この特殊な領域は Kabat et al., U.S. Dept. of Health and

40

50

Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983)、及び Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987) により記載されており、互いに比較した場合、この定義はアミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。しかし、抗体またはその変異体の CDR を指すためにいずれかの定義を用いることは、本明細書において定義及び使用されている、この用語の範囲内であることが意図されている。上記で引用した各参照で定義される CDR を包含する適切なアミノ酸残基を、比較のため表 1 にて以下で説明する。特定の CDR を包含する正確な残基数は、CDR の配列及びサイズに応じて変化する。抗体の可変領域アミノ酸配列があれば、当業者は機械的に、どの残基が特定の CDR を含むかを測定することができる。

10

【0070】

抗原

抗原結合構築物は、少なくとも 1 つの抗原、例えば CD3 抗原及び/または CD19 抗原と特異的に結合する。本明細書で使用する場合、用語「抗原決定基」は「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部位が結合し、抗原結合部位複合体を形成するポリペプチド巨大分子上の部位（例えば、アミノ酸が連続する区域、または非連続アミノ酸の異なる領域で作られた高次構造の配置）を意味する。例としては、CD3 抗原、CD19 抗原、及び CD20 抗原が挙げられる。

【0071】

有用な抗原決定基は例えば、腫瘍細胞の表面上、ウイルス感染細胞の表面上、他の病気にかかった細胞の表面上、免疫細胞の表面上、血液血清中に遊離した状態で、及び/または細胞外マトリックス (ECM) 内に見出すことができる。本明細書で抗原と称されるタンパク質（例えば CD3、CD19、及び CD20）は、特に指示がない限り、霊長類（例えばヒト）並びに齧歯類（例えばマウス及びラット）等の哺乳類を含む、任意の脊椎動物源からの、天然型の任意のタンパク質とすることができる。特定の実施形態では、抗原はヒトタンパク質である。本明細書で、特異的タンパク質を参照する場合、用語は「完全長」の未処理のタンパク質、及び細胞内での処理により得られたタンパク質の任意の形態を包含する。この用語はまた、タンパク質の天然変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体を包含する。抗原として有用な他のヒトタンパク質としては、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 としても知られる黒色腫関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (MCSF) (UniProt no. Q6UVK1 (version 70), NCBI RefSeq no. NP_001888.2); セブラーゼとしても知られる線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) (UniProt nos. Q12884, Q86Z29, Q99998, NCBI Accession no. NP_004451); 癌胎児性抗原関連細胞付着分子 5 としても知られる、癌胎児性抗原 (CEA) (UniProt no. P06731 (version 119), NCBI RefSeq no. NP_004354.2); gp67 または Siglec-3 としても知られる CD33 (UniProt no. P20138, NCBI Accession nos. NP_001076087, NP_001171079); ErbB-1 または Her1 としても知られる上皮成長因子受容体 (EGFR) (UniProt no. P0053, NCBI Accession nos. NP_958439, NP_958440)、及び CD3、特に CD3 のサブユニット（ヒト配列に関しては、UniProt no. P07766 (version 130), NCBI RefSeq no. NP_000724.1; またはマカクザル [カニクイザル (Macaca fascicularis)] 配列に関しては UniProt no. Q95LI5 (version 49), NCBI GenBank no. BAB71849.1) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0072】

ある種の実施形態において、本発明の T 細胞活性化二重特異的抗原結合分子は、異なる種の活性化 T 細胞抗原または標的抗原内で保存された、活性化 T 細胞抗原または標的細胞

50

抗原のエピトープに結合する。

【0073】

「特異的結合」または「選択的結合」とは、結合が抗原に対して選択的であり、不必要なあるいは非特異的な相互作用から区別されることができることを意味する。抗原結合部位が特異的な抗原決定基に結合する能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、または当業者によく知られている他の技術、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)技術(BIACore機器上で分析)(Liljebblad et al, Glyco J 17, 323-329(2000))、及び従来 of 結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))のいずれかにより測定することができる。一実施形態では、抗原結合部位が無関係のタンパク質に結合する程度は、例えばSPRにより測定される抗原結合部位の抗原への結合の約10%未満である。ある種の実施形態において、抗原に結合する抗原結合部位、または抗原結合部位を含む抗原結合分子は、 $< 1 \mu$ 、 $< 100 \text{ nM}$ 、 $< 10 \text{ nM}$ 、 $< 1 \text{ nM}$ 、 $< 0.1 \text{ nM}$ 、 $< 0.01 \text{ nM}$ 、または $< 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \sim 10^{-13} \text{ M}$)の解離定数(K_D)を有する。

10

【0074】

「親和性」とは、分子の単一の結合部位(例えば受容体)と、その結合パートナー(例えばリガンド)との非共有相互作用の合計の強さを意味する。特に指示がない限り、本発明で使用する場合、「結合親和性」とは結合ペアメンバー(例えば抗原結合部位と抗原、または受容体とそのリガンド)の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を意味する。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は通常、解離速度定数と会合速度定数(それぞれ k_{off} 及び k_{on})の比である解離定数(K_D)により表すことができる。したがって、速度定数比が同一のままである限り、同等の親和性は異なる速度定数を含んでよい。親和性は、本明細書に記載される技術を含む、当該技術分野において既知の十分に確立された方法により測定することができる。親和性を測定する特定の方法は、表面プラズモン共鳴(SPR)である。

20

【0075】

「結合の低下」、例えばFc受容体に対する結合の低下とは、例えばSPRにより測定したそれぞれの相互作用に関する親和性の低下を意味する。明確にするために、この用語は親和性のゼロ(または分析方法の検出限界以下)への低下、即ち相互作用の完全な消失もまた含む。逆に、「結合の増加」とは、それぞれの相互作用に関する結合親和性の増加を意味する。

30

【0076】

「活性化T細胞抗原」とは、本明細書で使用する場合、Tリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球の表面に発現した抗原結合分子との相互作用に際し、T細胞の活性化を誘発することが可能な抗原決定基を意味する。具体的には、抗原結合分子と活性化T細胞抗原との相互作用は、T細胞受容体複合体のシグナル伝達カスケードを引き起こすことにより、T細胞活性化を誘発し得る。特定の実施形態では、活性化T細胞抗原はCD3である。

【0077】

「T細胞活性化」とは、本明細書で使用する場合、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞毒性エフェクター分子の放出、細胞毒性活性、及び活性化マーカーから選択されるTリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球の1種以上の細胞応答を意味する。本発明のT細胞活性化二重特異的抗原結合分子は、T細胞活性化を誘発することができる。T細胞活性化を測定するのに好適なアッセイは、本明細書に記載される当該技術分野において既知である。

40

【0078】

「標的細胞抗原」とは、本明細書で使用する場合、標的細胞、例えばがん細胞または腫瘍間質細胞等の腫瘍内のB細胞の表面に提示された抗原決定基を意味する。本明細書で使用する場合、抗原結合部位に関して用語「第1」及び「第2」は、2つ以上の各種の部位が存在する場合、便宜的な区別のために使用される。これらの用語を使用することは、明示的に記述される場合を除いて、T細胞活性化二重特異的抗原結合分子の特定の順序ま

50

たは方向を付与することを目的としていない。

【0079】

用語「異種間結合」または「種間結合」は、本明細書で使用する場合、本明細書に記載される結合領域の、ヒト及び他の生命体、例えば、これらに限定されないがチンパンジーでない霊長類における同一の標的分子への結合を意味する。したがって、「異種間結合」または「種間結合」は、「X」以外の分子にではなく、異なる種において発現した同一分子「X」（即ち類似体）に対する種間の反応性として理解されなければならない。例えばヒトCD3を認識するモノクローナル抗体の、チンパンジーではない霊長類のCD3、例えばマカクCD3への異種間特異性は、例えばFACS分析により、測定することができる。FACS分析は、それぞれのモノクローナル抗体が、ヒト及びチンパンジーではない霊長類CD3抗原をそれぞれ発現する、前記ヒト及びチンパンジーではない霊長類細胞、例えばマカク細胞に結合することを試験するという方法で実施される。更なるアッセイは、当業者に周知である。上述の主題は、PSCA、CD19、C-MET、エンドシアリン、EpCAM、IGF-1R及びFAP抗原に準用して適用される。例えばヒトPSCA、CD19、C-MET、エンドシアリン、EpCAM、IGF-1RまたはFAPを認識するモノクローナル抗体の、チンパンジーではない霊長類PSCA、CD19、C-MET、エンドシアリン、EpCAM、IGF-1RまたはFAPへの異種間特異性は、例えばFACS分析により、測定することができる。FACS分析は、それぞれのモノクローナル抗体が、ヒト及びチンパンジーではない霊長類PSCA、CD19、C-MET、エンドシアリン、EpCAM、IGF-1RまたはFAP抗原をそれぞれ発現する、前記ヒト及びチンパンジーではない霊長類細胞、例えばマカク細胞に結合することを試験するという方法で実施される。

10

20

【0080】

CD3、CD19、及びCD20

本発明の抗原結合構築物としては、CD3抗原並びに/またはCD19抗原及び/もしくはCD20抗原に、一価でかつ特異的に結合する抗原結合ポリペプチド構築物が挙げられる。

【0081】

本明細書に記載した「CD3」または「CD3複合体」は、非共有結合で互いにかつT細胞受容体に会合した、成熟Tリンパ球内の少なくとも5つの膜結合ポリペプチドの複合体である。CD3複合体としては、 α 、 β 、 γ 及び δ 鎖（サブユニットとも称される）が挙げられる。幾つかのこれらの鎖に対して、マウス抗体OKT3、SP34、UCHT1または64.1に例示される非ヒトモノクローナル抗体が開発されてきた。（例えば、June, et al., J. Immunol. 136: 3945-3952 (1986); Yang, et al., J. Immunol. 137: 1097-1100 (1986); 及び Hayward, et al., Immunol. 64: 87-92 (1988)を参照のこと）。例えば固定化された抗CD3抗体により、T細胞上でCD3をクラスター化することは、T細胞受容体の関与に似てはいるがそのクローンの典型的な特異性に影響を受けない、T細胞活性化をもたらす。大部分の抗CD3抗体はCD3鎖を認識する。

30

40

【0082】

一実施形態において、二重特異的抗原結合構築物は、OKT3 (ORTHOCLONE-OKT3 (商標) (ムロモナブCD3)); テプリズマブ (商標) (MGA031, Eli Lilly); 種間反応性抗CD3 (Micromet, US2011/0275787); プリナツモマブ (商標); UCHT1 (Pollard et al. 1987 J Histochem Cytochem. 35 (11): 1329-38); NI0401 (WO2007/033230); ビジリズマブ (US25834597) に由来する、CD3抗原に一価でかつ特異的に結合するCD3抗原結合ポリペプチドを含む。一実施形態では、二重特異的抗原結合構築物は、CD3に一価でかつ特異的に

50

結合するCD3抗原結合ポリペプチドを含み、前記CD3抗原結合ポリペプチドのVH及びVL領域は、X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、WT31、WT32、SPV-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2及びF101.01からなる群から選択されるCD3特異的抗体に由来する。

【0083】

本発明によれば、前記VH及びVL領域は、他のTCRサブユニットとの関係において、ヒトCD3を特異的に認識することができる抗体誘導体等に由来する。

10

【0084】

可変領域(VH及びVL)が本発明の医薬組成物に含まれる二重特異的抗原結合構築物において用いられるようにするヒトCD19に対する抗体/抗体分子/抗体誘導体類は、当該技術分野において既知である。一実施形態では、CD19結合抗原結合ポリペプチドは、例えば4G7(Meecker(1984)Hybridoma 3,305-20);B4(Freedman(1987)Blood 70,418-27);B43(Bejcek(1995)Cancer Res. 55,2346-51);BU12(Callard et al., J. Immunology, 148(10):2983-7(1992), Flavell(1995)Br. J. Cancer 72,1373-9);CLB-CD19(De Rie(1989)Cell. Immunol. 118,368-81);Leu-12(MacKenzie(1987), J. Immunol. 139,24-8);SJ25-C1(GenTrak, Plymouth Meeting, Pa.), J4.119(Beckman Coulter, Krefeld, Germany), B43(PharMingen, San Diego, Calif.), SJ25C1(BD PharMingen, San Diego, Calif.), FMC63(IgG2a)(Zola et al., Immunol. Cell. Biol. 69(PT6):411-22(1991);Nicholson et al., Mol. Immunol., 34:1157-1165(1997);Pietersz et al., Cancer Immunol. Immunotherapy, 41:53-60(1995)),及び/またはHD237(IgG2b)(Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna, Austria, 1989;並びにPezzutto et al., J. Immunol., 138(9):2793-2799(1987))といったヒトCD19に対する抗体に由来する。CD19抗原結合ポリペプチドはまた、Mor-208、MEDI-551、MDX-1342等の抗体、またはHammer(2012)Mabs 4:5,571-577に記載されているような他の抗CD19抗体からも由来し得る。更に他の実施形態では、前記VH(CD19)及びVL(CD19)領域(またはそのCDR等の一部)は、HD37ハイブリドマにより提供される抗体(Pezzutto(1997), J. Immunol. 138,2793-9)に由来する。

20

30

40

【0085】

CD20は、成熟B細胞の細胞膜に発現する、非グリコシル化リンタンパク質である。95%を超えるB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)及び他のB細胞悪性疾患で発現するが、前駆体B細胞、樹状細胞及び形質細胞には存在しないため、CD20はB細胞腫瘍関連抗原と考えられている。抗CD20抗体は、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞媒介性障害(ADCC)及び/またはアポトーシス誘発及び化学療法に対する感作により、CD20発現腫瘍細胞を殺すと考えられている。二重特異的抗原構築物は、抗CD20抗体であるリツキシマブ、オフアツムマブ、またはトシツモマブに由来することができる。リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))抗体は、CD20に対する、遺伝子組換えされたキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。リツキシマブは米国特許

50

出願公開 5,736,137 (Anderson et al.) にて「C2B8」と呼ばれる抗体である。CD20 抗原結合ポリペプチドは、Lim et al., Haematologica 2010; 95(1): 135-143 に記載される更なる抗CD20 抗体に由来することもできる。

【0086】

特定のCD 抗原の発現は、リンパ造血細胞の特異的分化系列に非常に限定されており、過去数年間にわたり、リンパ球特異的抗原に対する抗体が、インビトロまたは動物モデルのいずれかに効果的な治療を開発するために使用されてきた。これに関して、CD19 は大変有用な標的であることが証明された。CD19 は、プロB 細胞から成熟B 細胞までの全てのB 細胞分化系列に発現し、脱落することがなく、全てのリンパ腫細胞に均一に発現し、かつ幹細胞には存在しない。

10

【0087】

CD3 複合体結合ポリペプチド構造体：

本明細書において提供する抗原のある種の実施形態において、前記抗原結合構築物は、少なくとも1つのCD3 発現細胞上のCD3 複合体に結合する、少なくとも1つのCD3 結合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCD3 結合ポリペプチド構築物は、CD3 特異的抗体、ナノボディ、フィブロネクチン、アフィボディ、アンチカリン、システインノットタンパク質、DARPin、アビマー、Kunitzドメイン、またはこれらの変異体もしくは誘導体のうち少なくとも1つのCD3 結合領域を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCD3 結合領域は、前記修飾を含まない対応するCD3 結合領域と比較して免疫原性を低下させる、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。一実施態様において、少なくとも1つのCD3 結合領域は、前記修飾を含まない対応するCD3 結合領域と比較して T_m で測定した安定性を増加させる、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つの修飾を含まない内在性CD3 結合ドメインと比較して、約3度の T_m の増加がある。いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つの修飾を含まない内在性CD3 結合ドメインと比較して、約5度の T_m の増加がある。いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つの修飾を含まない内在性CD3 結合ドメインと比較して、約8度の T_m の増加がある。いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つの修飾を含まない内在性CD3 結合ドメインと比較して、約10度の T_m の増加がある。

20

30

【0088】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される少なくとも1つのCD3 結合ポリペプチド構築物は、CD3 特異的抗体のうち少なくとも1つのCD3 結合ドメインを含み、前記CD3 特異的抗体は、軽鎖を欠いている重鎖抗体である。

【0089】

他の特定の実施形態において、本明細書に記載される少なくとも1つのCD3 結合ポリペプチド構築物は、非抗体タンパク質の足場ドメインに由来する少なくとも1つのCD3 結合ドメインを含む。

【0090】

ある種の実施形態において、CD3 結合ポリペプチド構築物は、CD3 結合Fab 構築物（即ち、重鎖及び軽鎖を含み、これらがそれぞれ可変領域及び定常領域を含む抗原結合構築物）である。いくつかの実施形態では、Fab 構築物は哺乳類である。一実施形態では、前記Fab 構築物はヒトである。別の実施形態において、前記Fab 構築物はヒト化されている。更に他の実施形態では、前記Fab 構築物はヒト重鎖及び軽鎖定常領域のうち少なくとも1つを含む。更なる実施形態において、前記Fab 構築物は単鎖Fab (scFab) である。

40

【0091】

ある種の実施形態において、CD3 結合ポリペプチド構築物はCD3 結合scFab 構造体を含み、Fab 軽鎖のC 末端は、ペプチドリンカーによりFab 重鎖のN 末端に結合している。ペプチドリンカーにより、機能的CD3 結合部位を形成するようにFab 重鎖

50

及び軽鎖を配置することが可能となる。ある種の実施形態において、F a b 重鎖及び軽鎖を接続するのに好適なペプチドリンカーは、例えば $(G_m S)_n - G G$ (配列番号: 360)、 $(S G_n)_m$ 、(配列番号: 361)、 $(S E G_n)_m$ (配列番号: 362) (式中及びnは0~20である)を含むがこれらに限定されない、グリシン-セリンリンカーを含む配列を含む。ある種の実施形態において、s c F a b 構築物はクロスオーバー構築物であり、F a b 軽鎖とF a b 重鎖の定常領域が交換される。クロスオーバーF a b の別の実施形態では、F a b 軽鎖とF a b 重鎖の可変領域が交換される。

【0092】

ある種の実施形態において、C D 3 結合ポリペプチド構築物は、C D 3 結合F v 構築物 (即ち、それぞれが可変領域を含む重鎖及び軽鎖を含む抗原結合構築物)を含む。幾つかの実施形態では、前記F v 構築物は哺乳類である。一実施形態では、前記F v 構築物はヒトである。別の実施形態において、前記F v 構築物はヒト化されている。更に他の実施形態では、前記F v 構築物は、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域のうち少なくとも1つを含む。更なる実施形態において、前記F v 構築物は単鎖F v (s c F v)である。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物のC D 3 結合ポリペプチド構築物は、C D 3 複合体のうち少なくとも1つの成分に結合する。ある特定の実施形態では、C D 3 結合ポリペプチド構築物は、C D 3 複合体のC D 3、C D 3、C D 3 またはC D 3 のうち少なくとも1つに結合する。ある種の実施形態において、C D 3 結合ポリペプチド構築物はC D 3 ドメインに結合する。ある種の実施形態において、結合ポリペプチド構築物はヒトC D 3 複合体に結合する。ある種の実施形態において、C D 3 結合ポリペプチド構築物は、C D 3 複合体のうち少なくとも1つのメンバーへの異種間結合を示す。

20

【0094】

少なくとも1つのC D 3 発現細胞上のC D 3 複合体に結合する、少なくとも1つのC D 3 結合ポリペプチド構築物を含む抗原結合構築物を本明細書で提供する。ここで、C D 3 発現細胞はT細胞である。ある実施態様では、C D 3 発現細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、C D 3 発現細胞は非ヒトの哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は細胞毒性T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞はC D 4⁺またはC D 8⁺T細胞である。

30

【0095】

本明細書において提供する抗原のある種の実施形態において、構築物はT細胞の細胞毒性活性を活性化し、B細胞等の標的細胞に向かわせることができる。特定の実施形態では、前記向かわせることは、標的細胞による、M H C が仲立ちするペプチド抗原の提示、及び/またはT細胞の特異性とは無関係である。

【0096】

例えば腫瘍細胞抗原などのB細胞抗原、及び活性化T細胞抗原に同時に結合することができる抗原結合構築物を、本明細書で提供する。一実施形態では、抗原結合構築物は、例えばC D 19またはC D 20等のB細胞抗原と、例えばC D 3等の活性化T細胞抗原とに同時に結合することにより、T細胞と標的B細胞を架橋することが可能である。一実施形態では、同時結合により標的B細胞、例えば腫瘍細胞が細胞溶解する。一実施形態では、かかる同時結合によりT細胞が活性化される。他の実施形態では、かかる同時結合は、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞毒性エフェクター分子の放出、細胞毒性活性、及び活性化マーカーの発現からなる群から選択されるTリンパ球、例えば細胞傷害性Tリンパ球の細胞応答をもたらす。一実施形態では、T細胞活性化二重特異的抗原結合分子が、標的細胞抗原への同時結合なしで活性化T細胞抗原に結合すると、T細胞活性化は行われない。

40

【0097】

C D 19及び/またはC D 20 B細胞結合ポリペプチド構築物:

少なくとも1つのB細胞上の標的抗原に結合する、少なくとも1つの抗原結合ポリペ

50

チド構築物を含む単離された抗原結合構築物を、本明細書で提供する。ある種の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物はB細胞CD21-CD19-CD81複合体のうち少なくとも1つのメンバーに結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物は、少なくとも1つのCD19結合領域、またはこれらの断片を含む。一実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物は少なくとも1つのCD20結合ドメインを含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合領域は、CD19またはCD20に特異的な抗体、ナノボディ、フィブロネクチン、アフィボディ、アンチカリン、システインノットタンパク質、DARPin、アビマー、Kunitzドメイン、またはこれらの変異体もしくは誘導体から得られるCD19またはCD20結合領域である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される少なくとも1つの抗原結合ポリペプチド構築物は、軽鎖を欠いている重鎖抗体である抗体のCD19またはCD20結合ドメインである、少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、前記修飾を含まない対応する抗原結合ドメインと比較して、免疫原性を低下させる少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むCD19またはCD20結合領域である。一実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、前記修飾を含まない対応するドメインと比較して、 T_m で測定した安定性を増加させる少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むCD19またはCD20結合領域である。

20

【0100】

ある種の実施形態において、少なくとも1つの抗原結合ポリペプチド構築物は、B細胞上のCD19及びCD20のうち少なくとも1つに結合するFab構築物である。いくつかの実施形態では、Fab構築物は哺乳類である。一実施形態では、前記Fab構築物はヒトである。別の実施形態において、前記Fab構築物はヒト化されている。更に他の実施形態では、前記Fab構築物はヒト重鎖及び軽鎖定常領域のうち少なくとも1つを含む。更なる実施形態において、前記Fab構築物は単鎖Fab(scFab)である。

【0101】

ある種の実施形態において、CD19及び/またはCD20結合ポリペプチド構築物は、scFab構築物を含み、Fab軽鎖のC末端は、ペプチドリinkerによりFab重鎖のN末端に結合している。ペプチドリinkerにより、CD19及び/またはCD20結合部位を形成するようにFab重鎖及び軽鎖を配置することが可能となる。ある種の実施形態において、Fab重鎖及び軽鎖を接続するのに好適なペプチドリinkerは、例えば $(G_mS)_n - GG$ (配列番号: 363)、 $(SG_n)_m$ 、(配列番号: 364)、 $(SEG_n)_m$ (配列番号: 365) (式中m及びnは0~20である)を含むが、これらに限定されないグリシン-セリンリンカーを含む配列を含む。ある種の実施形態において、scFab構築物はクロスオーバー構築物であり、Fab軽鎖とFab重鎖の定常領域が交換される。クロスオーバーFabの別の実施形態では、Fab軽鎖とFab重鎖の可変領域が交換される。

30

40

【0102】

ある種の実施形態において、少なくとも1つの抗原結合ポリペプチド構築物は、B細胞上のCD19及びCD20のうち少なくとも1つに結合するFv構築物である。幾つかの実施形態では、前記Fv構築物は哺乳類である。一実施形態では、前記Fv構築物はヒトである。別の実施形態において、前記Fv構築物はヒト化されている。更に他の実施形態では、前記Fv構築物は、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域のうち少なくとも1つを含む。更なる実施形態において、前記Fv構築物は単鎖Fv(scFv)である。

【0103】

ある種の実施形態において、抗原結合ポリペプチド構築物は、B細胞の表面上に発現する少なくとも1つの抗原への異種間結合を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記

50

載される抗原結合構築物の抗原結合ポリペプチド構築物は、哺乳類CD19及びCD20のうち少なくとも1つに結合する。ある種の実施形態において、結合ポリペプチド構築物はヒトCD19またはCD20に結合する。

【0104】

例えば腫瘍細胞等のB細胞抗原、及び活性化T細胞抗原に同時に結合することができる構築物を本明細書で提供する。一実施形態では、抗原結合構築物は、例えばCD19またはCD20等のB細胞抗原と、例えばCD3等の活性化T細胞抗原とに同時に結合することにより、T細胞と標的B細胞を架橋することが可能である。

【0105】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は、病気に関係する少なくとも1つのB細胞上の、CD19またはCD20等の標的抗原に結合する少なくとも1つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。いくつかの実施形態では、病気は癌腫、肉腫、白血病、リンパ腫及び神経膠腫から選択されるがんである。一実施形態では、がんは、扁平上皮細胞癌、腺癌、移行上皮細胞癌、骨肉腫及び軟部組織肉腫のうちの少なくとも1つである。ある種の実施形態において、少なくとも1つのB細胞はリンパ系細胞または骨髄細胞である自己免疫反応細胞である。

10

【0106】

更なる抗原結合構築物：

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は更に、GPA133、EpCAM、EGFR、IGFR、HER-2 neu、HER-3、HER-4、PSMA、CEA、MUC-1（ムチン）、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC7、CCR4、CCR5、CD19、CD20、CD33、CD30、ガングリオシドGD3、9-O-アセチル-GD3、GM2、ポリSA、GD2、カルボアンヒドラーゼIX（MN/CA IX）、CD44v6、ソニックヘッジホッグ（Shh）、Wue-1、形質細胞抗原（膜結合）、黒色腫コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCS P）、CCR8、TNF-前駆体、STEAP、メソテリン、A33抗原、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、Ly-6；デスモグレイン4、Eカドヘリンネオエピトープ、胎児性アセチルコリン受容体、CD25、CA19-9マーカー、CA-125マーカー及びミューラー管阻害因子（MIS）II型受容体、sTn（シアル化Tn抗原；TAG-72）、FAP（繊維芽細胞活性化抗原）、エンドシアリン、LG、SAS、EPHA4 CD63、サイトカインに付着したCD3抗体を含むCD3 BsAb免疫サイトカインTNF、IFN、IL-2、並びにTRAILのうち少なくとも1つに結合する少なくとも1つの結合ドメインを含む。

20

30

【0107】

ポリペプチド及びポリヌクレオチド

抗原結合構築物は少なくとも1つのポリペプチドを含む。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は本明細書において同じ意味で用いられ、アミノ酸残基の重合体を指す。即ち、ポリペプチドを指す記述は、ペプチドの記述及びタンパク質の記述に等しくあてはまり、逆もまた同様である。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が非天然でコードされたアミノ酸である、天然アミノ酸重合体及びアミノ酸重合体にあてはまる。本明細書で使用する場合、この用語は完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含し、アミノ酸残基は共有ペプチド結合により連結している。

40

【0108】

用語「アミノ酸」とは、天然及び非天然アミノ酸、並びに天然アミノ酸に似た方法で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物質を意味する。天然にコードされたアミノ酸は20種類の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プラリーヌ、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びパリン）並びにピロリシン及びセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同一の基本化学構造、即ち、水素に結合した炭素、カルボ

50

キシル基、アミノ基、及びR基を有する化合物、例えばホモセリン、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を意味する。かかる類似体は修飾R基（ノルロイシン等）または修飾したペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同一の基本化学構造を保持する。アミノ酸への言及は、例えば天然のタンパク新生L-アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導体等の、化学修飾アミノ酸であるD-アミノ酸； α -アラニン、オルニチン等の、天然の非タンパク新生アミノ酸；並びに当該技術分野において既知の特性を有する、化学合成してアミノ酸の特徴を示す化合物を含む。非天然アミノ酸の例としては、 β -メチルアミノ酸（例えば β -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）、側鎖中に余分なメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、及び側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基に置換されているアミノ酸（例えばシステイン酸）が挙げられるが、これらに限定されない。合成した非内在性アミノ酸、置換アミノ酸、または1種以上のDアミノ酸を含む非天然アミノ酸を本発明のタンパク質に組み込むことは、多数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等は、L-アミノ酸含有対応物と比べて、インビトロまたはインビボでの増大した安定性を示す。したがって、D-アミノ酸を組み込んだペプチド等の構築物は、一層大きな細胞内安定性が所望されるか、または必要とされる場合に、特に有用であることができる。より具体的には、D-ペプチド等は内因性ペプチダーゼ及びプロテアーゼに対して耐性があるため、かかる性質が所望される場合、分子の向上した生物学的利用能、及びインビボにおいて伸びた寿命を付与する。更に、D-ペプチド等は、主要組織適合遺伝子複合体クラスII拘束性のTヘルパー細胞への提示に対して、効率的に処理されることができないため、生命体全体において体液性免疫反応を誘発しにくい。

10

20

【0109】

本明細書で使用する場合、用語「エンジニアリングする、エンジニアリングされた、エンジニアリング」とは、ペプチド骨格の任意の操作、または天然もしくは組換えポリペプチドもしくはこれらの断片の翻訳後修飾を含むと考えられる。エンジニアリングは、アミノ酸配列、グリコシル化パターン、または個々のアミノ酸の側鎖基の修飾、及びこれらのアプローチの組み合わせを含む。エンジニアリングされたタンパク質は標準的な分子生物学技術により発現及び製造される。

【0110】

本発明には、抗原結合構築物のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。用語「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」は、2つ以上のヌクレオチド分子が連続する区域を示すことを意味する。ヌクレオチド配列はゲノム、cDNA、RNA、半合成または合成由来、またはこれらの任意の組み合わせであってよい。

30

【0111】

「単離された核酸分子またはポリヌクレオチド」は、その自然環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを指すことを目的としている。例えば、ベクター中に含ま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、単離していると考えられる。単離されたポリヌクレオチドの更なる例としては、異種宿主細胞内に保持され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挙げられる。単離されたポリヌクレオチドは、通常はポリヌクレオチド分子を含む細胞中に含まれるポリヌクレオチド分子を含むが、ポリヌクレオチド分子は、染色体外に、または天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。単離されたRNA分子は、インビボまたはインビトロのRNA転写産物、並びにプラス及びマイナス鎖形態、並びに二本鎖形態を含む。本明細書に記載される単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は更に、合成により、例えばPCRまたは化学合成により作製したかかる分子を含む。加えて、ある種の実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸は、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等の調節エレメントを含む。

40

【0112】

用語「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、一般に、例えば米国特許4,6

50

83, 195に記載されているような、インビトロで所望のヌクレオチド配列を増幅する方法を意味する。一般に、PCR法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイゼーション可能な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反復サイクルを伴う。

【0113】

本発明の参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸またはポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり、最大5つの点突然変異を含む場合があることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意味する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に少なくとも95%同一である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、参照配列中のヌクレオチドの最大5%が失われるか、もしくは別のヌクレオチドと置換されてよく、または、参照配列中の全ヌクレオチドのうちいくつか、最大5%のヌクレオチドが、参照配列に挿入されてよい。これらの参照配列の変更は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'位置で、または、これらの末端位置の間の任意の箇所で生じてよく、参照配列中の残基間に別々に、または参照配列内の1つ以上の連続した基の中に分散している。実際には、任意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に少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるかどうかは、従来より使用される、例えばポリペプチドに関して上述したようなもの(例えばALIGN-2)等の周知のコンピュータプログラムにより測定することができる。

10

20

【0114】

ポリペプチド誘導体または変異体は、誘導体または変異体のアミノ酸配列が、もとのペプチドの100のアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有しているのであれば、ペプチドと「相同性」を共有しているか、または「相同である」と言われる。ある種の実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体として同一数のアミノ酸残基を有するペプチド、またはペプチド断片のいずれかの配列と、少なくとも75%同一である。ある種の実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体として同一数のアミノ酸残基を有するペプチド、またはペプチド断片のいずれかの配列と、少なくとも85%同一である。ある種の実施形態において、誘導体のアミノ酸配列は、誘導体として同一数のアミノ酸残基を有するペプチド、またはペプチド断片と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、誘導体のアミノ酸配列は、誘導体として同一数のアミノ酸残基を有するペプチド、またはペプチド断片と少なくとも95%同一である。ある種の実施形態において、誘導体または変異体は、誘導体として同一数のアミノ酸残基を有するペプチド、またはペプチド断片のいずれかの配列と、少なくとも99%同一である。

30

40

【0115】

「保存的修飾された変異体」は、アミノ酸と核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、「保存的修飾された変異体」とは、同一または本質的に同一であるアミノ酸配列をコードするこれらの核酸、または核酸が、本質的に同一である配列についてあるアミノ酸配列をコードしない場合を意味する。遺伝暗号の縮退のため、機能が同一の多数の核酸は、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG及びGCUは全て、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、コドンによりアラニンが指定される全ての位置において、コドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンのいずれかと変更することができる。かかる核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的修飾された変異の1つの種である。本明細書における、ポリペプチドをコードする全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異についても記載している。当業者は、核酸内の各コドン(メチオニンに対する通常唯一のコドンであるAUG、及びトリプトファンに対する通常唯一のコドンであるTGGを除く)を修飾して、機能的に同一である分子を得ることができることを理解するであろう。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は、記載された各配列に内在する。

50

【0116】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードした配列において単一のアミノ酸または小さな割合のアミノ酸を変更、付加もしくは欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列へのそれぞれの置換、欠失または付加は、変更が、アミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、またはアミノ酸の、化学的に類似のアミノ酸との置換をもたらす「保存的修飾された変異体」であることを理解するであろう。機能的に同一のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に知られている。このような保存的修飾した変異体としては、本発明の多型変異体、種間同族体、及び対立遺伝子が挙げられる。

【0117】

機能的に同一のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に知られている。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する。

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

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

【0118】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の関係において、用語「同一の」またはパーセント「同一性」とは、同じである2つ以上の配列または部分配列を意味する。比較ウィンドウ、つまり以下の配列比較アルゴリズム（もしくは当業者が入手可能な他のアルゴリズム）の1つを用いるか、または手作業での配列比較及び目視により測定した指定領域に関する最大に対応関係について、比較して整列させた際に、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの割合を有する場合（即ち、指定領域において約50%の同一性、約55%の同一性、約60%の同一性、約65%の同一性、約70%の同一性、約75%の同一性、約80%の同一性、約85%の同一性、約90%の同一性、または約95%の同一性）、配列は「実質的に同一」である。本定義はまた、試験配列の相補体も指す。同一性は、少なくとも約50個の長さのアミノ酸もしくはヌクレオチドである領域にわたり、または少なくとも75~100個の長さのアミノ酸もしくはヌクレオチドの領域にわたり、または指定しない場合、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの配列全体にまたがり、存在することができる。ヒト以外の種の同族体を含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識したプローブによりライブラリーをスクリーニングし、かつ前記ポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNA及びゲノムクローンを単離する工程を含むプロセスにより入手してよい。かかるハイブリダイゼーション技術は当事者によく知られている。

【0119】

語句「選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」とは、その配列が複合体混合物（細胞全体またはライブラリーDNAもしくはRNAを含むがこれらに限定されない）中に存在する際に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で特定のヌクレオチド配列のみに、分子が結合、二本鎖形成、またはハイブリダイズすることを意味する。

【0120】

語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、当技術分野において既知である低イオン強度及び高温の条件下における、DNA配列、RNA配列、もしくは他の核酸配列、またはこれらの組み合わせのハイブリダイゼーションを意味する。通常、ス

10

20

30

40

50

トリンジェントな条件下で、プローブは、核酸（細胞全体またはライブラリーDNAもしくはRNAを含むがこれらに限定されない）の複合体混合物中の標的部分配列とハイブリダイズするが、複合体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に依存し、異なる状況では別のものとなる。より長い配列は、より高温で特異的に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大規模な手引きは、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)に見出される。

10

【0121】

抗原結合構築物の組換え及び合成による作製方法：

宿主細胞内でポリペプチドを発現することにより抗原結合構築物を作製する方法もまた本明細書に記載する。

【0122】

用語「発現カセット」とは、標的細胞内の特定の核酸の転写を可能にする特定の一連の核酸エレメントによって、組換えまたは合成により生成したポリヌクレオチドを意味する。組換え発現カセットはプラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、色素体DNA、ウイルス、または核酸断片に組み込むことが可能である。通常、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、他の配列内に、転写される核酸配列及びプロモーターを含む。ある種の実施形態において、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異的抗原結合分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0123】

用語「ベクター」または「発現ベクター」は「発現構築物」と同義であり、標的細胞中で特異的遺伝子と機能的に関連してその発現を導入及び誘導するのに使用されるDNA分子を意味する。この用語は自己複製核酸構造としてのベクター、及び宿主細胞のゲノムに組み込まれている既に導入されたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターは、多量の安定なmRNAの転写を可能にする。発現ベクターが標的細胞内に入ると、遺伝子によりコードされるリボ核酸分子またはタンパク質が、細胞転写及び/または翻訳機構により作製される。一実施形態では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異的抗原結合分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含む。

30

【0124】

「細胞」、「宿主細胞」及び「細胞株」は、本明細書では同じ意味で用いられ、かかる全ての用語は、細胞増殖または培養から得られた後代を含むと理解されなければならない。「形質転換」及び「トランスフェクション」は同じ意味で用いられ、細胞内にDNAを導入するプロセスを意味する。

【0125】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養」は同じ意味で用いられ、外因性核酸が導入された細胞を意味し、かかる細胞の後代を含む。宿主細胞は「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これらは初代形質転換細胞、及び継代数に関係なく、これらに由来する後代を含む。ある種の実施形態において、後代は親細胞と核酸含有量が完全に同一であるわけではなく、変異を含む場合がある。元の形質転換細胞でスクリーニングした、または選択したのと同じ機能または生物活性を有する変異後代が、本明細書に含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異的抗原結合分子を生成するのに使用することができる任意の種類細胞系である。宿主細胞としては、ほんのわずかの例を挙げると、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞またはハイブリドーマ細胞、酵母菌、昆虫細胞及び植物細胞等の、例えば哺乳類培養細胞といった培養細胞が挙げられ、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物または培養植物もしくは動物組織内に含まれる細

40

50

胞もまた挙げられる。

【0126】

安定した哺乳類細胞内で、本明細書に記載した抗原結合構築物を含有する発現生成物の作製方法を提供する。該方法は少なくとも1つの哺乳動物細胞に、前記第1のポリペプチド構築物をコードする少なくとも第1のDNA配列、及び前記第2のポリペプチド構築物をコードする少なくとも第2のDNA配列を、前記少なくとも1つの第1のDNA配列、前記少なくとも1つの第2のDNA配列が、前記少なくとも1つの哺乳動物細胞内に所定の割合でトランスフェクションされ安定した哺乳類細胞を生成するようにトランスフェクションすること；前記安定した哺乳類細胞を培養して、前記抗原結合構築物を含む前記発現生成物を作製することを含む。ある種の実施形態において、少なくとも1つの第1のDNA配列と、少なくとも1つの第2のDNA配列の前記所定の割合は、約1：1である。他の特定の実施形態において、少なくとも1つの第1のDNA配列と、少なくとも1つの第2のDNA配列の前記所定の割合は、該1つの第1のDNA配列が、例えば約2：1といったより大きな量となるように非対称となる。更に他の実施形態では、少なくとも1つの第1のDNA配列と、少なくとも1つの第2のDNA配列の前記所定の割合は、該1つの第1のDNA配列が、例えば約1：2といったより大きな量となるように非対称となる。選択的実施形態では、哺乳動物細胞は、VERO、HeLa、HEK、NS0、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、W138、BHK、COS-7、Caco-2及びMDC細胞、並びにこれらのサブクラス及び変異体からなる群から選択される。

10

【0127】

ある種の実施形態は、酵母菌、細菌等の微生物、またはヒトもしくは動物細胞株からの分泌による組換え分子として作製される抗原結合構築物である。実施形態において、ポリペプチドは宿主細胞から分泌される。

20

【0128】

実施形態としては、形質転換して本明細書に記載される抗原結合構築物タンパク質を発現する酵母細胞等の細胞が挙げられる。形質転換した宿主細胞そのものに加え、これらの細胞の培養物、好ましくは、培養液中の単一クローン性の（クローンが均質な）培養物、または単一クローン性の培養物に由来する培養物を提供する。ポリペプチドが分泌されると、細胞と共に、または細胞が濾過または遠心分離されると細胞を含まずに、培地にはポリペプチドが含まれるであろう。多くの発現系が知られており、細菌（例えば大腸菌（*E. coli*）及びバチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*））、酵母菌（例えばサッカロマイセス・セレビジエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、クルイベロマイセス・ラクティス（*Kluyveromyces lactis*）及びピキア・パストリス（*Pichia pastoris*））、糸状菌（例えばアスペルギルス（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞並びに昆虫細胞を含めて使用してよい。

30

【0129】

本明細書に記載される抗原結合構築物は従来の方法で、例えば宿主染色体に挿入されたコード配列、または遊離プラスミド上のコード配列から作製される。酵母菌は、例えばエレクトロポレーション等の有用な任意の方法により、所望のタンパク質に対するコード配列で形質転換される。エレクトロポレーションによる酵母菌の形質転換方法は、Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182に開示されている。

40

【0130】

形質転換に成功した細胞、即ち本発明のDNA構築物を含有する細胞は、周知の技術により同定することができる。例えば、発現構築物の導入により生じた細胞を増殖させて、所望のポリペプチドを生成することができる。細胞を採取して溶解させることができ、DNAの存在を確認するために、Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503またはBerent et al. (1985) *Biotech.* 3, 208により記載されているもの等の技術を用いて、これらのDNA含有量を調査した。あるいは

50

は、上清中のタンパク質の存在を、抗体を用いて検出することができる。

【0131】

有用な酵母菌プラスミドベクターとしては、pRS403 - 406及びpRS413 - 416が挙げられ、通常、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037, USAから入手することができる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405及びpRS406は酵母組込み型プラスミド(YIp)であり、酵母菌選択マーカーであるHIS3、7RP1、LEU2及びURA3を組み込む。プラスミドpRS413 - 416は、酵母菌セントロメアプラスミド(Ycp)である。

【0132】

相補的付着端を介して、DNAをベクターと機能的に連結する種々の方法が開発されてきた。例えば、相補的感光重合体域(photopolymer tracts)を、ベクターDNAに挿入されるDNAセグメントに添加することができる。ベクターとDNAセグメントは次に、相補的ホモポリマーの尾部間の水素結合により結合して、組換えDNA分子を形成する。

【0133】

1つ以上の制限酵素切断部位を含有する合成リンカーは、DNAセグメントをベクターに結合させる、代替の方法を提供する。突起状の単鎖末端を3'5'ヌクレオチド鎖分解性活性で除去し、くぼんだ3'端に重合活性を埋め込む酵素である、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼ1で、エンドヌクレアーゼ制限消化により作製したDNAセグメントを処理する。

【0134】

これらの活性の組み合わせはそれ故、平滑末端のDNAセグメントを作製する。平滑末端のセグメントを次いで、平滑末端のDNA分子のライゲーションを触媒することが可能な酵素、例えばバクテリオファージT4 DNAリガーゼの存在下で、大過剰モル濃度のリンカー分子とインキュベーションする。したがって反応生成物は、端に高分子リンカー配列を担持するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントを次に、適切な制限酵素で切断し、これらのDNAセグメントと適合性のある末端を作製する酵素により切断された発現ベクターと連結した。

【0135】

種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーは、International Biotechnologies Inc., New Haven, Conn., USAを含む多数の供給元から商業的に入手可能である。

【0136】

タンパク質の発現のための宿主として、本発明の実践に有用と考えられる酵母菌の代表的な属は、ピキア(Pichia)(以前はハンゼヌラ(Hansenula)として分類されていた)、サッカロマイセス(Saccharomyces)、クリベロミセス(Kluyveromyces)、アスペルギルス(Aspergillus)、カンジダ(Candida)、トルロプシス(Torulopsis)、トルラスポラ(Torulasporea)、シゾサッカロマイセス(Schizosaccharomyces)、シテロマイセス(Citeromyces)、パチソレン(Pachysolen)、ジゴサッカロマイセス(Zygosaccharomyces)、デバロマイセス(Debaromyces)、トリコデルマ(Trichoderma)、セファロスפורウム(Cephalosporium)、フミコラ(Humicola)、ムコール(Mucor)、ニューロスポラ(Neurospora)、ヤロウイア(Yarrowia)、メチニコピア(Metschnikowia)、ロドスポリジウム(Rhodospiridium)、レウコスפורディウム(Leucosporidium)、ボトリオアスカス(Botryosphaeria)、スポリデオボルス(Sporidiobolus)、エンドミコプシス(Endomyces)等である。好ましい属は、サッカロマイセス、シキゾサッカロマイセス、クリベロミセス、ピキア及びトルラスポラからなる群

10

20

30

40

50

から選択されるものである。サッカロマイセス spp の例は *S. セレビジエ* (*S. cerevisiae*)、*S. イタリクス* (*S. italicus*) 及び *S. ルーキシイ* (*S. rouxii*) である。

【0137】

クリベロミセス spp の例は *K. フラジリス* (*K. fragilis*)、*K. ラクティス* (*K. lactis*) 及び *K. マーキシアヌス* (*K. marxianus*) である。好適なトルラスポラ種は *T. デルブリュッキ* (*T. delbrueckii*) である。ピキア (ハンゼヌラ) の例は *P. アングスタ* (*P. angusta* (以前の *H. ポリモルファ* (*H. polymorpha*)))、*P. アノマラ* (*P. anomala* (以前の *H. アノマラ* (*H. anomala*)))、及び *P. パストリス* (*P. pastoris*) である。 *S. セレビジエ* (*S. cerevisiae*) の形質転換方法は一般に、EP 251744、EP 258067 及び WO 90/01063 に教示されている。

10

【0138】

本明細書に記載される抗原結合構築物の合成に有用なサッカロマイセスの代表的な種としては、*S. セレビジエ* (*S. cerevisiae*)、*S. イタリクス* (*S. italicus*)、*S. ジアスタティカス* (*S. diastaticus*)、及び *ザイゴサッカロマイセス・ルーキシイ* (*Zygosaccharomyces rouxii*) が挙げられる。*クリベロミセス* の好ましい代表的な種としては、*K. フラジリス* (*K. fragilis*) 及び *K. ラクティス* (*K. lactis*) が挙げられる。*ハンゼヌラ* の好ましい代表的な種としては、*H. ポリモルファ* (*H. polymorpha* (現在は *ピキア・アングスタ* (*Pichia angusta*)))、*H. アノマラ* (*H. anomala* (現在は *ピキア・アノマラ* (*Pichia anomala*)))、及び *ピキア・カプスラータ* (*Pichia capsulata*) が挙げられる。*ピキア* の更なる好ましい代表的な種としては、*P. パストリス* (*P. pastoris*) が挙げられる。*アスペルギルス* の好ましい代表的な種としては、*A. ニガー* (*A. niger*) 及び *A. ニデュランス* (*A. nidulans*) が挙げられる。*ヤロウカ* の好ましい代表的な種としては、*Y. リポリティカ* (*Y. lipolytica*) が挙げられる。多くの好ましい酵母菌種は、ATCC から入手可能である。例えば、以下の好ましい酵母菌種は ATCC から入手可能であり、タンパク質のタンパク質類に有用である：*サッカロマイセス・セレヴィシエ*、*ハンセン* (*Hansen*)、*テレオモルフ株 BY 4743 yap3 変異体* (ATCC アクセッション番号 4022731)；*サッカロマイセス・セレヴィシエ* *ハンセン*、*テレオモルフ株 BY 4743 hsp150 変異体* (ATCC アクセッション番号 4021266)；*サッカロマイセス・セレヴィシエ* *ハンセン*、*テレオモルフ株 BY 4743 pmt1 変異体* (ATCC アクセッション番号 4023792)；*サッカロマイセス・セレヴィジエ* *ハンセン*、*テレオモルフ* (ATCC 番号 20626；44773；44774；及び 62995)；*サッカロマイセス・ジアスタティカス* (*Saccharomyces diastaticus*) *Andrews et Gilliland ex van der Walt*、*テレオモルフ* (ATCC アクセッション番号 62987)；*クイベロマイセス・ラクティス* (*Dombrowski*) *van der Walt* *テレオモルフ* (ATCC アクセッション番号 76492)；*ピキア・アングスタ* (*Pichia angusta*) (*Teunisson et al.*) *Kurtzman*、*ハンゼヌラ・ポリモルファ* (*Hansenula polymorpha*) *de Morais et Maia* として蓄積される *テレオモルフ*、*テレオモルフ* (ATCC アクセッション番号 26012)；*アスペルギルス・ニガー* (*Aspergillus niger*) *van Tieghem*、*アナモルフ* (ATCC アクセッション番号 9029)；*アスペルギルス・ニガー* (*Aspergillus niger*) *van Tieghem*、*アナモルフ* (ATCC アクセッション番号 16404)；*アスペルギルス・ニデュランス* (*Aspergillus nidulans*) (*Eidam*) *Winter*、*アナモルフ* (ATCC アクセッション番号 48756)；並びに *ヤロウカ・リポリティカ* (*Yarrowia lipolytica*) (*Wickerham et al.*) *van*

20

30

40

50

der Walt et von Arx、テレオモルフ (ATCCアクセッション番号 201847)。

【0139】

S.セレビジエ (S. cerevisiae) の好適なプロモーターとしては、PGKI 遺伝子、GAL1 または GAL10 遺伝子、CYCI、PH05、TRP1、ADH1、ADH2、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、グルコキナーゼ、 α -接合因子フェロモン (mating factor pheromone) [接合因子フェロモン]、PRBIプロモーター、GUT2プロモーター、GPDIPロモーター、5'調節領域の一部と、他のプロモーターの5'調節領域、または上流活性化部位 (例えばEP-A-258067のプロモーター) とのハイブリッドを含むハイブリッドプロモーターに対する遺伝子と会合するものが挙げられる。

10

【0140】

シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) において使用するのに便利な調節可能プロモーターは、Maundrell (1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864 に記載されている nmt 遺伝子からのチアミン抑制プロモーター、及び Hoffman & Winston (1990) Genetics 124, 807-816 に記載されているグルコース抑圧 jbp1 遺伝子プロモーターである。

20

【0141】

外来遺伝子の発現用にピキアを形質転換する方法は、例えば Cregg et al. (1993)、及び種々の Phillips の特許 (例えば米国特許 4,857,467、参照として本明細書に組み込まれている) に教示され、かつ、ピキア発現キットは Invitrogen BV, Leek, Netherlands、及び Invitrogen Corp., San Diego, Calif から市販されている。好適なプロモーターとしては、AOX1 及び AOX2 が挙げられる。Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465 は、ハンゼヌラベクター及び形質転換の情報を含み、好適なプロモーターは MOX1 及び FMD1 である；一方、Rhone-Poulenc Rorer の EP361991, Fleer et al. (1991) 及び他の広報は、クリベロミセス spp 内での外来タンパク質の発現方法、及び好適なプロモーターが PGKI であることを教示している。

30

【0142】

転写終結シグナルは、転写終結及びポリアデニル化のための適切なシグナルを含む、真核細胞遺伝子の 3'隣接配列であることが好ましい。好適な 3'隣接配列は例えば、使用される発現制御配列に自然に結合した遺伝子の配列であってよい、即ち、プロモーターに対応してよい。あるいは、S.セレビジエ (S. cerevisiae) ADHI の終結シグナルが好ましい場合は異なってよい。

【0143】

ある種の実施形態において、選択した酵母菌内で効果的な任意のリーダーであってよい分泌リーダー配列により、所望の抗原結合構築物タンパク質がまず発現する。S.セレビジエ (S. cerevisiae) において有用なリーダーとしては、接合因子 ポリペプチド (MF-1) からのもの、及び EP-A-387319 のハイブリッドリーダーが挙げられる。かかるリーダー (またはシグナル) は、成熟タンパク質が周囲の媒質中に放出される前に、酵母菌により切断される。更なるかかるリーダーとしては、JP62-096086 (911036516として認可) に記載される S.セレビジエ (S. cerevisiae) インペルターゼ (SUC2)、酸ホスファターゼ (PH05)、MF-1 のプレ配列、0グルカナーゼ (BGL2) 及びキラー毒素；S.ジアスタティカス (S. diastaticus) グルコアルニラーゼ (glucoamylase) I1；S.カールスベルゲンシス (S. carlsbergensis) -ガラクトシダ

40

50

ーゼ (M E L 1) ; K . ラクティス (K . l a c t i s) キラー毒素 ; 並びにカンジダグルコアルニラーゼ (g l u c o a r n y l a s e) が挙げられる。

【 0 1 4 4 】

本明細書に記載される抗原結合構築物をコードするポリヌクレオチドを含有するベクター、宿主細胞、並びに合成及び組換え技術による抗原結合構築物タンパク質の作製を提供する。ベクターは例えば、ファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであってよい。レトロウイルスベクターは複製可能または複製欠損性であってよい。後者の場合、ウイルス増殖は通常、相補性宿主細胞内のみで発生する。

【 0 1 4 5 】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主内での増殖のための選択マーカを含有するベクターに連結される。一般に、プラスミドベクターをリン酸カルシウム沈殿物等の沈殿物中、または荷電脂質との複合体中に導入する。ベクターがウイルスであれば、適切なパッケージング用細胞株を用いてインビトロでパッケージ化し、次いで宿主細胞内に形質導入してよい。

【 0 1 4 6 】

ある種の実施形態において、ポリヌクレオチド挿入断片は、数例挙げると、ファージ P L プロモーター、大腸菌 l a c 、 t r p 、 p h o A 及び r a c プロモーター、S V 4 0 初期及び後期プロモーター、並びにレトロウイルス L T R のプロモーター等の適切なプロモーターと機能的に結合される。他の好適なプロモーターは当事者に知られるであろう。発現構築物は更に、転写開始及び終結のための部位、及び転写領域内に、翻訳のためのリボソーム結合部位を含有する。構築物により発現した転写物のコード部分は、先頭に翻訳開始コドン、及び翻訳されるポリペプチドの末端部におおよそ配置される終止コドン (U A A 、 U G A または U A G) を含むことが好ましい。

【 0 1 4 7 】

示すように、発現ベクターは少なくとも1つの選択マーカを含むことが好ましい。かかるマーカとしては、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G 4 1 8 、グルタミンシンターゼ、またはネオマイシン耐性、並びに大腸菌及び他の細菌培養のためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。適切な宿主の代表例としては、大腸菌、ストレプトミセス (S t r e p t o m y c e s) 及びサルモネラ・ティフィムリウム (S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m) 等の細菌細胞 ; 酵母細胞 (例えばサッカロマイセス・セレビジエまたはピキア・パストリス (A T C C アクセッション番号 2 0 1 1 7 8) 等) といった真菌細胞 ; ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) S 2 及びハスモンヨトウ (S p o d o p t e r a) S f 9 細胞などの昆虫細胞 ; C H O 、 C O S 、 N S O 、 2 9 3 及び B o w e s メラノーマ細胞等の動物細胞 ; 並びに植物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。上述の宿主細胞用の適切な培地及び条件は、当技術分野において既知である。

【 0 1 4 8 】

細菌において使用するのが好ましいベクターとしては、Q I A G E N , I n c . から入手可能な p Q E 7 0 、 p Q E 6 0 及び p Q E - 9 ; S t r a t a g e n e C l o n i n g S y s t e m s , I n c . から入手可能な p B l u e s c r i p t ベクター、P h a g e s c r i p t ベクター、p N H 8 A 、 p N H 1 6 a 、 p N H 1 8 A 、 p N H 4 6 A ; 並びに P h a r m a c i a B i o t e c h , I n c . から入手可能な p t r c 9 9 a 、 p K K 2 2 3 - 3 、 p K K 2 3 3 - 3 、 p D R 5 4 0 、 p R I T 5 が挙げられる。好ましい真核ベクターは、S t r a t a g e n e から入手可能な p W L N E O 、 p S V 2 C A T 、 p O G 4 4 、 p X T 1 及び p S G ; 並びに P h a r m a c i a から入手可能な p S V K 3 、 p B P V 、 p M S G 及び p S V L である。酵母菌系において使用する好ましい発現ベクターとしては、p Y E S 2 、 p Y D 1 、 p T E F 1 / Z e o 、 p Y E S 2 / G S 、 p P I C Z 、 p G A P Z 、 p G A P Z a l p h 、 p P I C 9 、 p P I C 3 . 5 、 p H I L - D 2 、 p H I L - S 1 、 p P I C 3 . 5 K 、 p P I C 9 K 及び P A O 8 1 5 (全て I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A から入手可能) が挙げられるが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。他の好適なベクターは、当事者に速やかに明らかとなるであろう。

【0149】

一実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物をコードするポリヌクレオチドは、原核もしくは真核細胞の特定の区画に、本発明のタンパク質を局在化させる、かつ/または原核もしくは真核細胞から本発明のタンパク質を分泌させるシグナル配列と融合される。例えば、大腸菌において、ペリプラズム空間にタンパク質の発現を行いたいと考えるかもしれない。細菌のペリプラズム空間にポリペプチドを発現させるために、抗原結合構築物タンパク質が融合したタンパク質（またはそれらの断片）のシグナル配列の例としては、p e l Bシグナル配列、マルトース結合タンパク質（MBP）シグナル配列、MBP、omp Aシグナル配列、ペリプラズム性大腸菌熱不安定性エンテロトキシンB - サブユニットのシグナル配列、及びアルカリホスファターゼのシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。New England Biolabsから入手可能なpMALシリーズのベクター（特にpMAL - rhoシリーズ）等の、タンパク質を局在化させる、融合タンパク質の構築のための幾つかのベクターは商業的に入手可能である。ある特定の実施形態では、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、グラム陰性菌中のかかるポリペプチドの発現及び精製効率を増加させるために、p e l Bペクチン酸リアーゼシグナル配列と融合させてもよい。米国特許番号5,576,195及び5,846,818を参照のこと（これらの内容は全体が、参照として本明細書に組み込まれる）。

10

【0150】

哺乳類細胞中で分泌を行うために、抗原結合構築物タンパク質に融合したシグナルペプチドの例としては、MPIF - 1シグナル配列（例えばGenBankアクセッション番号AAB51134のアミノ酸1 - 21）、スタニオカルシンシグナル配列（MLQNSAVLLLVISASA）（配列番号：276）、コンセンサスシグナル配列（MPTWAWWLFLVLLALWAPARG）（配列番号：277）が挙げられるが、これらに限定されない。バキュロウイルス発現系とともに使用してよい、好適なシグナル配列としてはgp67シグナル配列（例えばGenBankアクセッション番号AAA72759のアミノ酸1 - 19）がある。

20

【0151】

グルタミンシンターゼ（GS）またはDHFRを選択マーカーとして使用するベクターはそれぞれ、薬剤であるメチオニンスルホキシミンまたはメトトレキサートの存在下で増幅することができる。グルタミンシンターゼ系ベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性の細胞株（例えばマウス骨髄腫細胞株、NSO）を利用可能であることである。グルタミンシンターゼ発現系はまた、更なる阻害剤を与えて内因性遺伝子の機能を停止させることにより、グルタミンシンターゼ発現細胞（例えばチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）内でも機能することができる。グルタミンシンターゼ発現系及びそれらの構成成分は、PCT広報：WO87/04462；WO86/05807；WO89/10036；WO89/10404；及びWO91/06657に詳細に記載されており、これらは全体が参照として本明細書に組み込まれている。更に、グルタミンシンターゼ発現ベクターはLonza Biologics, Inc. (Portsmouth, N.H.)から入手することができる。マウス骨髄腫細胞内でのGS発現系を用いたモノクローナル抗体の発現及び作製は、Bebbington et al., Bio/technology 10:169 (1992)及びBiblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995)に記載されており、これらは、参照として本明細書に組み込まれる。

30

40

【0152】

本明細書に記載されるベクター構築物、及び更に、当業者に既知の技術を用いて1つ以上の異種制御領域（例えばプロモーター及び/またはエンハンサー）と機能的に会合したヌクレオチド配列を含有する宿主細胞もまた提供する。宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えばヒト由来細胞）等の高等真核細胞、もしくは酵母細胞等の下等真核生物であることがで

50

きるか、または、宿主細胞は細菌細胞等の原核細胞であることができる。挿入遺伝子配列を調節するか、または所望の特異的な方法により遺伝子産物を修飾及び処理する宿主株を選択してよい。ある種のプロモーターからの発現は、ある種の誘導因子の存在下で増加することができるため、遺伝子組換えされたポリペプチドの発現を制御することができる。更に、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳及び翻訳後プロセス、並びに修飾（例えばリン酸化及び開裂）に対して特徴及び特異的なメカニズムを有する。適切な細胞系を選択して、発現する外来タンパク質の所望の修飾及び処理を確実に行うことができる。

【0153】

本発明の核酸及び核酸構築物を宿主細胞に導入することは、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランが仲立ちするトランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法により達成することが可能である。かかる方法は、Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)等の多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。本発明のポリペプチドは実際のところ、組換えベクターを欠く宿主細胞により発現される場合があることが特に検討されている。

10

【0154】

本明細書で論じたベクター構築物を含有する宿主細胞に加えて、本発明は、エンジニアリングして内因性遺伝物質を欠失もしくは置き換えた（例えば、Cargoポリペプチドに対応するコード配列が、Cargoポリペプチドに対応する抗原結合構築物タンパク質に置き換えられている）かつ/または遺伝物質を含む脊椎動物由来、特に哺乳類由来の初代宿主細胞、二代目宿主細胞及び不死化宿主細胞もまた包含する。内因性ポリヌクレオチドに機能的に会合した遺伝物質は内因性ポリヌクレオチドを活性化、変更、及び/または増幅してよい。

20

【0155】

更に、当該技術分野において既知の技術を使用して、相同組換えにより、異種ポリヌクレオチド（例えばタンパク質、またはその断片または変異体をコードするポリヌクレオチド）、並びに/または異種制御領域（例えばプロモーター及び/もしくはエンハンサー）を治療用タンパク質をコードする内因性ポリヌクレオチド配列と機能的に会合させてよい（例えば、1997年6月24日に発行された米国特許5,641,670、国際公開番号WO96/29411；国際公開番号WO94/12650；Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)；及びZijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)を参照のこと：これらそれぞれの開示は、その全体が参照として組み込まれる）。

30

【0156】

硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、プロテインA等の親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷相互作用クロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により、組換え細胞培養物から本明細書に記載される抗原結合構築物タンパク質を回収及び精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）を精製のために用いるのが最も好ましい。

40

【0157】

ある種の実施形態において、Q-セファロース、DEAEセファロース、poros HQ、poros DEAF、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource/Source Q及びDEAE、Fractogel Q及びDEAEカラムを含むがこれらに限定されないアニオン交換クロマトグラフィーを使用して、本発明の抗原結合構築物タンパク質を精製する。

【0158】

50

特定の実施形態において、SP-セファロース、CMセファロース、poros HS、poros CM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource/Source S及びCM、Fractogel S及びCMカラム、並びにこれらの等価物及び類似物を含むがこれらに限定されないカチオン交換クロマトグラフィーを使用して、本発明のタンパク質を精製する。

【0159】

加えて、本明細書に記載される抗原結合構築物タンパク質は、当該技術分野において既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)を参照のこと）。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドを、ペプチドシンセサイザーを使用して合成することができる。更に所望する場合、ポリペプチド配列内に置換または付加として、非古典的アミノ酸 (non-classical amino acids) または化学アミノ酸類似体を導入することができる。非古典的アミノ酸としては、一般的なアミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、e-Ahx、6アミノヘキサン酸、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、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、 γ -メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸等の人工設計アミノ酸、及び一般的なアミノ酸類似体が挙げられるが、これらに限定されない。更にアミノ酸はD（右旋性）またはL（左旋性）であることができる。

【0160】

翻訳後修飾：

ある種の実施形態は、本明細書に記載される抗原結合構築物であり、翻訳中または翻訳後に異なる修飾が行われている。いくつかの実施形態では、修飾は、既知の保護/ブロック基によるグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、誘導体化、タンパク質分解開裂及び抗体分子または他の細胞リガンドへの結合のうち少なくとも1つである。幾つかの実施形態では、抗原結合構築物は、プロモシアン、トリプシン、キモトリプシン、パイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的な化学切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；及びツニカマイシンの存在下での代謝合成を含むがこれらに限定されない既知の技術により化学修飾される。

【0161】

本明細書に記載される抗原結合構築物の更なる翻訳後修飾としては、例えば、N結合またはO結合炭水化物鎖（N末端またはC末端部の処理）、アミノ酸骨格への化学部位の結合、N結合またはO結合炭水化物鎖の化学修飾、及び宿主原核細胞での発現の結果としての、N末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。本明細書に記載される抗原結合構築物は酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識などの検出可能な標識により修飾され、タンパク質の検出及び単離が可能となる。ある種の実施形態において、好適な酵素標識の例としては、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、 β -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挙げられる；好適な補欠分子族複合体の例としては、ピオチン及びアビジン/ピオチンが挙げられる；好適な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン、フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光材料の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンが挙げられる；かつ、好適な放射性材料の例としては、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、水鉛、キセノン、フ

ッ素が挙げられる。

【0162】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は、放射性金属イオンに会合する大環状キレート化剤に結合する。

【0163】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物は、翻訳後プロセッシング等の自然のプロセス、または当該技術分野において既知の化学修飾技術のいずれかにより修飾される。ある種の実施形態において、同一タイプの修飾が、所与のポリペプチド内の複数の部位に同程度、または異なる程度存在してよい。ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物のポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果分枝状であり、いくつかの実施形態においては、分枝を有するか有しない環状である。環状、分枝状、及び分枝環状のポリペプチドは、翻訳後の自然プロセスの結果によるか、または合成方法により作製される。修飾としては、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、ヘム部位の共有結合、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、ホスファ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、システイン成形、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク分解性処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、転写RNAが仲介する、アルギニル化等のタンパク質へのアミノ酸の付加、及びユビキチン化が挙げられる（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)を参照のこと）。

10

20

30

【0164】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は固体の支持体に結合され、本発明のタンパク質により結合された、すなわち本発明のタンパク質に結合するかまたは会合するポリペプチドの免疫学的検定または精製に特に有用である。かかる固体の支持体としては、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挙げられるが、これらに限定されない。

【0165】

アッセイ：

当該技術分野において既知のアッセイ、及び本明細書に記載されるアッセイを使用して、または定期的に変更して、本明細書に記載される抗原結合構築物の機能活性（例えば生物活性）をアッセイすることができる。

40

【0166】

例えば、本明細書に記載される抗原結合構築物が抗原に結合する、または抗原に結合する他のポリペプチドと競合する、またはFc受容体及び/もしくは抗体に結合する能力をアッセイする一実施形態において、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線測定法、ゲル拡散法沈降反応、免疫拡散法分析、in situイムノアッセイ（例えばコロイド金、酵素または放射性同位体標識を使用）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えばゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光抗体検定、プロテインAアッセイ、及び免疫電気泳動分析等の技術を使用する競合及び非競合アッセイを含むがこれらに限定されない、当該技術分野において既知の各種免疫学的検定を使用することがで

50

きる。一実施形態では、抗体結合は一次抗体上の標識を検出することにより検出される。別の実施形態において、一次抗体は二次抗体の結合、または一次抗体への試薬の結合を検出することにより検出される。更なる実施形態において、二次抗体が標識される。イムノアッセイでの結合を検出する多くの手段が当技術分野において既知であり、本発明の範囲内となっている。

【0167】

本明細書に記載される抗原結合構築物に含まれる抗原結合ドメインに対して結合パートナー（例えばレセプターまたはリガンド）が同定されるある種の実施形態において、例えば当該技術分野において公知の手段、例えば還元及び非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質親和性クロマトグラフィー、並びに親和性プロッティングにより本明細書に記載される抗原結合構築物による、その結合パートナーへの結合をアッセイする。通常は、P h i z i c k y e t a l . , M i c r o b i o l . R e v . 5 9 : 9 4 - 1 2 3 (1 9 9 5) を参照のこと。別の実施形態において、抗原結合構築物が本明細書に記載される抗原結合構築物の抗原結合ポリペプチド構築物の基質に結合する生理学的相関の能力は、当該技術分野において既知の技術を使用して機械的にアッセイすることができる。

10

【0168】

医薬組成物

また本明細書に詳述されているように、抗原結合構築物及び担体を含む組成物も含まれる。

【0169】

「薬学的に許容できる担体」とは、医薬組成物中の有効成分以外の、対象に対して無毒性の成分を意味する。薬学的に許容できる担体としては、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0170】

本明細書で使用する場合、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」等の文法的変化）とは、治療される個体の病気の自然経過を変えるための、かつ予防または臨床病理学的な過程のいずれかにおいて実施することが可能な、臨床的介入を意味する。治療の所望の効果としては、病気の発症または再発防止、症状の緩和、病気の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移予防、疾患進行度の低下、病状の回復または緩和、及び寛解または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物は、病気の進展を遅らせる、または病気の進行を遅らせるのに使用される。用語「取扱説明書」は、指示、使用法、用量、投与、併用療法、禁忌及び/またはかかる治療製品の使用に関係する警告についての情報を含む、治療製品の販売用パッケージに慣例上含まれる取扱説明書を意味するために使用される。

30

【0171】

本明細書に記載される抗原結合構築物等の「有効量」とは、投与される細胞または組織での生理学的変化をもたらすのに必要な量を意味する。

【0172】

作用物質、例えば本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物の「治療上有効な量」とは、必要な用量及び期間で所望の治療または予防結果を達成するのに有効な量を意味する。治療上有効な量の作用物質は例えば、病気の悪影響を除くか、減らすか、遅らせるか、最小限にするか、または予防する。

40

【0173】

「個体」または「対象」は哺乳類である。哺乳類としては、家畜（例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、並びに齧歯類（例えばマウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特に、個体または対象はヒトである。

【0174】

用語「医薬組成物」とは、中に含まれる抗原結合構築物の生物活性を効果的なものにするような形態であり、かつ製剤が投与される対象に対して許容されない毒性を有する追加

50

の化合物を含まない配合物を意味する。

【0175】

治療上の使用

一態様において、本明細書に記載される抗原結合構築物は、開示した1つ以上の病気、疾患、または状態を治療するための、患者に抗体、抗体の断片または変異体であるカーゴポリペプチドを含む、記載された抗原結合構築物を投与することを伴う抗体ベースの治療を目的としている。本明細書に記載される治療用化合物としては、本明細書に記載される抗原結合構築物、本明細書に記載される抗原結合構築物をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0176】

ある種の実施形態において、増殖性疾患、最小残存がん、腫瘍性疾患、炎症性疾患、免疫不全、自己免疫疾患、感染症、ウイルス性疾患、アレルギー反応、寄生虫反応、移植片対宿主病もしくは宿主対移植片病、または細胞悪性疾患のうち少なくとも1つの、予防、治療または回復方法を提供し、前記方法は、かかる予防、治療または回復が必要な対象に、本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物を投与することを含む。

【0177】

ある種の実施形態は、本明細書に記載される有効量の医薬組成物を含み、任意に他の薬学的に活性な分子を組み合わせた組成物を、哺乳類に投与することを含む、それを必要とする哺乳類におけるがんの治療方法である。ある種の実施形態において、がんは固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は肉腫、癌腫、及びリンパ腫の1つ以上である。他の特定の実施形態においてがんは血液がんである。いくつかの実施形態では、がんはB細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、及び白血病の1つ以上である。

【0178】

前記細胞に、本明細書に記載される抗原結合構築物を含む組成物を提供することを含むがんの治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、前記抗原結合構築物を他の治療薬と組み合わせて提供することを更に含む。

【0179】

有効量の本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物を含む組成物を哺乳類に投与することを含む、それを必要とする哺乳類におけるプリナツモマブ非反応性がんの治療方法を提供する。

【0180】

いくつかの実施形態は、前記がん細胞に、有効量の本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物を含む組成物を提供することを含む、プリナツモマブでの治療後に退行性となるがん細胞の治療方法を提供する。

【0181】

いくつかの実施形態は、B細胞の発現を特徴とする病気を患う個体の治療方法であり、前記方法は、前記個体に、有効量の本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物を含む有効量の組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態では、病気は、抗CD19抗体及び抗CD20抗体のうち少なくとも1つによる治療に応答しない。ある種の実施形態において、病気はCD19またはCD20溶解抗体に耐性のあるがんまたは自己免疫状態である。

【0182】

前記哺乳類に、本明細書に記載される有効量の医薬組成物を含む組成物を投与することを含む、それを必要とする哺乳類における自己免疫状態の治療法を提供する。ある種の実施形態において、自己免疫状態は、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬性関節炎、乾癬、血管炎、ぶどう膜炎、クローン病及び1型糖尿病の1つ以上である。

【0183】

前記哺乳類に、本明細書に記載される抗原結合構築物を含む有効量の医薬組成物を含む組成物を投与することを含む、それを必要とする哺乳類の炎症状態の治療方法を提供する

10

20

30

40

50

。

【0184】

本明細書において提供する教示を身につければ、当業者は過度な実験をすることなく診察、監視または治療目的での、本明細書に記載される抗原結合構築物の使用方法を知ることが出来る。

【0185】

少なくとも抗体の断片または変異体を含む、本明細書に記載される抗原結合構築物は単独で、または他の種類の治療（例えば放射線治療、化学療法、ホルモン療法、免疫療法及び抗腫瘍剤）と組み合わせて投与されてもよい。一般に、種起源の、または患者と同じ種である種反応性（抗体の場合）の生成物を投与することが好ましい。したがって、一実施形態において、ヒト抗体、断片誘導體、類似体、または核酸が、治療または予防のためヒト患者に投与される。

10

【0186】

遺伝子治療：

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物タンパク質をコードする配列を含む核酸を、タンパク質の異常発現及び/もしくは活性に関係する病気または疾患を遺伝子治療により治療、阻害または予防するために投与する。遺伝子治療とは、発現した、または発現可能な核酸を対象に投与することにより行われる治療を意味する。本発明のこの実施形態では、核酸は、治療効果を仲立ちするこれらがコードされたタンパク質を作製する。当該技術分野において入手可能な任意の遺伝子治療方法を使用することができる。

20

【0187】

治療または予防活性の証明：

本明細書に記載される抗原結合構築物または医薬組成物をヒトで使用する前に、所望の治療または予防活性をインビトロで、その後インビボで試験した。例えば、化合物または医薬組成物の治療または予防での実用性を示すインビトロアッセイには、細胞株または患者の組織サンプルでの化合物の効果が含まれる。細胞株及び/もしくは組織サンプルでの化合物または組成物の効果は、ロゼット形成アッセイ及び細胞溶解アッセイを含むがこれらに限定されない、当業者に既知の技術を用いて測定することができる。本発明では、特異的化合物の投与が示されるかどうかを測定するのに使用することができるインビトロアッセイとしては、患者の組織サンプルが培地で成長し、抗原結合構築物に曝露されるか、そうでない場合は抗原結合構築物が投与されるインビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、組織サンプルにおけるかかる抗原結合構築物の効果が観察される。

30

【0188】

治療または予防活性の証明：

本明細書に記載される有効量の抗原結合構築物または医薬組成物を対象に投与することによる、治療、阻害及び予防方法を提供する。一実施形態では、抗原結合構築物は実質的に精製されている（例えば、その効果を制限するか、または好ましくない副作用を生み出す物質を実質的に含まない）。ある種の実施形態において、対象は、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等の動物を含むがこれらに限定されない動物であり、ある種の実施形態においては哺乳類、かつ最も好ましくはヒトである。

40

【0189】

例えば、リポソーム内でのカプセル化、微小粒子、マイクロカプセル、化合物を発現可能な組換え細胞、受容体が仲立ちするエンドサイトーシス（例えば Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429 - 4432 (1987) を参照のこと）、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構築等、種々の送達システムが知られており、本明細書に記載される抗原結合構築物配合物を投与するのに使用することができる。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻孔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。化合物または組成物は、例えば点滴またはポラス注射、上皮または粘膜皮膚内層（例えば口腔粘膜、直腸及び腸粘膜）を通し

50

での吸収等の任意の便利な経路により投与されてよく、他の生物学的活性剤と共に投与されてよい。投与は全体的または局所的とすることができる。加えて、ある種の実施形態において、心室内及び髄腔内注射を含む任意の好適な経路により、本明細書に記載される抗原結合構築物組成物を中枢神経系に導入することが望ましい。心室内注射は、例えばオンマヤリザーバー等のリザーバーに取り付けられた心室内カテーテルにより行われてよい。例えば吸入器またはネブライザの使用、及びエアロゾル化剤との配合により、経肺投与もまた用いることができる。

【0190】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物または組成物を、治療の必要な領域に局所的に投与することが望ましい。この投与は、以下に限定されないが、例えば手術中の局所注入、手術後の、例えば創傷被覆材と組み合わせた局所適用、注射、カテーテル、座薬、またはインプラントにより達成され得る。前記インプラントはシラステック膜または繊維等の、膜を含む多孔質、非多孔質またはゼラチン様物質である。本発明の抗体を含むタンパク質を投与する場合、好ましくは、タンパク質が吸収されない材料を使用して治療が行われなければならない。

10

【0191】

別の実施形態において、抗原結合構築物または組成物を小胞、特にリボソームに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; を参照のこと: 通常は同上の箇所を参照のこと)。

20

【0192】

更に他の実施形態では、抗原結合構築物または組成物を制御放出システム中に送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用してよい (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) を参照のこと)。別の実施形態では、高分子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, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); を参照のこと: Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989) もまた参照のこと)。更に他の実施例において、制御放出システムは治療標的 (例えば脳) の近くに配置することができるため、全身投与量のわずかのみしか必要としない (例えば Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984) を参照のこと)。

30

40

【0193】

他の制御放出システムは Langer の考察 (Science 249:1527-1533 (1990)) にて論じられている。

【0194】

本明細書に記載される抗原結合構築物をコードする核酸を含むある特定の実施形態では、適切な核酸発現ベクターの一部として核酸を構築し、例えばレトロウイルスベクターの

50

使用により（例えば米国特許 4,980,286 を参照）、または直接注射により、または微粒子衝突法（例えば遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用により、もしくは脂質もしくは細胞表面受容体もしくは形質移入剤によるコーティングの使用により、または核を入れることが知られているホメオボックス様ペプチドと組み合わせて投与すること（例えば Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991) を参照）等により、細胞内に入るように投与することにより、核酸をインビボ投与して、コードされたタンパク質の発現を促進することができる。あるいは、核酸を細胞内に導入し、発現のために相同組換えにより宿主細胞 DNA 内に組み込むことができる。

【0195】

本明細書においては、医薬組成物もまた提供される。かかる組成物は、治療上有効な量の化合物、及び薬学的に許容できる担体を含む。ある特定の実施形態では、用語「薬学的に許容できる」とは、連邦もしくは州政府の監督機関により認可された、または、米国薬局方もしくは動物、より詳細にはヒトでの使用のために一般的に認識されている他の薬局方に記載されたことを意味する。用語「担体」とは、治療薬が投与される場合に組み合わせられる希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを意味する。かかる医薬担体は、水及び石油、動物、植物、またはピーナッツオイル、大豆油、鉱油、ゴマ油等の合成由来のものを含む油類等の滅菌した液体であることができる。医薬組成物静脈内投与される場合、水が好ましい担体である。食塩水及びデキストロス水溶液及びグリセロール溶液もまた、液状担体として、特に注射可能な溶液として用いることができる。好適な医薬品賦形剤としては、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、小麦粉、胡粉、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リン酸、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。組成物は所望する場合、微量の湿潤もしくは乳化剤、または pH 緩衝剤も含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性剤等の形態を取ることができる。組成物は、従来の結合剤及びトリグリセリド等の担体と共に座薬として処方することができる。経口製剤は、医薬品等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサクカリン、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含むことができる。好適な医薬担体の例は、E. W. Martin による「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。かかる組成物は、患者に適切な投与形態を提供するように、好適な量の担体と共に、治療上有効な量の化合物を好ましくは精製した形態で含む。配合物は投与方法に適合しなければならない。

【0196】

ある種の実施形態において、抗原結合構築物を含む組成物は、ヒトに静脈内投与するのに適した医薬組成物として決まった手順に従い配合される。通常、静脈内投与用組成物は、滅菌した等張性水性緩衝液の溶液である。必要であれば、組成物は、注射部位の痛みを和らげるために可溶化剤及びリグノカイン等の局部麻酔薬を含んでもよい。一般に、成分はバラバラに、または例えば活性剤の量を示すアンプルもしくはサッシュ等の密封容器内で、例えば乾燥凍結粉末または無水濃縮物として単位投薬形態で混合されて供給される。組成物が点滴により投与されなければならない場合、滅菌した医薬品等級水または生理食塩水を含む点滴ボトルで組成物を分散させることができる。組成物が注射により投与される場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、成分が投与前に混合されてよいように提供することができる。

【0197】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される組成物は天然または塩形態で配合される。薬学的に許容できる塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するもの等のアニオンと共に形成されたもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するもの等のカチオンと共に形成されたも

10

20

30

40

50

のが挙げられる。

【0198】

治療用タンパク質の異常発現及び/または活性と関係する病気または疾患の治療、阻害及び予防に効果的な、本明細書に記載される組成物の量は、標準的な臨床技術により測定することができる。加えて、最適な用量範囲を特定することを補助するために、インビトロアッセイを所望により用いてよい。配合物に用いられるべき正確な用量は、投与経路、及び病気または疾患の深刻度にも依存し、施術者の判断、及び各患者の状況に応じて決定されなければならない。有効量はインビトロまたは動物モデル試験系からの用量反応曲線より推定される。

【0199】

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は一度に、またはひと続きの治療にわたり、患者に適切に投与される。病気の種類及び重症度に応じ、例えば、一回以上の個別投与、または連続点滴に関わらず、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$) の T 細胞活性化二重特異的抗原結合分子が、患者への投与への最初の候補投与量となることができる。ある典型的な 1 日の投与量は、上述の因子に応じ、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲であってよい。数日間またはそれ以上にわたる反復投与において、状態に応じ、治療は通常、病徴の所望の抑制が生じるまで続けられる。本明細書に記載される抗原結合構築物のある代表的な用量は、約 $0.005 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲である。別の非限定的実施例において、投与当たりの投与量は約 1 マイクログラム / kg 体重、約 5 マイクログラム / kg 体重、約 10 マイクログラム / kg 体重、約 50 マイクログラム / kg 体重、約 100 マイクログラム / kg 体重、約 200 マイクログラム / kg 体重、約 350 マイクログラム / kg 体重、約 500 マイクログラム / kg 体重、約 1 ミリグラム / kg 体重、約 5 ミリグラム / kg 体重、約 10 ミリグラム / kg 体重、約 50 ミリグラム / kg 体重、約 100 ミリグラム / kg 体重、約 200 ミリグラム / kg 体重、約 350 ミリグラム / kg 体重、約 500 ミリグラム / kg 体重、約 $1000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重までまたはそれ以上、及びこれらの中で推論可能な任意の範囲を含んでよい。本明細書に記載する数字から推論可能な非限定的実施例において、上述の数に基づき、約 $5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 5 マイクログラム kg 体重 \sim 約 500 ミリグラム kg 体重の範囲を投与することができる。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $5.0 \text{mg} / \text{kg}$ もしくは $10 \text{mg} / \text{kg}$ (またはこれらの任意の組み合わせ) の投与量の 1 種以上を、患者に投与してよい。かかる投与量は、例えば毎週または 3 週間に 1 度 (例えば、患者が約 2 \sim 約 20 回、即ち例えば約 6 回の T 細胞活性化二重特異的抗原結合分子の投与を受けるように) 断続的に投与してよい。最初の多めの投与量、それに続く一回以上の量の少ない用量を投与してよい。しかし、他の投薬レジメンも有用である。この治療の進行は、従来技術及びアッセイによって容易に監視される。

【0200】

本明細書に記載される抗原結合構築物は一般に、意図した目的を達成するのに有効な量で使用する。病状を治療または予防するのに使用するため、本明細書に記載される抗原結合構築物、またはその医薬組成物を治療上有効な量で投与または適用してよい。特に本明細書において提供する開示の見地からすると、治療的有効な量の決定は十分に当業者の能力のうちである。

【0201】

全身投与のために、治療的有効量は細胞培養アッセイ等のインビトロアッセイから最初に測定することが可能である。投与量を次いで、動物モデルに処方して、細胞培養で測定した IC_{50} を含む血中濃度範囲を得ることができる。かかる情報を使用して、ヒトにおける有用な投与量を更に正確に測定することができる。

【0202】

初期用量は、例えば動物モデルのインビボデータから、当該技術分野において既知の技術を使用して推定することができる。当業者は、動物のデータに基づきヒトへの投与を速

10

20

30

40

50

やかに最適化することができる。

【0203】

投与量及び間隔を個々で調整して、治療効果を維持するのに十分である、本明細書に記載される抗原結合構築物の血漿濃度を提供してよい。注射による投与のための通常の患者への投与量は、約0.1~50mg/kg/日、典型的には約0.5~1mg/kg/日の範囲で変動する。治療に効果的な血漿濃度は各日に複数回投与を行うことによって達成され得る。血漿中濃度は、例えばHPLCにより測定され得る。

【0204】

局所投与または選択的取り込みの場合、本明細書に記載される抗原結合構築物の効果的な局所濃度は血漿濃度と関係しない場合がある。当業者は、過度な実験をすることなく治療上効果的な局所投与量を最適化することができる。

10

【0205】

本明細書に記載される抗原結合構築物の治療的有効量は、実質的に毒性の原因となることなく、通常は治療上の効果をもたらす。本明細書に記載される抗原結合構築物の毒性及び治療効果は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により測定することができる。細胞培養アッセイ及び動物実験を使用して、LD₅₀（集団の50%の致死量）、及びED₅₀（集団の50%に治療上効果的な投与量）を測定することができる。毒性と治療効果的な投与量の比は治療係数であり、LD₅₀/ED₅₀の比として表すことができる。大きな治療係数を示すT細胞活性化二重特異的抗原結合分子が好ましい。一実施形態では、本発明に従った、本明細書に記載される抗原結合構築物は高い治療係数を示す。細胞培養アッセイ及び動物実験から入手したデータを、ヒトでの使用に好適な用量の範囲で配合するのに使用することができる。用量は、毒性が殆ど無いかまたは全く無く、ED₅₀を含む血中濃度の範囲内であることが好ましい。用量は種々の要因、例えば用いた投薬形態、利用した投与経路、対象の状態等に応じて、この範囲内で変化してよい。正確な配合物、投与経路及び用量は、患者の状態に鑑みて個々の医師により選択されることができる（例えば、Finglet al, 1975: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1内を参照のこと：その全体が本明細書に参照として組み込まれる）。

20

【0206】

本明細書に記載される抗原結合構築物で治療される患者の主治医は、毒性、臓器機能不全等により投与を終了、中断または調節する方法及び時期を知っている。逆に、主治医はまた、臨床反応が十分でない場合（毒性を除く）、治療を高レベルに調節する方法も知っている。対象の疾患の管理における投与規模は、治療される状態の重症度、投与経路等により変化する。状態の重症度は、例えば標準的な予後の評価方法により、ある程度は測定される。更に、投与量及び恐らく投与頻度もまた、年齢、体重及び個々の患者の応答に応じて変化する。

30

【0207】

本明細書に記載される抗原結合構築物を含む医薬組成物の製造プロセスもまた提供する。前記プロセスは、抗原結合構築物の発現を可能にする条件下での宿主細胞の培養；作製した抗原結合構築物の培養物からの回収；及び医薬組成物の作製を含む。

40

【0208】

その他の作用物質及び治療薬：

ある種の実施形態において、本明細書に記載される抗原結合構築物は治療において、1種以上の他の作用物質と組み合わせて投与される。例えば、一実施形態では、本明細書に記載される抗原結合構築物は、少なくとも1種の追加の治療薬と同時投与される。用語「治療薬」とは、かかる治療が必要な個体において、症状または病気を治療するために投与される任意の作用物質を包含する。かかる追加の治療薬は、治療される特定の適応症に好適な任意の有効成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含んでよい。ある種の実施形態において、追加の治療薬としては、免疫賦活剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着阻害剤、細胞毒性剤、細胞アポトーシスの活性化剤、またはアポトーシ

50

ス誘導物質に対する細胞の感受性を高める作用物質がある。特定の実施形態では、追加の治療薬は抗がん剤、例えば微細管攪乱物質、代謝拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン療法、キナーゼ阻害剤、受容体拮抗剤、腫瘍細胞アポトーシス活性化剤、または血管新生阻害剤である。

【0209】

かかる他の作用物質は、意図する目的に効果的な量と組み合わせ好適に存在する。かかる他の作用物質の有効量は、使用するT細胞活性化二重特異的抗原結合分子の量、疾患または治療の種類、及び上述した他の要因に依存する。本明細書に記載される抗原結合構築物は通常、本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路で、または本明細書に記載される用量の約1~99%で、または実験的/臨床的に適切と測定される任意の用量及び任意の経路で使用される。

10

【0210】

上記のかかる併用療法は、併用投与(2つ以上の治療薬が同一または別々の組成物に含まれる)、及び個別投与を包含し、後者の場合、本明細書に記載される抗原結合構築物の投与は追加の治療薬及び/またはアジュバントの投与前、投与と同時、及び/または投与後に行うことができる。本明細書に記載される抗原結合構築物は、放射線治療と組み合わせ使用することができる。

【0211】

製造物品:

本発明の別の態様では、上記疾患の治療、予防及び/または診断に有用な材料を含む製造物品を提供する。該製造物品は、容器、及び容器上にあるまたは付属するラベルまたは添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静注液バッグ等が挙げられる。容器はガラスまたはプラスチック等の種々の材料から形成してよい。容器は組成物それ自体、または状態の治療、予防及び/もしくは診断に効果的な他の組成物と組み合わせた組成物を保持し、かつ、滅菌点検口を有してよい(例えば、容器は静注液バッグまたは皮下注射針で貫通可能なストッパを有するバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明のT細胞活性化二重特異的抗原結合分子である。ラベルまたは添付文書は、組成物が最適な状態の治療に使用されることを示す。更に、製造物品は(a)その中に組成物を含む第1の容器(前記組成物は本明細書に記載される抗原結合構築物を含む);及び(b)その中に組成物を含む第2の容器(前記組成物は更に細胞毒性、または別の治療薬を含む)を含んでよい。本発明の本実施形態における製造物品は更に、組成物を特定の状態の治療に使用可能であることを示す添付文書を含んでよい。あるいは、または追加で、製造物品は更に、注射用静菌水(BWFI)、リン酸塩-緩衝生理食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液等の薬学的に許容できる緩衝液を含む第2(または第3)の容器を含んでよい。更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及び使用者の視点から所望の他の物質を含んでもよい。

20

30

【実施例】

【0212】

以下の特異的かつ非限定的な実施例は単なる例示として解釈されるべきであり、本開示をいかなる他の方法で限定するものではない。更なる説明無しに、当業者は、本明細書の説明に基づき、本開示を最大限活用することができると考えられている。本明細書で引用される全ての出版物は、それら全体が参照として本明細書に組み込まれる。URL、または他のかかる識別子もしくはアドレスが参照される場合、かかる識別子は変化する可能性があり、かつインターネット上の特定の情報は移り変わる可能性があるが、インターネットを検索することにより同等の情報を見つけることができると理解されている。これらの参照は、かかる情報の入手可能性及び公への伝播の証拠となる。

40

【0213】

実施例1. 二重特異的抗CD19-CD3抗原結合構築物の説明

多数の例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物を以下に記述するように設計した。この種の構築物の例示的な略図を図1A~Cに示す。これらの変異体の一覧を

50

図 2 に示す。全てのフォーマットは、CH3ドメインにおける既知の変異により構築されたヘテロ二量体Fcに基づいている (Von Kreudenstein et al., MAbs. 2013 5(5): 646-54) :

・二重scFvヘテロ二量体Fc分子は、抗CD19 scFv及び抗CD3 scFvを有するヘテロ二量体Fcを含有する。

・ハイブリッドヘテロ二量体Fc分子は、抗CD19 scFv及び抗CD3 Fabを有するヘテロ二量体Fc、または抗CD19 Fab及び抗CD3 scFvを有するヘテロ二量体Fcを含有する。

・フルサイズヘテロ二量体Fc分子は、抗CD19 Fab及び抗CD3 Fabを有するヘテロ二量体Fcを含有する。フルサイズ分子は共通の軽鎖、または/並びに抗CD19軽鎖及び抗CD3軽鎖により構築することができる。

【0214】

二重scFvヘテロ二量体Fc構築物：

v873及びv875は、二重scFvヘテロ二量体Fc二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物を例示する。

【0215】

変異体v873及びv875の抗CD19 scFv (HD37 scFv) 配列は、既知の抗CD19 scFv (VL-VH) HD37 (Kipriyanov et al., 1998, Int. J. Cancer: 77, 763-772) から作製した。変異体v875の抗CD3 scFv (OKT3 scFv) は、軽鎖と重鎖の間の (GGGS) 3リンカーにより、公表されたOKT3 (Orthoclone OKT3、ムクモナブ) 可変軽鎖配列を可変重鎖配列に融合することで作製した。変異体v873の抗CD3 scFv (プリナツモマブ scFv) は、既知のプリナツモマブ (Amgen) 抗CD3 scFv (VH-VL) 配列から作製した。

【0216】

v873は、ヘテロ二量体Fcの鎖Aに抗CD19 (HD37) scFvを、かつ鎖Bに抗CD3 (プリナツモマブ) scFvを有し、鎖Aに変異L351Y__F405A__Y407V、及び鎖BにT366L__K392M__T394Wを含む。

【0217】

v875は、ヘテロ二量体Fcの鎖Aに抗CD19 (HD37) scFvを、かつ鎖Bに抗CD3 (OKT3) scFvを有し、鎖Aに変異L351Y__F405A__Y407V、及び鎖BにT366L__K392M__T394Wを含む。

【0218】

前記変異体は、重鎖の両方に変異D265S__L234A__L235Aを含むFcノックアウト変異体である。この一連の変異は、FcがFcRに結合することをやめさせる。v1661は、ヘテロ二量体Fcの鎖Aに抗CD19 BiTE (商標) (HD37) scFvを、かつ鎖Bに抗CD3 (OKT3) scFv有し、鎖Aに変異D265S__L234A__L235A__T350V__L351Y__F405A__Y407Vを、かつ鎖BにD265S__L234A__L235A__T350V__T366L__K392L__T394Wを含む。

【0219】

ハイブリッドヘテロ二量体Fc及び向上した生物物理学的特性のための、エンジニアリングされた構築物：

更なる二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物1853、6754、10151、6750、6751、6475、6749、10152、10153、及び6518を調製した。これらの構築物は、変異体875と同じ抗原結合ドメインに基づくが、向上した収量及び生物物理学的特性のためにエンジニアリングされている。修飾としては、VL-VHジスルフィドエンジニアリング及びCDR変異体の安定化により、1つまたは両方のscFvをFabフォーマット等価物に変化させること、及び/またはscFvの安定化が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0220】

抗CD19 scFv及び抗CD3 scFv配列を上述のとおり作製した。抗CD19 Fab (HD37 Fab)は、それぞれヒトIgG1 CH及びCL配列に融合したHD37 VH及びVL配列を使用した、キメラFabである。scFvまたはVH-CHドメインは、ヘテロ二量体Fcの1つの鎖に融合している。抗CD3 Fab (hOKT3 Fab)はヒト化OKT3抗体テプリズマブ (Eli Lilly)の既知の配列から作製した。VH-CHドメインはヘテロ二量体Fcの1つの鎖に融合した。

【0221】

抗CD3及び抗CD19 scFvの両方に対するscFvジスルフィドエンジニアリング戦略 (VHVL SS)には、scFvのVHとVLとの間にジスルフィド結合を導入するために、Kabataナランピングシステムに従い、公表されている位置VH44及びVL100を用いた [Reiter et al., Nat. Biotechnol. 14:1239-1245 (1996)]。

10

【0222】

以前に報告されている [Kipriyanov et al., Prot. Eng. 10(4):445-453 (1997)]ように、前記変異体は、安定性及び収量を向上するために、抗CD3 scFvへの変異を含有する。v1653、v6475及びv10153はVH CDR3の100A位置において、システインからセリンへの変異を有する抗CD3 (OKT3)を有する。

【0223】

更なる二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物は、実施例7に記載の通り設計した。各二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物に対応するクローンは表XXに示し、各クローンの対応する配列組成物は表YYに示す。

20

【0224】

ベンチマーク制御

v891は、プリナツモマブ (BiTE (商標))と同一のポリペプチド配列を有し、抗CD3 scFv及び抗CD19 scFv (50kDa)を含む。

【0225】

実施例2：代表的な抗原結合構築物のクローニング、発現、及び精製

実施例1に記載されている変異体 (抗原結合構築物)及び対照をクローニングし、以下のとおり発現させた。抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子は、ヒト/哺乳類の発現に最適化したコドンを使用して、遺伝子合成により構築した。scFv及びFab配列は、既知の抗CD19抗体HD37 (HD37、Kipriyanov et al., 1998, Int. J. Cancer:77,763-772)、及び既知の抗CD3モノクローナル抗体OKT3 (ORTHOCLONE OKT3, Drug Bank参照:DB00075)、テプリズマブ (MGA031, Eli Lilly)、プリナツモマブ (Amgen, US2011/0275787)配列から作製し、実施例1に記載の通り構築した。

30

【0226】

最終遺伝子産物を哺乳類発現ベクターpTT5 (NRC-BRI, Canada)内にサブクローニングし、CHO細胞で発現させた (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))。

40

【0227】

CHO細胞を、1mg/mLの25kDaポリエチレンジイミン水溶液 (PEI, Polysciences)により、PEI:DNAを2.5:1の比として指数増殖期 (150万~200万個の細胞/mL)にトランスフェクションした (Raymond C. e

50

t 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のために最適な濃度範囲を測定するために、ヘテロ二量体形成が可能となる、重鎖A(HC-A)、軽鎖(LC)、及び重鎖Bの最適なDNA比(例えばHC-A/HC-B/比=50:50%(OAA; HC/Fc)、50:50%)でDNAをトランスフェクションした。4000rpmで遠心分離した後に回収し0.45µm濾過器を使用して不純物を除去した培地で、トランスフェクション細胞を5~6日後に採取した。

【0228】

不純物を除去した培地をMabSelect SuRe(GE Healthcare)プロテインAカラム上に載せ、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塩緩衝液pH3.6)で、pH11のトリスで中和した抗体を含有するプールしたフラクションと共に、溶出した。タンパク質は最終的に、Econo-Pac 10DGカラム(Bio-Rad)を使用して脱塩した。

【0229】

場合によっては、以下の方法により、プロテインLクロマトグラフィーでタンパク質を更に精製した。Capto L樹脂PBSをPBSで平衡化させ、1Mのトリスで中和した、プロテインA精製したv875を樹脂に添加し、室温で30分間インキュベーションした。樹脂をPBSで洗浄してフロースルーを収集し、結合したタンパク質を0.1Mのグリシン0.5mL(pH3)で溶出した。

【0230】

場合によっては、ゲル濾過によりタンパク質を更に精製し、抗体混合物3.5mgを1.5mLに濃縮し、1mL/minの流速でAKTA Express FPLCにより、Superdex 200 HiLoad 16/600 200pgカラム(GE Healthcare)に載せた。PBS緩衝液(pH7.4)を、流速1mL/minで使用した。精製した抗体に対応するフラクションを収集し、最大1mg/mLまで濃縮しマイナス80で保存した。

【0231】

代表的な抗原結合構築物は、80%を超える細胞生存能のCHO3E7細胞内で一時的に発現した。

【0232】

実施例3:ハイブリッドヘテロ二量体Fcフォーマットまたはフルサイズ抗体フォーマットにおける、代表的な二重特異的抗原構築物(抗CD3-CD19または抗CD3-CD20)の説明、発現、及び精製

v5850、v5851、v5852、v6325、v1813、v1821及びv1823は、二重特異的CD3/CD19またはCD3/CD20ハイブリッド抗原結合構築物を例示する。これらの二重特異的ハイブリッド変異体は、別のポリペプチド鎖でのscFv-Fcと対になった、鎖AまたはBのいずれかでのFabで構成される。ヘテロ二量体Fcの鎖Aは以下の変異:T350V__L351Y__F405A__Y407Vを含み、ヘテロ二量体Fcの鎖Bは以下の変異:T350V__T366L__K392L__T394Wを含む。v1813、v1821及びv1823はCD3/CD20の共通の軽鎖抗原結合構築物を例示する。共通の軽鎖変異体は2つの異なるFabからなり、それぞれ相補的ヘテロ二量体Fc上に存在し、単一の軽鎖を共有している。特異的変異体組成物を表1に示す。

【0233】

共通の軽鎖変異体に関して、表1に示すもの以外の組み合わせもまた調製及び試験した。

【0234】

(表1)CD3/CD19またはCD20ハイブリッド変異体の組成物

10

20

30

40

50

| | v5850 | V5851 | V5852 | V6325 | v1813 | V1821 | V1823 |
|--------|--|--|--|--|---|--|---|
| フォーマット | ハイブリッド | ハイブリッド | ハイブリッド | ハイブリッド | 共通の 軽鎖 | 共通の 軽鎖 | 共通の 軽鎖 |
| 鎖A | aCD3- BiTE _x _I2 C_scFvFc (VHVL) | aCD3- BiTE _x _I2C_s cFvFc (VHVL) | aCD3- テプリズ マブ- hOKT3_F ab | aCD3- テプリズマブ - hOKT3_Fa b | aCD3- フォラルマブ _Fab | aCD3- I2F6_Fab | aCD3- I2F6_Fab |
| 鎖B | aCD20- オフアツム マブ_Fab | aCD19- MOR208_Fab | aCD19- MOR208 _scFvFc_ (VHVL) | aCD20- オフアツム マブ_scFvFc (VHVL) | aCD20- オフアツム マブ_Fab | aCD20- リツキシマブ_ Fab | aCD20- トシツモマブ _Fab |
| 軽鎖 | aCD20- オフアツム マブ_Fab | aCD19- MOR208_Fab | aCD3- テプリズ マブ- hOKT3 | aCD3- テプリズマブ -hOKT3 | aCD20- オフアツム マブ_Fab | aCD20- リツキシマブ_ Fab | aCD20- トシツモマブ _Fab |
| 参照 | 鎖A - US2011/0 275787 鎖B - WO20040 35607 軽鎖 - WO20040 35607 | 鎖A - US2011/0275 787 鎖B - WO20080221 52 軽鎖 - WO20080221 52 | 鎖A - US20070 077246 鎖B - 軽鎖 - US20070 077246 | 鎖A - US2007007 7246 鎖B - 軽鎖 - US2007007 7246 | 鎖A - WHO 薬剤情報 Vol.24, no2, 2010 鎖B - WO20040 35607 軽鎖 - WO20040 35607 | 鎖A - Pubmed ID: 16313362 鎖B - Drug bank アクセッション 番号: DB00073 軽鎖 - Drug bank アクセッション 番号: DB00073 | 鎖A - Pubmed ID: 16313362 鎖B - Drug bank アクセッション 番号: DB00081 軽鎖 - Drug bank アクセッション 番号: DB00081 |

10

20

30

40

50

【0235】

v5852に使用される抗CD19 MOR208_scFv-Fc(VHVL)は、公表されている可変重鎖配列を、重鎖と軽鎖との間の(GGGGS)₃(配列番号:380)リンカーで表1に示す可変軽鎖配列に融合することにより作製した。可変ドメインをヘテロ二量体Fcの鎖Bに融合した。

【0236】

v6325に使用される抗CD20オフアツムマブ_scFv-Fc(VHVL)は、公表されている可変重鎖配列を、重鎖と軽鎖との間の(GGGGS)₃(配列番号:380)リンカーで表1に示す可変軽鎖配列に融合することにより作製した。可変ドメインをヘテロ二量体Fcの鎖Bに融合した。

【0237】

クローニング、発現、及び精製は、実施例2に記載する通りに実施した。

【0238】

変異体の収量及び純度を下の表2に示す。ヘテロ二量体の純度は、後述のLCMS分析により測定した。例示的な抗原結合構築物の純度はLC-MSにより試験した。抗原結合構築物をまず、実施例2に記載のプロテインA、プロテインL及びSEC精製により精製した。ヘテロ二量体の純度のLC-MS分析を後述のように実施した。

【0239】

精製したサンプルを、6時間370CでPNGase Fにより脱グリコシル化した。MS分析の前に、サンプルをPoros R2カラムに注入して、20~90%ACN 0.1%FAの勾配で3分間溶出し、一つの単一ピークを得た。

【0240】

LCカラムのピークを、以下の設定を用いてLTQ-Orbitrap XL質量分析計で分析した。コーン電圧：50V'チューブレンズ：215V；FT解像度：7,500。質量スペクトルをソフトウェアPromassまたはMaxEnt.と組み合わせ、分子量プロファイルを作製した。

【0241】

ハイブリッドヘテロ二量体Fc構築物及びフルサイズmAb変異体は同等の発現及び精製収量を示す。全ての変異体が、73.8%を超えるヘテロ二量体純度を示し、試験した全ての変異体の平均純度は89.6%であった。サンプルは、全ての生成物の0~5.3%の範囲の、低量の正しくない対のホモ二量体を有した。報告値は、観察した全てのホモ二量体種の合計を示す。半抗体の存在がホモ二量体よりも一般的に観察され、全生成物の0~20.7%の範囲となっていた。報告値は、観察される全ての半抗体種の合計を示す。

10

【0242】

(表2) 変異体の発現及び純度

| フォーマット | ハイブリッド | | | | フルサイズmAb (共通の軽鎖) | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|
| | CD20/ CD3 | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 |
| 標的 | V5850 | V5851 | V5852 | V6325 | v1813 | V1821 | V1823 |
| 発現規模 (ml) | 50 | 50 | 50 | 50 | 500 | 500 | 500 |
| SEC後の量 (mg) | 1.25 | 0.72 | 0.57 | 0.42 | 17.4 | 2.16 | 8.8 |
| ヘテロ二量体 (AB) (%) | 95.6 | 100 | 95.1 | 97.5 | 78.4 | 91.4 | 73.8 |
| ホモ二量体 (AA+BB) (%) | 0 | 0 | 4.9 | 0 | 1.36 | 3.7 | 5.3 |
| 半抗体 (A+B) (%) | 4.4 | 0 | 0 | 2.5 | 20.2 | 4.8 | 20.7 |

20

30

【0243】

実施例4：二重特異的抗原構築物はT細胞及びB細胞に結合する

例示的なCD3/CD20二重特異的抗原構築物v5850、v6325、v1813、v1821、v1823がCD3及びCD20発現細胞に結合する能力を、後述のFACS分析により測定した。更に、例示的な二重特異的抗CD3-CD19抗原結合構築物v5851及びv5852がCD3及びCD19発現細胞に結合する能力を、同様に測定した。二重scFvフォーマットの抗CD3-CD19 BiTE Fc抗体構築物である変異体v875もまた、ベンチマークとして試験した。二重特異的ファミリーの両方に属する変異体において、標的B細胞への結合親和性は、設計したエフェクターT細胞よりも高かった。

40

【0244】

FACSプロトコールによる細胞全体の結合：

2x10⁶細胞/mL(80%を超える生存能)の細胞をL10+GS1培地中に再懸濁して抗体希釈用液と混合し、氷上で1時間インキュベーションした。

【0245】

10mLの冷たいR-2緩衝液を添加し、4で10分間、233gで遠心分離することにより、細胞を洗浄した。細胞ペレットを、蛍光標識した抗マウスまたは抗ヒトIgG

50

100 μL (L10 + GS1 培地中に 1 / 100 で希釈) で再懸濁し、室温で 1 時間インキュベーションした。

【0246】

先に記載したような 10 mL の冷たい R - 2 を添加することにより、細胞処理物を洗浄し、細胞ペレットを 400 μL の冷たい L - 2 再懸濁し、サンプルを N i t e x に通して濾過し、4 μL のヨウ化プロピジウムを含むチューブに入れた。

【0247】

サンプルは、フローサイトメトリーで分析した。

【0248】

発現した各変異体の、速度定数 B m a x 及び K d での結合結果を、以下の表 4 及び 5 に記載する。表 4 は、C D 1 9 及び C D 2 0 発現 R a j i B 細胞への結合について記載しているが、表 5 は、C D 3 発現 J u r k a t T 細胞への結合について記載している。R a j i 結合研究 (表 4) において、C D 1 9 - C D 3 二重特異的二重 s c F v ヘテロ二量体 F c 及びハイブリッドヘテロ二量体 F c 変異体は、低い n M の見かけの親和性及び同等の B m a x で標的 B 細胞に結合した。抗 C D 2 0 - C D 3 二重特異的ハイブリッドヘテロ二量体 F c 及びフルサイズの共通軽鎖変異体は同等の B m a x で標的 B 細胞に結合し、3 つの共通軽鎖変異体のうち 2 つは、B 細胞に対して低い n M の結合親和性を示した。

10

【0249】

J u r k a t 結合研究 (表 5) において、C D 1 9 - C D 3 二重特異的二重 s c F v ヘテロ二量体 F c 及びハイブリッドヘテロ二量体 F c 変異体は、T 細胞に n M の親和性及び同等の B m a x で結合した。C D 2 0 - C D 3 二重特異的ハイブリッドヘテロ二量体 F c 及びフルサイズの共通軽鎖変異体は T 細胞に同等の B m a x で結合し、3 つの共通軽鎖変異体のうち 1 つは、T 細胞に対して n M の結合親和性を示した。

20

【0250】

二重特異的抗 C D 1 9 - C D 3 構築物は全て、予想通り、C D 1 9 B 細胞に高親和性で、かつ C D 3 T 細胞には低親和性で結合した。二重 s c F v ヘテロ二量体 F c 構築物及びハイブリッドヘテロ二量体 F c 構築物は、同等の結合親和性を示した。

【0251】

幾つかの他の共通軽鎖抗 C D 2 0 - C D 3 フルサイズ構築物を試験したが (データは示さず)、変異体 1 8 1 3、1 8 2 1、及び 1 8 2 3 のみが、標的 C D 2 0 B 細胞と C D 3 T 細胞の両方に対して良好な結合を示した。

30

【0252】

(表 4) R a j i

| フォーマット | 二重 scFv | | ハイブリッド | | | | フルサイズ mAb (共通の軽鎖) | | | |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 |
| 変異体 | v875 | v4542 | v5850 | v5851 | v5852 | | v6325 | v1813 | v1821 | v1823 |
| Bmax (OD450) | 2.78 | 2.96 | 4.24 | 3.88 | 該当 せず | | 6.44 | 6.40 | 4.71 | 4.14 |
| KD (nM) | 0.36 | 0.70 | 3.60 | 1.38 | 該当 せず | | 11.87 | 4.04 | 122.5 | 21.05 |

40

【0253】

(表 5) J u r k a t

| | 二重 scFv | | | ハイブリッド | | | フルサイズ mAb (共通の軽鎖) | | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
| | v875 | v4542 | v5850 | v5851 | v5852 | v6325 | v1813 | v1821 | v1823 |
| 標的 | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 |
| Bmax (OD450) | 1.59 | 2.27 | 2.06 | 2.51 | 2.21 | 2.51 | 2.54 | 2.11 | 0.88 |
| KD (nM) | 21.36 | 6.66 | 4.04 | 4.24 | 25.24 | 1.58 | 691.4 | 181.5 | 68.77 |

10

【0254】

実施例5：二重特異的抗CD3 - CD19抗原結合構築物及び二重特異的抗CD3 - CD20抗原結合構築物は、T細胞とB細胞を架橋する

5つの例示的な抗CD3 - CD20抗原結合構築物 - 即ち、v5850、v6325、v1813、v1821及びv1823 - 並びに2つの例示的な抗CD3 - CD19抗原結合構築物 - 即ちv5851及びv5852 - がT細胞とB細胞を架橋する能力を、以下に記載する手順に従って、FACS分析により試験した。更なる構築物、即ちv792及びv875もまた、対照として試験した。v792は、ヘテロ二量体Fcの鎖A及び鎖Bに、トラスツズマブに基づく同一の抗Her2F(ab')を有する二価の抗HER2抗体であり、鎖Aに変異T350V__L351Y__F405A__Y407V及び鎖BにT350V__T366L__K392L__T394W (drug bankアクセッション番号 - DB00072)を含む。

20

【0255】

FACSによる細胞全体の架橋

RPMI中に再懸濁した 1×10^6 細胞/mLを、 $0.3 \mu\text{M}$ のCellTrace標識で標識して混合し、25分間水浴中で、37°Cでインキュベーションした。

【0256】

ペレットを2mLのL10 + GS1 + NaN3中に再懸濁し、最終濃度を 5×10^6 個の細胞/mLとした。

30

【0257】

細胞懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し(1/5希釈)、適切な細胞標識とレーザー設定を確認した。フローチェック及びフローセットFluorosphereを使用し、機器の標準化、光学配列及びフルイデックスを確認した。

【0258】

フローサイトメトリーでの確認後、かつ架橋前に、各細胞株を所望の比率で混合し、最終濃度を 1×10^6 細胞/mLとした。

【0259】

T：T架橋をJurkat - violet + Jurkat - FarRedで測定し、B：BをRAJI - violet + RAJI - FarRedで測定し、T：B架橋をJurkat - violet + RAJI - FarRedで測定した。

40

【0260】

抗体を室温でL10 + GS1 + NaN3中で2倍に希釈し、次いで細胞に添加した後、緩やかに混合して30分間インキュベーションした。

【0261】

30分間のインキュベーションの後、2µLのヨウ化プロピジウムを添加してゆっくりと混合し、直ちにフローサイトメトリーにより分析した。

【0262】

架橋%を、violet及びFar-redで同時に標識した場合の割合として計算し

50

た。

【0263】

表6及び7は、各変異体に関して、Jurkat - Jurkat、Raji - Raji、及びJurkat - Raji間の架橋割合を提供し、それぞれの表は個々の実験を示す。T細胞及びB細胞結合パラトープを有する二重scFv、並びにハイブリッドフルサイズ（共通軽鎖）ヘテロ二量体Fcフォーマットに属する全ての変異体は、Jurkat及びRaji細胞の架橋において効果的であった。更に、変異体は2つのJurkat細胞をいずれも架橋せず、いくつかのRaji - Raji細胞架橋では、異なる程度で観察された。陰性対照v792は特異的（バックグラウンド）T - B、B : B、T : T結合を示さなかった。

10

【0264】

分析は、結合ドメインの形状及び空間的距離が異なるにも関わらず、全てのフォーマット、つまり二重scFvヘテロ二量体Fc、ハイブリッドヘテロ二量体Fc及びフルサイズ抗体フォーマットもまた、T細胞とB細胞を効果的に架橋することができることを示す。更に、CD19及びCD20は共に、T : B細胞結合を誘発するために標的化されることができる。

【0265】

（表6）細胞全体のFACS B : T細胞架橋分析

| フォーマット | | 二重 scFv | ハイブリッド | | フルサイズmAb (共通の軽鎖) | | |
|---------------|------|--------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|
| 変異体 | v792 | v875 | v5850 | v5851 | v1813 | v1821 | v1823 |
| 標的 | 陰性対照 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD19/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 | CD20/ CD3 |
| 架橋 (%) | | | | | | | |
| Jurkat/Jurkat | 0.5 | 1.6 | 0.8 | 1.0 | 0.6 | 0.5 | 0.7 |
| Raji/Raji | 2.6 | 10.2 | 2.1 | 1.6 | 7.0 | 2.4 | 2.1 |
| Jurkat/Raji | 2.6 | 17.0 | 11.6 | 23.2 | 16.2 | 7.3 | 8.1 |

20

30

【0266】

（表7）細胞全体のFACS B : T細胞架橋分析

| | | 二重 scFv | ハイブリッド | | |
|---------------|------|--------------|-----------|--|-----------|
| 変異体 | v792 | v875 | v5852 | | v6325 |
| 標的 | 陰性対照 | CD19/ CD3 | CD19/ CD3 | | CD20/ CD3 |
| 架橋 (%) | | | | | |
| Jurkat/Jurkat | 0.7 | 0.5 | 0.9 | | 1.1 |
| Raji/Raji | 0.7 | 8.6 | 7.2 | | 0.7 |
| Jurkat/Raji | 1.9 | 15.7 | 30.4 | | 15.7 |

40

【0267】

実施例6：向上した生物物理学的特性のための、二重特異的抗CD3 - CD19抗原結

50

合構築物の発現、精製、及び生物物理学的性質決定

実施例 1 に記載されている抗原結合構築物を、実施例 2 に記載の通りクローニング、発現、及び精製し、最終生成物の純度及び収量を、実施例 3 に記載の通り LC / MS 及び UPLC - SEC により推定した。CD 19 + 標的 Raji B 細胞、及び CD 3 + Jurkat 細胞への細胞全体の飽和性結合を、実施例 4 に記載の通り測定した。

【0268】

v 8 7 5 及び v 6 7 5 4 の精製結果を図 3 A 及び 3 B に示す。二重 scFv ヘテロ二量体 Fc 変異体 v 8 7 5 はプロテイン A 精製後に相当量の高分子量のアグリゲートを示したが、ハイブリッドヘテロ二量体 Fc 変異体 v 6 7 5 4 は、標準的な治療用モノクローナル抗体に見られるものに類似した、1 つの主なピークを示す。二重 scFv ヘテロ二量体 Fc 変異体及びハイブリッドヘテロ二量体 Fc 変異体を共に、LC / MS 及び HPLC - SEC で確認したように、98% を超える均質性で精製した。

10

【0269】

図 3 C は、最適化した変異体の向上した収量、及び対応する最適化戦略を示す。具体的には、ハイブリッド変異体は、v 8 7 5 と比較して収量及びヘテロ二量体純度の全体的な向上を示した。

【0270】

変異体は更に、VHVLジスルフィド安定化により、及び実施例 1 に記載の scFv に CDR 変異の安定化を加えることで、製造可能性を向上することができると考えられている。可変ドメインジスルフィドエンジニアリングは、特異的可変及び軽鎖、並びに VH - VL 界面に大変依存することが知られている。これは全ての scFv に当てはまらず、著しく低下した収量、及び / または抗原結合の喪失をもたらす可能性がある [Miller et al., Protein Eng Des Sel. 2010 Jul; 23 (7): 549 - 57; Igawa et al., MAbs. 2011 May - Jun; 3 (3): 243 - 5; Perchiacca & Tessier, Annu Rev Chem Biomol Eng. 2012; 3: 263 - 86]。変異体 v 6 7 4 7 は v 8 7 5 に対する等価な変異体であり、両方の scFv が、実施例 1 に記載の VL - VHジスルフィドにより安定化されている。図 3 C は、v 8 7 5 と比較して、ジスルフィド安定化 v 6 7 4 7 におけるより高い収量、及び明らかな結合親和性の喪失がないことを示す。これらの実験は、抗 CD 19 及び抗 CD 3 scFv が共に、収量を増加させ、かつ結合親和性の喪失なく、ジスルフィドエンジニアリングにより安定化されることができ

20

30

【0271】

実施例 7 : 二重特異的抗原構築物の Raji 及び Jurkat 細胞への結合

図 2 に記載されている二重特異的抗原構築物 1 8 5 3、6 7 5 4、6 7 5 0、及び 6 7 5 1 の、CD 19 及び CD 3 発現細胞への結合能力を、実施例 4 に記載されている FACS により測定した。実施例 1 に記載されている変異体である v 8 7 5 及び v 1 6 6 1 の結合特性を、比較物として使用した。

【0272】

図 4 は結果の一覧を提供する。二重 scFv ヘテロ二量体 Fc 及びハイブリッドヘテロ二量体 Fc 変異体を含む全ての変異体は、CD 19 Raji B 細胞に低い nM 親和性で、及び CD 3 T 細胞に 5 ~ 30 nM の低い見かけの親和性で結合する。実施例 9 : FACS による二重特異的抗原構築物の T : B 細胞結合の分析。

40

【0273】

二重特異的抗 CD 3 - CD 19 抗原結合構築物の、T 細胞と B 細胞を架橋しクラスター形成する向上した能力を、以下の通り FACS 分析により試験した。

【0274】

手短に言えば、RPMI 中に懸濁した 1×10^6 細胞 / mL を、適切な $0.3 \mu\text{M}$ の Cell Trace 標識で標識し、混合して水浴で 25 分間、37 °C でインキュベーションした。

50

【0275】

JurkatまたはRaji細胞を以下の通り作製した。細胞培養物を対数期まで増殖させた後、遠心分離にかけた。細胞ペレットを2 mLのL10 + GS1 + NaN3中に再懸濁し、最終濃度を 5×10^6 細胞/mLとした。細胞懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し(1/5希釈)、適切な細胞標識とレーザー設定を確認した。フローチェック及びフローセットFluorosphereを使用し、機器の標準化、光学配列及びフルイデックスを確認した。フローサイトメトリーでの確認後、かつ架橋前に、各細胞株を所望の比率で混合し、最終濃度を 1×10^6 細胞/mLとした。

【0276】

T:T架橋はJurkat-violet + Jurkat-FarRedで測定し、B:BはRAJI-violet + RAJI-FarRedで測定し、T:BはJurkat-violet + RAJI-FarRedで測定した。試験抗体をL10 + GS1 + NaN3中、室温で2倍まで希釈し、次いで細胞に添加した後、緩やかに混合して30分間インキュベーションした。30分間のインキュベーション後、2 μ Lのヨウ化プロピジウムを添加してゆっくりと混合し、直ちにフローサイトメトリーにより分析した。架橋%を、violet及びFar-redで同時に標識した場合の割合として計算した。

10

【0277】

図5は、試験したハイブリッド変異体に対するT:B(%)をまとめている。これらの結果は、ハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体1853及びv6476は共に、二重scFvヘテロ二量体Fc変異体v875と同等に、CD19 + Raji細胞及びCD3 + Jurkat細胞(右側の表)を架橋することができることを示している。図5の左側のパネルは、CD19 + Raji細胞及びCD3 + Jurkat細胞における、変異体875(二重scFv)及び参照用の891(scFv)に対する、架橋結果を示す。

20

【0278】

実施例8：顕微鏡検査法による、T:B細胞シナプス(T細胞偽足)形成の分析

例示的な変異体の、T細胞シナプス及び偽足の形成能力を以下の通り評価した。このアッセイにより試験した変異体は、875、1661、1853及び6476を含んだ。フルサイズCD3/CD19二重特異的抗体(CD3及びCD19抗原結合ドメインの両方がFabフォーマットにある)である変異体6518もまた、試験した。

30

【0279】

標識したRaji B細胞(赤)及び標識したJurkat T細胞(青)を、3 nMのヒトIgGまたはv875で30分間、室温でインキュベーションした。細胞懸濁液を遠心分離により濃縮し、続いて180 μ Lの上清を除去した。細胞を残体積中で再懸濁し、200倍及び400倍でイメージングした。

【0280】

Openlabソフトウェアを使用し、顕微鏡画像(200倍)を入手して疑似カラーリングし、重ね合わせてTIFFに変換した。細胞を次に、Image Jソフトウェアの細胞カウンターを使用して数を数え、5つの異なる集団に分け入れた。

40

1. Tのみ(T:Tも含む)
2. Bと会合したT(偽足なし)
3. Bと会合したT(偽足あり、即ち、三日月様構造を示したT細胞)
4. Bのみ(B:Bも含む)
5. Tと会合したB

【0281】

いくつかの細胞では、Openlabソフトウェアの元画像及び位相差画像の評価が、適切な分類のために必要であった。次いで、B細胞に会合したT細胞の合計%、糸状仮足を有するB細胞に会合したT細胞の合計%、糸状仮足を有するB細胞に会合したT細胞の%、T細胞に会合したB細胞の%、及び全体のB:T(%)を測定することができた。

【0282】

50

結果を図6に示し、シナプスの細胞全体FACS分析により、バックグラウンドの5～8倍であると定量化されたように、また位相差顕微鏡法、及びB:B細胞ではなくT:B細胞間の特異的なシナプス形成により示された通り、これらはハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体(1853及び6476)、フルサイズ二重特異的(6518)、及び二重scFvヘテロ二量体Fc(875及び1661)フォーマットもまた、T:B細胞シナプス(T細胞偽足)の形成により、CD19⁺Raji B細胞及びJurkat T細胞を架橋することができることを示している。

【0283】

分析は、結合ドメインの形状及び空間的距離が異なるにも関わらず、二重scFvヘテロ二量体Fc及びハイブリッドヘテロ二量体Fc、並びにフルサイズ抗体フォーマットもまた、T細胞とB細胞を効果的に架橋し、T細胞が仲立ちする標的細胞溶解が示すように、T細胞シナプス及び偽足形成の仲立ちを行うことができることを示している。

10

【0284】

実施例9：ヒト全血における自己B細胞の枯渇

二重特異的CD19-CD3変異体の、IL2活性下におけるヒト血液初代細胞培養での自己B細胞枯渇能力を分析した。このアッセイで試験した変異体は、二重scFvヘテロ二量体Fc変異体875及び1661、並びにハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体1853、6754、6750、及び6749(図7A)であった。フルサイズ二重特異性抗体v6518もまた、このアッセイにおいて、別の実験で試験した(図7B)。非特異的対照として、図7AにおいてFcブロックと称される、Fab結合アームを含まないホモ二量体Fcを使用した。

20

【0285】

手短に言えば、変異体をヘパリン添加ヒト全血中で、IL2の存在下で2日間インキュベーションした。4つ組のウェルを各対照及び実験条件に対して配置し、培養物を5%CO₂、37℃でインキュベーションし、48時間で停止した。赤血球を、培養物回収後に溶解させ、収集した初代細胞をCD45、CD20及び7-AAD FACS検出のために染色した。CD45⁺、CD45⁺/CD20⁺及びCD45⁺/CD20⁺/7AAD⁺/-集団のFACS分析を、以下の通りInCytel/FlowJoで実施した：FSC/SSC及び補正用ウェル(compensation well)の5,000事象と、実験ウェルの30,000事象とを、サイトメトリーにより分析した。閾値は、細片及びRBCをスキップするように設定した。ゲーティングはリンパ球、CD45⁺、CD20⁺、及び7AAD⁺細胞で実施した。

30

【0286】

図7A及び7Bは、IL2インキュベーション後のヒト全血中での自己B細胞濃度への、二重特異的抗CD19-CD3抗原結合構築物の細胞毒性効果を示す。変異体は全て、このアッセイにおいて0.1nMでCD20⁺B細胞を最大限枯渇させることができた。

【0287】

分析は、結合ドメインの形状及び空間的距離が異なるにも関わらず、二重scFv、ヘテロ二量体、及びハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体、並びにフルサイズ抗体フォーマットもまた、ヒト初代血液培養物中でB細胞を効果的に枯渇させることができることを示している。

40

【0288】

実施例10：IL2活性化ヒトPBMC及びG2白血病細胞を移植したNSGマウスにおける、CD19-CD3ヘテロ二量体変異体のインビボ有効性

インビボマウス白血病モデルにおける、選択した変異体の有効性を測定した。このモデルでは、NSG(NODスキッド)マウスに、IL2活性化ヒトPBMC及びG2白血病細胞を移植した。

【0289】

予備実験として、選択した変異体の、G2白血病細胞株への結合能力を試験した。

【0290】

50

ヒト G2 ALL 腫瘍細胞株への結合のインビトロ FACS :

予め冷却された G2 細胞 (1×10^6 個の生存細胞 / チューブ) を氷上で 2 時間、CO₂ 非存在下で、0、0.1、0.3、1、3、10、30、および 100 nM の濃度の氷冷二重特異的試薬 huCD3 x huCD19、並びに 10% の熱不活性化ウシ胎児血清、及び 1% ヤギ血清 (L-10 + GS1) を 200 μ L / チューブの最終体積で含む Leibovitz L15 緩衝液と共に、3 つ組みでインキュベーションした。インキュベーション後、細胞を 4 mL の氷冷 Leibovitz L15 で洗浄し、ペレットを、L-10 + GS1 中で 1 / 100 に希釈した 100 μ L の氷冷 Alexa fluor 488 タグ付け抗ヒト抗体 (Jackson ImmunoResearch) 中に再懸濁した。15 分以上暗室に放置した後、4 mL の Leibovitz L15 を添加し、細胞をペレットにして、次に、2 μ g / mL の 7AAD を含む 200 μ L の氷冷したフローサイトメトリー用ランニング緩衝液中に再懸濁した後、フローサイトメトリーにより分析した。平均蛍光強度を使用して、各細胞株に対する各二重特異的試薬の Kd を測定する結合曲線を作成した。

10

【0291】

図 8 は、代表的な変異体 873、875、及び 1661 が G2 ALL 細胞に結合することができることを示す。

【0292】

IL2 活性化ヒト PBMC 及び G2 白血病細胞を移植した NSG マウスにおけるインビボ有効性 :

20

マウスの全グループへの細胞源として単一のドナーを使用して、NOD / SCID / γ μ ¹ (NSG) マウス (N = 5 / グループ) に、 3×10^6 個の活性化した (抗 CD3 / 抗 CD28 [1 ビーズ / CD3 + 細胞] + 50 U IL2 / mL で 5 日間) ヒト PBMC を混合した 1×10^5 個の G2 - CBR1uc / e GFP 細胞を静脈内注入した。フローサイトメトリーを使用して、T 細胞の活性化状態 (CD3、CD4、CD8、CD25、CD69、CD45RO、CD62L、及び CCR7) 並びに生存能 (7AAD) を評価した。

【0293】

マウスは、PBMC 及び G2 の移植の 1 時間後、0、2、及び 4 日目に 3 mg / kg の投与量で、二重特異的変異体の第一投与 (n = 5 / グループ) を受け、5 日目に終了した。腫瘍の進行後に、マウスに D-ルシフェリン (150 マイクログラム / g 体重) を注射し、続いて 10 分後にベースラインで、並びに注入後 9、14 及び 18 日目に、全身の生物発光イメージング (BLI) を行った。18 日目に動物は終了し、エクスピボ BLI (生物発光イメージング) のために脾臓を採取した。

30

【0294】

加えて、最初の 3 mg / kg の経静脈投与の 24 時間後に、コホート当たり動物 2 匹から血清サンプルを採集した。血清サンプルを実施例 17 に示すように分析し、24 時間の血清中濃度を図 15 に示す。結果を図 15 C に示し、試験した CD3 - CD19 二重特異的変異体の IgG1 様の PK を確認した。

【0295】

図 9 は、G2 白血病細胞を移植した場合の全身及び単離された脾臓における、二重 scFv ヘテロ二量体 Fc FcgR ノックアウト変異体 1661 の効果を示す。v1661 は、G2 ALL 細胞の完全な枯渇を示し、ALL に感染した主な臓器及び組織内には、有意な G2 移植物は見られないことを示す。

40

【0296】

図 10 は、共に野生型 IgG1 Fc (FcγR ノックアウト変異はなし) を有する、二重 scFv ヘテロ二量体 Fc 変異体 v875 及びハイブリッドヘテロ二量体 Fc 変異体 v1853 の効果を示す。これらの条件下において、共に野生型 Fc を含有する変異体 875 及びハイブリッド 1853 は、全身イメージングにおいて、Fc ノックアウトを有する等価な二重 scFv ヘテロ二量体 Fc 変異体 1661 と比較して、G2 枯渇量の低下を

50

示す。二重 s c F v ヘテロ二量体及びハイブリッドヘテロ二量体 F c 構築物は共に、フォーマットの違いにも関わらず、全身の生物発光イメージングにおいて同等な G 2 枯渇量を示す。

【0297】

実施例 11：NSG マウスにおける二重特異的抗 CD 3 - CD 19 抗原結合構築物の薬学動態

メス NSG マウス (N O D . C g - P r k d c ^{s c i d} I l 2 r g ^{t m 1 w j l} / S z J) への一回の 0 . 8 m g / k g 経静脈投与後の、一投与量での v 8 7 5 の薬学動態 (P K) を測定した。Her 2 に結合する対照の単一特異的抗体の P K もまた測定した。

【0298】

手短に言えば、精製した v 8 7 5 を 1 日目に経静脈注射により、1 m g / k g の用量で尾静脈に投与した。約 0 . 0 5 0 m L の血液サンプルを、選択した時点 (1 時点当たり動物 3 匹) で、注射後最大 7 2 時間まで、下顎静脈または伏在静脈から収集した。前処理した血清サンプルは、特定の実験を受けたことがない動物から入手した。血液サンプルを室温で 1 5 ~ 3 0 分間、凝固させた。血液サンプルを、2 7 0 0 r p m で 1 0 分間、室温で遠心分離にかけ、血清を得た。血清サンプルを 3 つのチューブに分け、分析するまで - 8 0 に保った。

【0299】

血清中濃度は、標準的な抗ヒト F c L I S A により測定した。別々に測定した精製 v 8 7 5 の検量線を使用して、v 8 7 5 の血清中濃度を測定した。血清中濃度を、W i n n o n L i n ソフトウェア (バージョン 5 . 3) を使用して分析した。

【0300】

図 1 1 は、注射後最初の 1 2 時間と、最初の 7 2 時間の、NSG マウスにおける二重 s c F v ヘテロ二量体 F c 変異体 v 8 7 5 の P K プロファイルと、I g G 対照抗体 v 5 0 6 (v 5 0 6 は治療用抗体トラスツズマブ (ハーセプチン (G e n e t e c h)) 、対照として使用) に相当する P K プロファイルを示す。

【0301】

実施例 12：ヒト P B M C における二重特異的ヘテロ二量体による T 細胞活性化の標的 B 細胞依存性

標的 B 細胞上での、例示的な二重特異的ヘテロ二量体変異体 6 7 5 4 による T 細胞活性化の依存性を、ヒト P B M C 内で測定した。実験は、後述のように実施した。

【0302】

ヒト血液 (1 2 0 ~ 1 4 0 m L) をドナーから収集し、P B M C を新鮮なままドナーから単離した。P B M C を更に処理して亜集団を i) P B M C 、及び i i) B 細胞を含まない P B M C (P B M C - B) に誘導した。自己 B 細胞及び T 細胞を 0 日目に、F A C S により同定した。4 つ組のウェルを各対照及び実験条件に関して配置し、P B M C 培養液を 5 % C O 2 、3 7 でインキュベーションし、7 2 時間で停止した。自己 T 細胞及び B 細胞について、培養液中及び 7 A A D + 細胞量におけるそれぞれの割合を測定した。細胞ペレットをフローサイトメリー分析のため、種々の抗体カクテル内で再懸濁した。G u a v a 8 H T フローサイトメーターを、細胞亜集団の分析のために使用した。

【0303】

結果を表 8 及び図 1 2 に示す。表 1 3 はドナー P B M C プロファイルを提供する。健康なドナーから収集したヒト P B M C 内の平均 E : T 比は、C D 3 + T 細胞対 C D 1 9 + B 細胞が約 1 0 : 1 であった。

【0304】

(表 8)

10

20

30

40

| | CD3+T細胞/ CD45+リンパ球(%) | CD4+T細胞/ CD3+フラクション(%) | CD8+T細胞/ CD3+フラクション(%) | CD19+B細胞/ CD45+リンパ球(%) |
|-------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ドナー 1 | 74.1 | 60.5 | 39.2 | 9.4 |
| ドナー 2 | 69.1 | 69.1 | 39.2 | 11.2 |
| ドナー 3 | 77.1 | 72.8 | 32.2 | 7.5 |

【0305】

図12は、 $v6754$ が最大 10 nM までは、B細胞を欠いているPBMCの培養液中のT細胞は活性化しないが、全PBMC内にB細胞が存在する場合は最低 0.01 nM の濃度であってもT細胞を活性化することを示す。 $v6754$ は、最大のエキスピボB細胞枯渇を仲立ちする濃度において、強固な標的依存性T細胞活性化を示す(図7)。

10

【0306】

実施例13：二重特異的ヘテロ二量体変異体は、ヒト初代血液培養物内の対照よりも、ヒトT細胞増殖を刺激しない

例示的なハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体 6754 の、ヒトPBMCでの自己T細胞増殖を誘発する能力を、後述のように評価した。

【0307】

細胞生存アッセイ：1日目に、4人の各ドナーから血液を収集し、PBMCを新鮮なまま単離した。試験品目を、 0.3 及び 100 nM の最終濃度で調製し、PBMCと混合して $250,000$ 細胞/ウェルで配置した。前記混合物を3日間インキュベーションした後、トリチウム標識したチミジンを、細胞含有ウェルに添加して、最終的に $0.5\text{ }\mu\text{Ci}$ チミジン/ウェルとした。プレートを更に18時間インキュベーションし、その後プレートを凍結した。合計のインキュベーション時間は4日間であった。プレートを濾過し、カウンターを使用して数を数えた(CPM)。平均から、刺激指数(SI)を以下の通り計算し、データを表にした：試験項目の平均CPM/媒体の平均CPMのみ。

20

【0308】

結果を表9及び図13に示す。健康なドナーから収集したヒトPBMC内の平均E:T比は、CD3+T細胞対CD19+B細胞が最大 $10:1$ であった。

【0309】

(表9)

| | CD45+リンパ球中の CD3+T細胞(%) | CD3+フラクション中の CD4+T細胞(%) | CD3+フラクション中の CD8+T細胞(%) | CD45+リンパ球中の CD19+B細胞(%) |
|------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| ドナー1 | 61.7 | 60.1 | 32.8 | 7.9 |
| ドナー2 | 66.7 | 75.1 | 26.3 | 7.8 |
| ドナー3 | 72.8 | 72.2 | 30.0 | 8.4 |

30

【0310】

図13に示すとおり、商業用の治療用抗体 Δ 口モノクローナルOKT3は、降順で、 0.3 nM で最もT細胞増殖を仲立ちする。 891 (BiTE) >6754 ：この血清中濃度において、OKT3及びBiTEは、副作用と関連している(例えば、Chatenoud et al., J Immunol 137(3):830-8(1986); Abramowicz et al., Transplantation 47(4):606-8(1989); Goebeler et al. Annals Oncology 22, Suppl 4:abstract 068(2011); Bargou et al. Science 321(5891):974-7(2008); Topp et al., J Clin Oncol 29(18):2493-8(2011); Kligner et al. Blood 119(28):6226-33(2010); 及び国際特許出願番号WO2011051307A1を参照のこと)。 6754 により誘発されたT細胞増殖は、 0.3 nM 及び最大 100 nM のOKT3及びBiTEにより誘発されたT細胞増殖量を、著しく下回っている。 $v6754$ は、最大のB細胞枯渇を起こし、十分なT細胞増殖を誘発した(しかし、ベンチマークよりは大変低い量)(図7)。

40

【0311】

実施例14：二重特異的ヘテロ二量体変異体は、対照と比較して、ヒト初代血液培養物

50

において低いサイトカイン放出量を示す

休止ヒトPBM C内で、例示的な変異体6754により誘発されたサイトカイン放出量を測定した。

【0312】

サイトカイン放出アッセイ：1日目に、4人の各ドナーから血液を収集し、PBM Cを新鮮なまま単離した。試験品目を、0.3及び100nMの最終濃度で調製し、PBM Cと混合して250,000細胞/ウェルで配置した。前記混合物を4日間インキュベーションした。インキュベーション後、複製物の上清をプールしてサイトカイン測定に使用し、2回の測定では、BD BiosciencesからのCBAヒトTh1/Th2サイトカインキットIIを使用した。このキットはIL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF及びIFNを測定する。

10

【0313】

結果を表10及び図14に示す。健康なドナーから収集したヒトPBM C内の平均E:T比は、CD3+T細胞対CD19+B細胞が約10:1であった。

【0314】

(表10)

| | CD3+T細胞/ CD45+リンパ球(%) | CD4+T細胞/ CD3+フラクション(%) | CD8+T細胞/ CD3+フラクション(%) | CD19+B細胞/ CD45+リンパ球(%) |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ドナー1 | 74.1 | 60.5 | 39.2 | 9.4 |
| ドナー2 | 69.1 | 69.1 | 39.2 | 11.2 |
| ドナー3 | 77.1 | 72.8 | 32.2 | 7.5 |

20

【0315】

図14は、7nMの濃度の商業用の治療用抗体ムロモナブ-OKT3よりも、v6754は100nMの濃度で、IFN、TNF、IL-2、IL-6及びIL-10サイトカイン量を著しく低い量で誘発したことを示す。7nMの血清中濃度では、OKT3は副作用に関係する(例えばChatenoud et al., J Immunol 137(3):830-8(1986), 及びAbramowicz et al., Transplantation 47(4):606-8(1989)を参照)。

【0316】

BiTEは、同等のv6754の濃度で、IFN、IFN、IL-2、IL-6及びIL-10サイトカインを同等の量かより高い量で誘発する。v6754は、エクスピボでのB細胞枯渇を最大限仲立ちする濃度で、サイトカインを低レベルで誘発する(図7)。

30

【0317】

実施例15：例示的ヘテロ二量体変異体のインビボマウス薬学動態

例示的な二重特異的ヘテロ二量体変異体である1853の薬学動態(PK)をマウスで測定した。変異体1853が、FcのFcRへの結合をロックアウトするCH2変異を含有しないことを除いて、変異体1853は変異体6754と同一である。実験は、後述のように実施した。

【0318】

NSGマウスにおける薬学動態：メスNSGマウス(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)への一回の3mg/kg経静脈投与後の、一投与量での1853の薬学動態を測定した。1853を1日目に、経静脈注射により尾静脈に、3mg/kgの投与量で投与した。約0.050mLの血液サンプルを、選択した時点(1時点当たり動物3匹)で、下顎静脈または伏在静脈から収集した。前処理した血清サンプルは、特定の試験を受けたことがない動物から入手した。血液サンプルを室温で15~30分間、凝固させた。血液サンプルを、2700rpmで10分間、室温で遠心分離にかけ、血清を得た。血清サンプルを3つのチューブに分け、分析するまで-80に保った。血清中濃度は標準的な抗ヒトFcLuminesxにより測定した。別々に測定した精製1853の検量線を使用して、1853の血清中濃度を測定した。PKパラメーターを、ノンコンパートメントモデル分析を用いてWinNonLinで計算した。

40

50

【 0 3 1 9 】

結果を表 1 1 並びに図 1 5 A 及び B に示す。

【 0 3 2 0 】

(表 1 1) NSG マウスでの v 1 8 5 3 の PK パラメーター

PK パラメーター

| | |
|--|-------|
| C_{max} [$\mu\text{g}/\text{mL}$] | 33.1 |
| AUC [$\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$] | 811.8 |
| V_{ss} [mL/kg] | 131.8 |
| Cl [$\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$] | 3.6 |
| MRT [h] | 36.7 |
| $t_{1/2}$ [h] | 25.7 |

10

【 0 3 2 1 】

表 1 1 は、1 8 5 3 で測定した PK パラメーターを示す。図 1 5 は、NSG (NOD スキッド、NOD.Cg-Prkdc^{s c i d} Il2rg^{t m 1 W j 1}/SzJ) マウスでの 3 mg/kg の 6 7 5 4 の単回経静脈投与では、マウスでの、24 時間を超える IgG 1 様クリアランス及び半減期となるということを示している (図 1 5 B は、対数目盛を使用してプロットした図 1 5 A のデータを示す)。v 6 7 5 4 は、典型的なヒト IgG 様薬学動態：マウス内での半減期、分布及びクリアランスを示す。

20

【 0 3 2 2 】

加えて、実施例 1 2 に詳細を記載したインビボ有効性研究の一部として、血清サンプルを、最初の 3 mg/kg の経静脈投与の 24 時間後に、2 匹の動物から収集した (実施例 1 2)。血清サンプルを上述の通り分析し、24 時間での血清中濃度を図 1 5 C に示す。経静脈注射後の 24 時間での曝露量 (図 1 5 C) は、PK 研究において観察された曝露量に等しく (図 1 5 A、B)、試験した CD3 - CD19 二重特異的変異体が、IgG 1 様の PK であることを確認している。

【 0 3 2 3 】

実施例 1 6：ヒト化 NSG マウスのインビボヒト B - ALL 異種移植モデルにおける二重特異的ヘテロ二量体変異体の効果

30

例示的な変異体である v 6 7 5 4 の、ヒト化 (CD34+) NSG マウス (E:T 約 1:5) におけるインビボヒト B - ALL 異種移植モデルでの効果を評価した。v 6 7 5 4 の、このモデルにおける自己 B 細胞を枯渇させる (図 1 6)、T 細胞を活性化し再分布させる (図 1 7)、並びにサイトカイン放出を制御する (図 1 8) 能力を、後述のように測定した。

【 0 3 2 4 】

ヒト化 (CD34+) NSG マウスは Jackson Laboratory から入手した。2 週齢の NSG (NOD スキッド、NOD.Cg-Prkdc^{s c i d} Il2rg^{t m 1 W j 1}/SzJ) マウスに、ヒト胎児肝臓のヒト (CD34+) 多能性造血幹細胞 HSC を注入した。ヒト化 (CD34+) NSG マウスは 12 週以内にヒト T 細胞及び B 細胞の分化系列を発達させる。ヒト化 (CD34+) NSG マウスでの、B 細胞に対する T 細胞の平均比率は最大 1:5 である。v 6 7 5 4 は単回の 3 mg/kg 経静脈投与で投与した。

40

【 0 3 2 5 】

ヒト化 NSG マウスでのインビボ有効性：二重特異的抗原構築物のインビボ細胞毒性を以下の通り試験した。手短に言えば、ヒト化 (hCD34+) NSG マウスに、1 日目に 3 mg/kg で、v 6 7 5 4 を単回経静脈ボラス投与し、自己循環 B 細胞及び T 細胞数、並びに末梢血、骨髄、及び脾臓でのヒトサイトカイン量を、注射の 4 ~ 6 時間後、並びに 2 日目及び 5 日目に測定した。ヒト CD45、CD20、CD4、CD8、及び CD6

50

9を標識した後、FACSによりT細胞及びB細胞集団を分析した。ヒトサイトカインIFN、TNF、IL2、IL6、IL10を測定した。末梢血、骨髄、及び脾臓での自己B細胞の枯渇をFACSにより監視した。末梢血中でのB細胞及びT細胞集団を、1日目の注射の2週間前に分析したレベルに対して正規化した。

【0326】

自己B細胞の枯渇：自己B細胞の枯渇におけるv6754の効果を示す結果を図16に示す。図12は、処理前のヒト化NSGマウスにおける平均リンパ球集団を示す。図16は、ヒト化NSGマウスにおける6754のインビボ有効性を示す。

【0327】

(表12)

| リンパ球中の huCD45+ | huCD45+フラクション中の huCD19+B細胞 (%) | huCD45+フラクション中の huCD3+T細胞 (%) | huCD45+フラクション中の huCD4+T細胞 (%) | huCD45+フラクション中の huCD8+T細胞 (%) |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 30-50% | 60-80% | 20-30% | 15-20% | 5-10% |

【0328】

図16に示すとおり、v6754の単回経静脈投与(3mg/kg)後、B細胞は投与5日後にはヒト化NSGマウス内での末梢血、骨髄、及び脾臓では観察されず、低いE:T比(1:5)を示した。

【0329】

自己T細胞のインビボ活性化及び再分布動力学：ヒト化(CD34+)NSGマウスにおける、v6754が仲立ちした自己T細胞のインビボ活性化及び再分布動力学の評価(E:Tは約1:5)を上述の通り実施した。

【0330】

結果を図17に示す。インビボで自己B細胞を完全に枯渇させるv6754の投与量において(図16)、自己T細胞は、4時間後にCD69+染色で測定した通り、一時的に活性化した。末梢T細胞数は、v6754の注射後減少して数時間で最下点に達し、5日以降にベースラインまで回復した。T細胞活性化及び減少した血清数プロファイルは、公表されているブリナツモマブでの発見(Klinger et al. Blood 119(28):6226-33(2010))を参照)と類似しているが、効果は更に適当なものであり、二重特異的抗原構築物はT細胞活性化対ブリナツモマブの「適切な」量で、B細胞の枯渇を最大限仲立ちすることができることを示唆している。CD3-CD19ハイブリッド及び二重scFvヘテロ二量体Fcフォーマットは、その特異的形狀、並びに得られるT細胞の関与、シナプス形成及び動力学の性質から、一層制御されたT細胞活性化を可能にする。

【0331】

ヒト化NSGマウスにおけるインビボサイトカイン放出：上述の通り、ヒトサイトカインIFN、TNF、IL2、IL6、IL10を測定した。結果は図18に示し、v6754が、単回の3mg/kgの経静脈投与後に、ヒト化NSGマウスにおいてサイトカイン放出を誘発したことを表している。サイトカイン放出は一時的なものであり、最初の数時間でピークとなった。3mg/kg投与量でのピーク量は、公表されている臨床サイトカイン量以下であった。単回の3mg/kg経静脈投与の後、v6754は適度かつ一時的なサイトカイン放出を誘発した。サイトカイン放出パターンは、公表されているブリナツモマブでの発見(Klinger(2010))を参照)と類似しているが、効果は更に適切なものであり、再び、二重特異的抗原構築物は、B細胞の最大限の枯渇に対して「適切な」レベルでT細胞を活性化することができることを示唆している。

【0332】

実施例17：ヒト及びマカクザルへの種間結合活性を有する二重特異的CD3-CD19結合構築物の、インビトロ及びエクスピボ性質決定

CD19-CD3ハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体5851(実施例2及び3に記載されているクローニング及び構築物)は、既知の変域ドメインから構築されており、ヒト及びマカクザルのCD19及びCD3に結合することが知られている。v5851を発

10

20

30

40

50

現させ、LC/M5及び全細胞FACS結合により、実施例3～5に記載されているように精製及び同定した。精製したv5851は更に、実施例11に記載したように、ヒト初代血液培養物におけるエクスピボ活性を分析した。

【0333】

図19は、二重scFvヘテロ二量体Fc変異体v875と比較した、IL2インキュベーション後のヒト全血中の自己B細胞濃度での、種間反応性v5851構築物の細胞毒性効果を示す。変異体は共に、0.1nMでのこのアッセイにおいて、CD20+B細胞を最大限枯渇させることができた。

【0334】

分析は、抗CD3及び抗CD19可変ドメインの両方の違い、並びに二重scFvヘテロ二量体Fcとハイブリッドヘテロ二量体Fcとの結合ドメインの形状の違いにもかかわらず、二重scFvヘテロ二量体Fc変異体v875、及び種間反応性ハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体v5851が、ヒト初代血液培養物において0.1nMの最少測定濃度で、同等のエクスピボ有効性を示すことを示している。

【0335】

追加の表

(表XX)例示的な抗CD3-CD19、または抗CD3-CD20抗原結合構築物の変異体番号、並びに、重鎖(H1及びH2)、並びに該当する場合、軽鎖(L1及びL2)のクローン名

クローンの核酸及びポリペプチド配列は、表YYを参照のこと。

| 変異体番号 | H1(クローン) | H2(クローン) | L1(クローン) | L2(クローン) |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| 873 | 1064 | 1065 | n/a | n/a |
| 875 | 1064 | 1067 | n/a | n/a |
| 1661 | 2183 | 2176 | n/a | n/a |
| 1653 | 1842 | 2167 | n/a | n/a |
| 5850 | 3320 | 2317 | 2325 | n/a |
| 5851 | 3320 | 2307 | 2312 | n/a |
| 5852 | 2304 | 3322 | 2309 | n/a |
| 6325 | 2304 | 3916 | 2309 | n/a |
| 1813 | 2313 | 2317 | 2325 | 2325 |
| 1821 | 2303 | 1342 | 1335 | 1335 |
| 1823 | 2303 | 2316 | 2323 | 2323 |
| 1853 | 2304 | 2175 | 2309 | n/a |
| 6754 | 5239 | 2185 | 2309 | n/a |
| 10151 | 5239 | 6691 | 2309 | n/a |
| 6750 | 5241 | 5238 | 2310 | n/a |
| 6751 | 5242 | 2176 | 2310 | n/a |
| 6475 | 2305 | 2171 | 2310 | n/a |
| 6749 | 5242 | 2177 | 2310 | n/a |
| 10152 | 5242 | 6689 | 2310 | n/a |
| 10153 | 5242 | 6690 | 2310 | n/a |
| 6518 | 2304 | 2305 | 2309 | 2310 |
| 6476 | 2305 | 2170 | 2310 | n/a |

【0336】

(表YY1)表XXに記載したクローンの核酸配列

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| 9. | 2304 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTCACCCCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCC GGACCCCTGAAGTACATATGTGTGCTGCGGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCTAGAGAGGAACAGTACAATCAACCTATAGGGTCTGT AGCGTCTGACAGTGTGCACCCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCAC TGCCCGCCCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGCAAAA |
| 10. | 2304 | CH3 | GGCCAGCCTAGGGAACACAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGACGAGCTGACAAAAGAACAGGTCTCCC TGACTTGTCTGGTGAAGGATTTTACCCAAAGTGATATGCTGTGGAGTGGGAATCAATGGCCAGCCGAAAA CAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCGCCCTGGTCTCCAAGCTGACTGTGGAT AAATCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACCC AGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC |
| 11. | 2307 | 完全 | GAGGTCCAGCTGGTTCGAATCCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGGAGTCTGAAACTGTCATGCGCCGCTA GGGGCTATACCTTCACATCTTACGTGCATGACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGCAAGGACTGGAATGGATCGG ATATATTAACCCATACAATGACGGCCTAAGTATAACGAGAAAATTTACGGGCAGAGTGACCATCAGCTCCGAT AAGAGCATTTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTAGTCTGAGGAGCGAAGACACCCGCATGTACTATTGGCGTC GGGGACCTACTATTACGGAAACAAGAGTGTTCGATTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCAAGCGC TTCCACAAGGGGCCCTTCTGTGTTCCACTGGCACCCTCCTCTAAATCTACTAGTGGAGGCACCCGAGCCCTG GGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCAAGTGTGCATGGAACAGCGGGCAGCTGACTAGCGGG TCCATACCTTTCCCTGCGCTGTGCAGAGTTTCAAGCCTGTATAGCCTGAGCTCCGTGGTCCACAGTCCATCTAG TTCCTGGGACTCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACTAAAGTCGACAAGAAAGTG GAACCCAAAGTCTGTGATAAAAACACATACTTGGCCACCTTGTCTGACCCAGAGCTGTGGGAGGACCAATCCG TGTTCCTGTTCCACCCAAAGCCTAAAGATACCTGATGATTAGTGCACACCAGAAGTGCATGCGTGGTGTGCT GGAGCTGAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTTCGAGGTGCATAATGCCAAG ACCAAAACCCAGGAGGAAACAGTATAATAGTACATACAGAGTCTGTGCTGCTGACCCCTCCTGCACCCAGGATT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCTTCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTT TAAGGCCAAAAGGGCAGCCCTCGAGAACCACAGGTCTATGTGCTCCATCACGGGATGAGCTGACAAAAGAAC CAGGTGACGCTGCTGTGCTGGTGAAGGGTTCACCCCTGTGACATCGCTGTGGAGTGGGAAAGTAAATGGAC AGCCTGAAAACAATATCTGACTTGGCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCTTTCTGTACAGCAAGCT GACCGTGGACAATCCGATGGCAGCAGGGCAACGTCTTTTCATGTAGCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAAT CATTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCCGGCAAA |
| 12. | 2307 | VH | GAGGTCCAGCTGGTTCGAATCCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGGAGTCTGAAACTGTCATGCGCCGCTA GGGGCTATACCTTCACATCTTACGTGCATGACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGCAAGGACTGGAATGGATCGG ATATATTAACCCATACAATGACGGCCTAAGTATAACGAGAAAATTTACGGGCAGAGTGACCATCAGCTCCGAT AAGAGCATTTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTAGTCTGAGGAGCGAAGACACCCGCATGTACTATTGGCGTC GGGGACCTACTATTACGGAAACAAGAGTGTTCGATTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCAAGC GCTTCCACAAGGGGCCCTTCTGTGTTCCACTGGCACCCTCCTCTAAATCTACTAGTGGAGGCACCCGAGCCCTG |
| 13. | 2307 | CH1 | GCTTCCACAAGGGGCCCTTCTGTGTTCCACTGGCACCCTCCTCTAAATCTACTAGTGGAGGCACCCGAGCC TGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCAAGTGTGCATGGAACAGCGGGCAGCTGACTAGCGG GGTCCATACCTTTCCCTGCGCTGTGCAGAGTTTCAAGCCTGTATAGCCTGAGCTCCGTGGTCCACAGTGCATCT AGTTCACCTGGGACTCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACTAAAGTCGACAAGAAAG TG |
| 14. | 2307 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCCAAGCCTAAAGATACTCTGATGATTAGTC GCACACCAGAAGTACTTGGCTGTGCTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGAGCGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGAGGAACAGTATAATAGTACATACAGAGCTGTG TCAGTGTGACCGTCTGCACCCAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCCT TGCCCGACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGCAAAA |
| 15. | 2307 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTCTATGTGCTGCCCTCCATCACGGGATGAGCTGACAAAAGAACAGGTACGCC TGTGCTGTCTGGTGAAGGTTTACCCCTCTGACATCGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGACAGCCTGAAAA CAATTATCTGACTTGGCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCTTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAATCCCGATGGCAGCAGGGCAACGTCTTTTCATGTAGCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCCGGC |
| 16. | 2309 | 完全 | GATATTCAGATGACCCAGAGCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCAACATCACATGCTCCG CTTCTAGTTTCAAGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGACTCCAGGGAAGGCACCCAAAACCGTGGATCTACGA TACCTCAAAGCTGGCCAGCGGAGTGCCTCCAGATTTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACAGACTATACTTTTACC ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATATGCTACTTACTATTGCCAGCAGTGGTCTAGTAAATCCACTTTTG GCCAGGGGACCAAGCTGCAGATCACAAGGACTGTGGCCGCTCCAGCGTCTTCAATTTTCCCTTAGCGACGA GCAGCTGAAATCTGGCAGCCAGTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCTCCGGAAGCAAGGTTGCAG TGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGCGTGCAGAACAGGACTCCAAGGATTTCTA CTTATAGTCTGTCAAGCACCTGACACTGTCCAAGCTGACTACGAGAAGCAAAAAGTGTATGATGCAAGT CACCCATCAGGAGTGTCTCTCTGTGACAAAATCTTTTAAACAGAGGGCAATGT |
| 17. | 2309 | VL | GATATTCAGATGACCCAGAGCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCAACATCACATGCTCCG CTTCTAGTTTCAAGTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGACTCCAGGGAAGGCACCCAAAACCGTGGATCTACGA TACCTCAAAGCTGGCCAGCGGAGTGCCTCCAGATTTCAGCGGCTCCGGGTCTGGAACAGACTATACTTTTACC ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATATTGCTACTTACTATTGCCAGCAGTGGTCTAGTAAATCCACTTTTGG GCCAGGGGACCAAGCTGCAGATCACA |
| 18. | 2309 | CL | AGGACTGTGGCCGCTCCAGCCTCTTCAATTTTCCCTTAGCGACGAGCAGCTGAAATCTGGCACAGCCAGTG TGTCTGTCTGTGTAACAATTTCTACCTCCGGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGAG TGGAACAGCCAGGAGAGCTGACAGAACAGGACTCCAAGGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCCCTGACA CTGTCCAAGCTGACTACGAGAAGCACAAGGTATGCATGCGAAGTCAACCCATCAGGAGTGTCTCTCTCTGT TGACAAAATCTTTTAAACAGAGGCGAATGT |
| 19. | 2310 | 完全 | GATATTCAGCTGACTCAGTCAACCGCTAGCCTGGCAGTGTGCTGGGCCAGAGGGCCACCATCAGCTGCAAGG CTTCCAGAGCGTTCGACTACGATGGCGACAGTACTGAACTGGTATCAGCAGATCCCTGGGCGACCCCTAA ACTGCTGATCTACAGCCCTCTAATCTTGTGAGTGGCATCCCCACGCTTCTCCGGCTCTGGGAGTGGAACT GATTTTACCCTGAACATTCACCCCTGGAGAAGGTGCAGCCGCTACATACCATGCGCAGCAGTCCACAGAGG ACCCCTGGACTTTCCGGCGGGGAAACCAAGCTGGAAATCAAACGGACAGTGGCAGCCCATCCGTCTTCAATTT TCCCTCCATCTGACGAGCAGCTGAAATCAGGGACTGCTAGCGTGGTCTGTCTGTGAAACAATTTTACCCAAAG GAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGAATTTCTCAGGAGAGTGTGACAGAACAGG ATTCAAAGGACAGCACTTATTTCCCTGAGCTCCACCTGACACTGTCCAAAGCTGATTACGAGAAGCACAAGT |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | GTATGCATGCCAAGTCACCCATCAGGGACTGTCTAGTCCCCTGACAAAGCTTTCAATCGAGGGCAATGT |
| 20. | 2310 | VL | GATATTCAGCTGACTCAGTCACCCGCTAGCCTGGCAGTGAAGTCTGGGCCAGAGGGCCACCATCAGCTGCAAGG CTTCACAGAGCGCTGACTACGATGGCGACAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGATCCCTGGGCAGCCCCCTAA ACTGCTGATCTACGACCGCTCTAATCTGGTGAAGTGGCATCCCCCACCCTTCTCCGGCTCGGGAGTGGAACT GATTTTACCCTGAACATTCACCCGCTGGAGAAGGTGCAGCCGCTACATACCATTGCCAGCAGTCCACAGAGG ACCCCTGGACTTTCCGGCGGGGAACCAAGCTGGAATCAAA |
| 21. | 2310 | CL | CGGACAGTGGCAGCCCCATCCGTTCTTCAATTTTCCCTCCATCTGACGAGCAGTGAATCAGGGACTGCTAGCG TGGCTGTCTGCTGAACAATTTTACCACAAGAGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAAGTCGATAACGCCCTGACAGTC CGGAAATTTCTCAGGAGAGTGTGACAGAACAGGATTCAAAGGACAGCAGCTTATTTCCCTGAGCTCCACCCCTGACA CTGTCCAAAGCTGATTACGAGAAGCAAAAGTGTATGCATGCGAAGTCAACCATCAGGGACTGTCTAGTCCCC TGACAAAGTCTTTCAATCGAGGGCAATGT |
| 22. | 2183 | 完全 | GATATTCAGCTGACACAGAGTCTTGCATCACTGGCTGTGAGCCTGGGACAGCGAGCAACTATCTCCTGCAAA CCAGTCAGTCAGTGGACTATGATGGCGACTCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAA GCTGCTGATCTACGACCGCTCAAATCTGGTGAAGCGGATCCCACCAGTATCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACT GATTTTACCCTGAACATTCACCCGCTGGAGAAGGTGGACCGCGCTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACCGAGG ACCCCTGGACATTCGGCGGGGAACAACTGGAATCAAGGGAGGAGGAGCAGTGGCCGGAGGAGGTCAGG AGGAGGAGGAAGCCAGGTGCAGTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGTCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAAT TCCGTGAAGGCTTCTGGCTATGCATTTTCTAGTTACTGGATGAATGGGTGAAGCAGAGGACAGGACAGGGCC TGGATGGATCGGGCAGATTTGGCCCCGGGATGGAGACACCAACTATAATGGAAGTTCAAAGGCAAGGCCAC ACTGACTGCTGACGAGTCAAGCTCCACAGCCTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCAAGCGAGGATTTCCGCCGT TACTTTTGGCTCGGAGAGAAACCAACTGTGGGAGGTACTATTACGCTATGGACTACTGGGCGCAGGGGA CCACAGTCACCGTGTCAAGCGCAGCCGAACCCAAATCCTCTGATAAGACCCACACATGCCCTCCATGTCAGG TCTGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCCTTAAACCTAAGGACACACTGATGATCTCTCGG ACACCCGAAGTCACTTTGTGTGGTCTGTGAGCGTGAGCCACGAGGACCCGTAAGTCAAATTCACCTGGTACGTTG ATGGCCCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCTAAGCCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACTTACCCTGCTGTCT TGTCCTGACCGTCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAATGCAAGGTGAGCAACAGGCACTG CCAGCCCCCTCGAGAAGACAATTTCCAAAGCAAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTCTATGTGTACCCAC CCAGCCGGGACGAGTGCACAAAACCAAGGCTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACTCTCTGATAT TGCCGTGGAGTGGAAAAGTAATGGCCAGCCAGAAAACAATTACAAGACTACCCCTCCAGTGTGATTTCTGAC GGGAGTTTCCGTCTGGTCAAGTAACTGACTGTGGATAAGTCAAGGTGGCAGCAGGAAAGCTCTTTAGTTGTT CAGTGATGCACGAGGCACTGCACAATCATTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG |
| 23. | 2183 | VL | GATATTCAGCTGACACAGAGTCTTGCATCACTGGCTGTGAGCCTGGGACAGCGAGCAACTATCTCCTGCAAA CCAGTCAGTCAGTGGACTATGATGGCGACTCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAA GCTGCTGATCTACGACCGCTCAAATCTGGTGAAGCGGATCCCACCAGTATCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACT GATTTTACCCTGAACATTCACCCGCTGGAGAAGGTGGACCGCGCTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACCGAGG ACCCCTGGACATTCGGCGGGGAACAACTGGAATCAAG |
| 24. | 2183 | VH | CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGTGGTGCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAATTTCCCTGTAAGGCTT CTGGCTATGCATTTTCTAGTTACTGGATGAATGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCCTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCCGGGGATGGAGACACCAACTATAATGGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTGCTGAC GAGTCAAGCTCCACAGCCTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCAAGCGAGGATTTCCGCCGTGACTTTTGGCTC GGAGAGAAAACCAACTGTGGCGAGTACTATTACGCTATGACTACTGGGCGCAGGGGACACAGTCAACCGT GTCAAGC |
| 25. | 2183 | CH2 | GCTCCTGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCCTTAAACCTAAGGACACACTGATGATCTCTC GGACACCCGAAGTCACTTGTGTGGTCTGTGAGCGTGAGCCACGAGGACCTGAAAGTCAAATTCACCTGGTACGT GGATGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAAACCTAAGCCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACTTACCCTGCTGTG TCTGTCTGACCGTGTCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAATGCAAGGTGAGCAACAGGCA TGCCAGCCCCATCGAGAAGACAATTTCCAAAGCAAAG |
| 26. | 2183 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTATGTGTACCACCCAGCCGGGACGAGCTGACCAAAAACCAAGGCTCCC TGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACTCTCTGATATTGCCGTGGAGTGGGAAAAGTAATGGCCAGCCAGAAAA CAATTACAAGACTACCCCTCCAGTGTGGATTTCTGACGGGAGTTTCGCTCTGGTCAAGTAACTGACTGTGGAT AAGTCAGCGTGGCAGCAGGAAAGGCTTTAGTTGTTTCAAGTGTGATGCAGGAGGCACTGCACAATCATTACACC AGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGG |
| 27. | 2312 | 完全 | GACATTTGATGACACAGTCCCTGCACTCTGAGTCTGTCACCAGGCGAGCGGGCTACCTGAGTTGAGAA GCTCCAAGAGCCTGCAGAACGTGAATGGAAACACATACCTGTATTTGGTTCCAGCAGAAAACAGGCCAGTCTCC CCAGCTGCTGATCTACAGGATGTCAAATCTGAACAGCGGAGTGCTGACCGCTTCCAGCGCTCCGGGTCTGGA ACCGAGTTCACCCGACAAATTTCTAGTCTGGAGCCCGAAGATTTCCGAGTCTACTATTGCATGCAGCAGCTGG AGTATCCTATCACCTTTGGCGCTGGGACAAAAGCTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCATCCGCTTTCAT CTTTCCCTTCTGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCCC AGAGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAAGTCGATAATGCCCTGCAGAGTGGGAACTCACAGGAGAGCGTGACTGAAC AGGACTCCAAGGATTTACTCTATAGTCTGTCAAGCACTTGACCTGAGCAAAGCTGACTACGAGAAGCACAA AGTGTATGCATGCGAAGTCAACATCAGGGGCTGTCTCTCCCTGACTAAAAGCTTTAATCGGGGAGAGTGT GACATTTGATGACACAGTCCCTGCCACTCTGAGTCTGTCACCAGGCGAGGGGGCTACCTGAGTTGAGAA GCTCCAAGAGCCTGCAGAACGTGAATGGAAACACATACCTGTATTTGGTTCCAGCAGAAAACAGGCCAGTCTCC CCAGCTGCTGATCTACAGGATGTCAAATCTGAACAGCGGAGTGCTGACCGCTTCCAGCGCTCCGGGTCTGGA ACCGAGTTCACCCGACAAATTTCTAGTCTGGAGCCCGAAGATTTCCGAGTCTACTATTGCATGCAGCAGCTGG AGTATCCTATCACCTTTGGCGCTGGGACAAAAGCTGGAGATCAAG |
| 28. | 2312 | VL | GACATTTGATGACACAGTCCCTGCCACTCTGAGTCTGTCACCAGGCGAGGGGGCTACCTGAGTTGAGAA GCTCCAAGAGCCTGCAGAACGTGAATGGAAACACATACCTGTATTTGGTTCCAGCAGAAAACAGGCCAGTCTCC CCAGCTGCTGATCTACAGGATGTCAAATCTGAACAGCGGAGTGCTGACCGCTTCCAGCGCTCCGGGTCTGGA ACCGAGTTCACCCGACAAATTTCTAGTCTGGAGCCCGAAGATTTCCGAGTCTACTATTGCATGCAGCAGCTGG AGTATCCTATCACCTTTGGCGCTGGGACAAAAGCTGGAGATCAAG |
| 29. | 2312 | CL | CGAAGTGTGGCCGCTCCATCCGCTTCTATCTTTCCCTTCTGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACAGCCTCTG TGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCAGAGAAGCAAAGGTGCAGTGGAAAAGTCGATAATGCCCTGCAGAG TGGGAACTCACAGGAGAGCGTGAAGTGAACAGGACTCCAAGGATTTCTACTATAGTCTGTCAAGCACTCTGACC CTGAGCAAAGCTGACTACGAGAAGCAAAAGTGTATGCATGCGAAGTCAACATCAGGGGCTGTCTCTCCCG TGACTAAAAGCTTTAATCGGGGAGAGTGT |
| 30. | 2313 | 完全 | CAGGTCCAGCTGGTGAATCCGGAGGAGGAGTGGTCCAGCCTGGACGATCTCTGAGACTGAGTTGGCCGCTT CAGGGTTCAAGTTTACGGGGTACGGAATGCAGTGGTGAAGCAGGCACCAGGCAAAGGGCTGGATGGTCCG CGTGTCTGATGACGGCAGCAAGAAGTACTATGTCGATTTCTGTAAGGGCAGGTTCCACTATGCCCAGC AACTCCAAAATAACACTGTACTTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGCCGAAGACACCGCTGTGTACTATTGCGCCA GGCAGATGGGCTATTGGCACTTGCATCTGTGGGACGAGGAACCTGGTCAAGTGAAGTCCGATCTACAAA |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | GGGGCCAGTGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACTTCTGGAGGAACCCGAGCACTGGGATGTCTG GTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGTCAACCGTGTGGAAGTCCAGGGGCTCTGACCTCCGAGTCCATACAT TTCCAGCAGTGTGCAGTCAAGCGGCCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAGTTCAAGCCTGGG GACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACCAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCAAG AGCTGTGATAAAACACATACTTGCACCTTGTCTCCTGCACAGAGCTGTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGT TTCCACCCAAAGCCTAAAGACACTCTGATGATTTCCCGGACACCCGAAGTGTGCTGTGGTGGTGGACGTGTC TCACGAGGACCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCC CGAGAGGAACAGTACAATTAACATATCGGGTCTGTGAGCCTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGTGAACG GCAAGGAGTATAAGTCAAAGTGAATAAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGCTAA AGGGCAGCCTCGGAACCAAGTCTACGTGTATCCCTCCATCTCGAGACGAGCTGACTAAGAACCAGGTGAGT CTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTTTACCCTAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGACAGCCAGAAA ACAAATTATAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCACTGGTCAAGTGAAGTGAAGTGGG TAAATCAAGATGGCAGCAGGGCAACGCTTTAGTGTTCAGTGTATGAGGCGCTGCACAATCATTACACT CAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCTGGCAAA |
| 31. | 2313 | VH | CAGGTCCAGCTGGTGAATCCGAGGAGGAGTGGTCCAGCCTGGACGATCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTT CAGGGTTCAAGTTTAGCGGGTACGGAATGCACCTGGGTGAGGCGAGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCG CGTGATCTGGTATGACCGCAGCAAGAAGTACTATGTGATTTCTGTGAAGGGCAGGTTCAACATTAGCCCGCAG AACTCCAAAATAACACTGTACTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGCCGAAGACCCGCTGTACTATGCGCCA GGCAGATGGGCTATTGGCACTTCGATCTGTGGGACGAGGAACCCCTGGTCAAGTGAAGTCC |
| 32. | 2313 | CH1 | GCATCTACAAAGGGGCCAGTGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACTTCTGGAGGAACCCGAGCAG TGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATCTCCAGAGCCCGTCAACCGTGGTGGAACTCAGGGGCTGGAGTCCGG AGTCCATACATTTCCAGCAGTGTGCTGAGTCAAGCGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAGT TCAAGCCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACCAAAGTTCGACAAGAAAG TG |
| 33. | 2313 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACTCTGATGATTTCC GGACACCCGAAGTGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GGATGGCGTTCGAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCCCGAGAGGAACAGTACAATTAACATATCGGGTCTGT AGCGTCTGACTGTGCTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTCAAAGTGAAGTGAAGTGAAGTCT TGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGCTAAA |
| 34. | 2313 | CH3 | GGGACAGCTCGCGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCATCTCGAGACGAGCTGACTAAGAACCAGGTGAGTC TGACCTGTCTGGTGAAGGGTTTTACCCTAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGACAGCCAGAAA CAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCACTGGTCAAGTGAAGTGAAGTGGG AAATCAAGATGGCAGCAGGGCAACGCTTTAGTGTTCAGTGTATGAGGCGCTGCACAATCATTACACTC AGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCTGGC |
| 35. | 2316 | 完全 | CAGGCTTACCTGCAGCAGTCCGAGCAGAACTGGTCCGACCAGGAGCTTCCGTGAAAATGTCTTGCAAAGCAA GTGGCTACACTTTCACCAGCTATAACATGCACCTGGGTGAAACAGACACCTCGACAGGACTGGAGTGGATCGG AGCAATCTACCAGGGAACGGAGACACTAGCTATAATCAGAAGTTTAAAGGGAAGGCTACACTGACTGTGGAT AAGAGCTCCTCTACTGCATACATGCAGTGTGCTCACTGACCAGCGAAGACTCCGCTGTGATTTCTGCGCAA GGTGGTCTACTACTCCAATTTCTACTGCTACTTCGATGTGTGGGGCACTGGGACCAGTCAACCTGAGCTC CGCTCAACCAAGGACCTAGCGTGTTCACCTGGCTCCCTCTAGTAAAGTACATCAGGAGGAAGTGCAGCT CTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCTTGGAACAGTGGGGCACTGACATCTG GATCCATACTTTTCCCTGCGTGTGCTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAAG TTCAAGCTGGGAACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAACCAAGCAATACCAAGTTCCGACAAGAAA GTGGAACCAATCTCTGTGATAAGACTCATACTGCCACCTTGTCTGCACAGAGCTGTGGGAGGACCAT CCGTGTTCTGTTCACCCAAACCTAAGGACACCCCTGATGATTTCTAGAACCCAGAAAGTCAATGCGTGGT CGTGGAGTGAACCCAGGAGCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCT AAAACAAAGCCCGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTATAGAGTGTGTCTGTCTGACAGTGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAATGCAAGTGAAGCAACCAAGCACTCCCGCCCTATCGAGAGCAAT TTCCAAAGCTAAGGACAGCTAGGGAACCAAGTCTACGTGTGCTGCCTCCATCTCGGACGAGCTGACTAAA AACCAGGTGACTGTGTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATG GCCAGCTGAAAACAATTAACCTGACCTGGCCCGCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGTAA ACTGACAGTGGATAAGTCAAGCTGGCAGCAGGGAAAGCTTTAGCTGTTCCGTGATGATGAGGCGCTGCAC AATCATTACACCCAGAAATCTCTGACTGTCTGACCCGGCAAG |
| 36. | 2316 | VH | CAGGCTTACCTGCAGCAGTCCGAGCAGAACTGGTCCGACCAGGAGCTTCCGTGAAAATGTCTTGCAAAGCAA GTGGCTACACTTTCACCAGCTATAACATGCACCTGGGTGAAACAGACACCTCGACAGGACTGGAGTGGATCGG AGCAATCTACCAGGGAACGGAGACACTAGCTATAATCAGAAGTTTAAAGGGAAGGCTACACTGACTGTGGAT AAGAGCTCCTCTACTGCATACATGCAGTGTGCTCACTGACCAGCGAAGACTCCGCTGTGATTTCTGCGCAA GGTGGTCTACTACTCCAATTTCTACTGCTACTTCGATGTGTGGGGCACTGGGACCAGTCAACCTGAGCTC C |
| 37. | 2316 | CH1 | GCCTCAACCAAGGACCTAGCGTGTTCACCTGGCTCCCTCTAGTAAAGTACATCAGGAGGAAGTGCAGCTC TGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCTTGGAACAGTGGGGCACTGACATCTGG AGTCCATACTTTTCCCTGCGCTGTGCTGCAAGCGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAAGT TCAAGCCTGGGAACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAACCAAGCAATACCAAGTTCGACAAGAAAG TG |
| 38. | 2316 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAACCGTGTTCCTGTTTCCACCCAACCTAAGGACACCCCTGATGATTTCTA GAACCCAGAAAGTCAATGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GGATGGCGTTCGAGTGCATAATGCTAAAACAAAGCCCGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTATAGAGTCTGT TCTGTCTGACAGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAATGCAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA TGCCCGCCCTATCGAGAAGACAATTTCCAAAGCTAAG |
| 39. | 2316 | CH3 | GCACAGCTAGGGAACCAAGTCTACGTGTGCTCCCTCCATCTCGGACGAGCTGACTAAAAACCAGGTGAGTC TGCTGTCTGTGGTGAAGGGATTCTATCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGCAGCCTGAAAA CAATTACCTGACCTGGCCCGCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACAGTGGAT AAGTCAAGCTGGCAGCAGGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGATGAGGCGCTGCACAATCATTACACCC AGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGC |
| 40. | 2317 | 完全 | GAAGTCCAGCTGGTCCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGACGATCCCTGAGACTGTCTTGGCCCGCTA GTGGCTTCACTTTTAAAGACTATGCAATGCACCTGGGTGCGCCAGGACACCAGGGAAGGACTGGAGTGGTGGAG |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | CACCATCTCCTGGAACAGCGGATCTATTGGCTATGCAGACAGCGTGAAGGCGAGTTTCAAAATCAGTCCGGAT AAGGCCAAGAAATCACTGTACTTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGGAAGACACAGCTCTGTACTATTGCCCA AGGATATTCACTATGGGAACACTATTACGGAATGGACGTGTGGGGCCAGGGGACCACAGTCAACCGTGTAGCTC CGCCTCAACAAAGGGGCCAGCGTGTTCCTACTGGCTCCCTCTAGTAAAAGTACCTCAGCGGGACAGCAGCC CTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGTCAACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCTCTGACAAGCG GGTCCACTACTTTTCCAGCAGTGTCTGAGTCAAGCGGCTGTATTCCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAG TTCAAGCTGGGGACTCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAAAGCCATCTAATACCAAAAGTGCACAGAAA GTGGAACCCCAAGAGTGTGATAAAAACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAGAGCTGTGGGAGGACCAT CCGTGTTCCTGTTCACCCCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCAGGACTCCCGAAGTCACTGTGGTGT CGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCCGAGGTGCATAATGT AAGACAAAACCCGAGAGGAACAGTATAAATCCACTTACCAGGCTGTCTGTCTGACCTGTCCAGCCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTCAAAAGTGTCTAATAAGGCTCTGCCCGACCTATCGAGAAAACAAT TAGCAAGGCTAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTATGTGCTGCCCTCAAGCAGGGACGAGCTGACTAAG AACCGAGTCTCCCTGTGTGTCTGGTGAAGGTTCTACCCTAGTGTATCGCAGTGGAGTGGGAATCAAATG GACAGCCAGAAAACAATTATCTGACATGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAGCTTCTTTCTGTACTCCAA GCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGCTGTTCCTGTATGCATGAGGCCCTGCAC AATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGCAAA |
| 41. | 2317 | VH | GAAGTCCAGCTGGTTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGACGATCCCTGAGACTGTCTTGGCCGCTA GTGGCTTCACTTTTAAAGACTATGCAATGCAGTGGGTGCCCGAGGCACCAGGAAGGGACTGGAGTGGGTGAG CACCATCTCCTGGAACAGCGGATCTATTGGCTATGCAGACAGCGTGAAGGCGAGTTTCAAAATCAGTCCGGAT AAGCCCAAGAAATCACTGTACTTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGGAAGACACAGCTCTGTACTATTGGCCCA AGGATATTCACTATGGGAACACTATTACGGAATGGACGTGTGGGGCCAGGGGACCACAGTCAACCTGTAGCTC |
| 42. | 2317 | CH1 | GCCTCAACAAAGGGGCCAGCGTGTTCCTACTGGCTCCCTCTAGTAAAAGTACCTCAGCGGGACAGCAGCC TGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGTACCCTGTCTTGGAAACAGTGGCGCTCTGACAAGCGG GGTCCATACTTTTCCAGCAGTGTGAGTCAAGCGGCTGTATTCCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAGT TCAAGCCTGGGGACTCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAAAGCCATCTAATACCAAAAGTCGACAAGAAAG TG |
| 43. | 2317 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTCACCCCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCA GGACTCCCGAAGTCACTTCCGTGTGCTGGAGCTGTCCAGGAGGACCCGGAAGTCAAGTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCCGAGGTGCATAAATGCTAAGACAAAACCCGAGAGGAACAGTATAAATCCACTTACCAGGCTCGT TCTGTCTGACCGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTCAAAAGTGTCTAATAAGGCTC TGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTAGCAAGGCTAAA |
| 44. | 2317 | CH3 | GGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTATGTGCTGCCCTCAAGCAGGGACGAGCTGACTAAGAACCAGGTCTCC TGCTGTGTCTGGTGAAGGGTTCACCTAGTGTATCGCAGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAAAA CAATTAATCTGACATGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACTGTGGAT AAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGCTGTTCCTGTATGCATGAGGCCCTGCACAAATCATTACACCC AGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGC |
| 45. | 2323 | 完全 | CAGATCTCCTGTCTACAGAGCCCGCTATCTCTGTCCGCATCTCTGGCGAGAAGGTGACCATGACATGCCGAG CTAGCTCCTCTGTCTCCTACATGCAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAGTTCACCTAAACCATGGATCTACGC CCCATCAAACCTGGCTAGCGGAGTGCAGCAGCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACATCCTATTCTCTGACT ATTTCTAGAGTGGAGGCTGAAGACGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGTCTTCAATCCCCCTACCTTTG GAGCAGGGACAAAAGCTGGAGCTGAAAAGGACCGTGGCAGCCCTAGTGTCTTCAATTTTTCCACCCTCCGACG ACAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCACGGCAGGCCAAGGTGCAG TGGAAAGTGCATAACCGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTACTGAACAGGACTCCAAGGATCTA CCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCCTGAGCAAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCTTCCGGAAGT CACACATCAGGGACTGTCTAGTCTGTGACTAAAAGCTTTAACAGAGGCGAATGT |
| 46. | 2323 | VL | CAGATCTCCTGTCTACAGAGCCCGCTATCTCTGTCCGCATCTCTGGCGAGAAGGTGACCATGACATGCCGAG CTAGCTCCTCTGTCTCCTACATGCAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAGTTCACCTAAACCATGGATCTACGC CCCATCAAACCTGGCTAGCGGAGTGCAGCAGCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACATCCTATTCTCTGACT ATTTCTAGAGTGGAGGCTGAAGACGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGTCTTCAATCCCCCTACCTTTG GCGCAGGGACAAAAGCTGGAGCTGAAA |
| 47. | 2323 | CL | AGGACCGTGGCAGCCCTAGTGTCTTCAATTTTTCCACCCTCCGACGAAACAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTG TGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCCACGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGCATAACCGCTCTGCAGAG TGGCAACAGCCAGGAGAGCGTACTGAACAGGACTCCAAGGATTTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACC CTGAGCAAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCCTCCGAAGTCAACATCAGGGACTGTCTAGTCTCTG TGACTAAAAGCTTTAACAGAGGCGAATGT |
| 48. | 2325 | 完全 | GAATCGTCTGACACAGTCCCCGCCACTCTGAGTCTGTACCAGGGCAGAGGGCTACCTGTCTTGGCCGG CAAGCCAGTCCGTGAGCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCAGACTGCTGATCTA CGACGCATCCAACCGAGCAACCGGCATCCCCGACGGTTCCTTGGCAGTGGGTGAGGAACAGACTTTACCCTG ACAAATCTTAGTCTGGAGCCGAAGATTTCCGTGTGTACTATTGCCAGCAGAGGTCTAATTGGCCATACCT TTGGCCAGGGACACGGCTGGAGATTAAGAGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTTCCCCCTAGCGA CGAACAGCTGAAATCCGGCACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCAGGGCAAAGGTG CAGTGGAAAGTGCATAACCGCCTGCAGAGCCGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAGGATT CAACCTATAGCCTGTCAAGCACTCTGACCCCTGAGCAAAAGTGTATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCATGCGA AGTCAACATCAGGGACTGTCTCTCCCTCACTAAAAGCTTTAACCGAGGCGAATGT |
| 49. | 2325 | VL | GAATCGTCTGACACAGTCCCCGCCACTCTGAGTCTGTACCAGGGCAGAGGGCTACCTGTCTTGGCCGG CAAGCCAGTCCGTGAGCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCAGACTGCTGATCTA CGACGCATCCAACCGAGCAACCGGCATCCCCGACGGTTCCTTGGCAGTGGGTGAGGAACAGACTTTACCCTG ACAAATCTTAGTCTGGAGCCGAAGATTTCCGTGTGTACTATTGCCAGCAGAGGTCTAATTGGCCATACCT TTGGCCAGGGACACGGCTGGAGATTAAGAGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTTCCCCCTAGCGA CGAACAGCTGAAATCCGGCACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCAGGGCAAAGGTG CAGTGGAAAGTGCATAACCGCCTGCAGAGCCGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAGGATT CAACCTATAGCCTGTCAAGCACTCTGACCCCTGAGCAAAAGTGTATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCATGCGA AGTCAACATCAGGGACTGTCTCTCCCTCACTAAAAGCTTTAACCGAGGCGAATGT |
| 50. | 2325 | CL | AGAAGTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTTCCCCCTAGCGACGAAACAGCTGAAATCCGGCACAGCCTCTG TGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGCATAACCGCCTGCAGAG CGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAGGATTTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACTCTGACC CTGAGCAAAAGTGTATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCATGCGAAGTCAACATCAGGGACTGTCTCTCCCG TCACTAAAAGCTTTAACCGAGGCGAATGT |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| 51. | 2170 | 完全 | GACATCAAACCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGACAA GCGGCTACACCTTCACACGGTATACTATGCACTGGGTGAAACAGAGACCCGGCCAGGGGCTGGAAATGGATCGG ATATATTAACCCCTCCCGAGGCTACACCAACTATAATCAGAAGTTTAAAGACAAGGCCACCCTGACCACAGAT AAGAGCTCCCTTACAGCTTACATGCAGCTGAGTTCAGTACTGACTAGTGAGGACTCAGCTGTGACTTATTTGGCAA GGTACTATGACGATCATTACTGTCTGGATTATTTGGGACAGGGCACTACCCTGACTGTGAGTCCGTGGAAGG AGGGAGCGGAGGCTCCGGAGGATCTGGCGGGAGTGGAGGCGTGGACGATATCCAGCTGACCCAGTCCCCAGCA ATTATGTPCCGCTCTCCCGGCGAGAAAGTACTATGACCTGCGCGCTCTAGTTCAGTACGTACATGAACT GGTATCAGCAGAAAATCAGGCACCAGCCCCAAGAGATGGATCTACGACACATCCAAAGTCCGCTTCTGGGGTGCC TTATAGTTCAGTGGGTGAGGAGCGGCACTTCCTACTCTCTGACCATTAGCTCCATGGAGGCAGAAAGATGCC GCTACATACTATTGTGACGAGTGGTCTAGTAATCCACTGACATTTGGGGCCGGAACATAACTGGAGCTGAAGG CAGCCGAACCCAAAATCAAGCGACAAGACACACACTTGCACCTTGTCCAGCACCAGAACTCTGGGAGACC TAGCGTGTCTCTGTTCCACCCAAACCAAGGATACACTGATGATCAGCCGACCCCTGAGGTACATGCGGTG GTCCTGGACCTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCCGAAATGCATAATG CCAAAACCAAGCCTAGGGAGGACAGTACAATAGTACTTATCGCTGCTGTCAGTCCGAGCGTGGTCAATCA GGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAATGCAAGGTGTCCAAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACC ATTTCTAAAGCAAAGGGCCAGCCCGGAGAACCCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCATCCCGGGACGAGCTGACCA AAAACAGGCTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTTTATCCATCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAA TGGACAGCCCGAGAACAAATTAACAAGACAACCTCCCCCTGTGCTGACTCCGATGGATCTTTCCGCTGTGTCAGC AAACTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGCTTTTAGTTTTCAGTGTATGCACGAGGCACCTGC ACAATCATTACACTCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG |
| 52. | 2170 | VH | GACATCAAACCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGACAA GCGGCTACACCTTCACACGGTATACTATGCACTGGGTGAAACAGAGACCCGGCCAGGGGCTGGAAATGGATCGG ATATATTAACCCCTCCCGAGGCTACACCAACTATAATCAGAAGTTTAAAGACAAGGCCACCCTGACCACAGAT AAGAGCTCCCTTACAGCTTACATGCAGCTGAGTTCAGTACTGACTAGTGAGGACTCAGCTGTGACTTATTTGGCAA GGTACTATGACGATCATTACTGTCTGGATTATTTGGGACAGGGCACTACCCTGACTGTGACTCC |
| 53. | 2170 | VL | GATATCCAGCTGACCCAGTCCCGCAATATATGTCGCGCTCTCCCGGCGAGAAAGTACTATGACCTGCGCGG CCTCTAGTTTCACTGAGTACATGAACTGGTATPCAGCAGAAATCAGGCACCAGCCCAAGAGATGGATCTACGA CACATCCAAAGTCTGCTTCTGGGGTGCCTTATAGGTTTCACTGGTTCAGGAAGCGGCACTCCCTACTCTGACC ATTAGTCCCATGGAGGCGAAGATGCGCTACATACTATTGTCAGCAGTGGTCTAGTAATCCATCCATCCCGGGACGAGCTGACCA GGCCCGGAACATAACTGGAGCTGAAG |
| 54. | 2170 | CH2 | GCACCAGAAGTCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGATACACTGATGATCAGCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTTCGTCGACGTGAGCCAGGAGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTACAATAGTACTTATCGCGTCTGTG TCAGTCTGACCGTGTGATCAGGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCC TGCTGCTCCAATCGAGAAGACCTTTCTAAGCAAG |
| 55. | 2170 | CH3 | GGCCAGCCCGAGAACCTCAGTCTACGTTGATCTCCCTCCATCCCGGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCTCTC TGACATGCTGTTGAAAGGGTTTTATCCATCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAAATGGACAGCCCGAGAA CAATTACAAGACAACCTCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCCGCTCTGGTCAGCAAACTGACAGTGGAC AAGTCCAGATGGCAGCAGGGAACGCTTTTAGTTTTCAGTGTATGCACGAGGCACCTGCACAATCATTACACTC AGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC |
| 56. | 6689 | 完全 | CAGATCGTCTGACTCAGAGCCCGCTATTATGTCGCGTCCCTCCGAGAAAAGGTCACTATGACTTGTTCGG CCTCTAGTTCGCTCTCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAATCTGGAACAAGTCCCAAGCGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCATCTGGAGTGCCTGCCCACCTCCGAGGCAGCGGCTCTGGGACAAGTTATTCACTGACT ATTTCTGGCATGGAGCCGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGTCCCAACCCATTACCTTTG GATGTGGCACAAAGTGGAGATCAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGTCA GGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAACTGGCTAGACCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGGCCAG GGCTACACATTCACCTCGGTATACCATGCATTGGGTGAAACAGAGACCAGGACAGTGTCTGGAGTGGATCGGCT ACATTAATCCAGCAGGGGGTACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCAACCCCTGACCACCGATAA GTCTAGTTCAACAGCTTATATGCAGCTGAGCTCCCTGACTTCAGAAGACAGCGCTGTGTACTATTGCCACCC TACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTTGGGGCAGGGAACCTACCCTGACCGTGTCTAGTGCAGCCGAGC CTAAATCAAGGACAAAGACCATACATGCCCCCTTGTCCGGCCGAGAGCTGCAGGGGACCAAGCGTGT CCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGATACTCTGATGATTTAGCCGAACCTCTGAGGTACCTGCGTGGTCTGAGC GTGTCCACAGGACCCAGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGGCTCGAAGTGCATAAATGCAAGGCCA AGCCAGGGAGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAATGTAAGGTCTCAATAAAGGCTCTGCCCGCCCTATCGAAAAAACTATCTCAAG GCAAAAGGCCAGCCTCGGAACCCAGGCTACGCTGCTGCCCTTAGCCGCGACGAACTGACTAAAAATCAGG TCTCTCTGCTGTGTCTGGTCAAAGGATTCACCTTCCGACATCCCGTGGAGTGGGAAAGTAAACGGCCAGCC CGAGAACAATACCTGACCTGGCCCTTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACA GTCGATAAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTGAGTCTCCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCAATT ACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCACTGGC |
| 57. | 6689 | VL | CAGATCGTCTGACTCAGAGCCCGCTATTATGTCGCGTCCCTCCGAGAAAAGGTCACTATGACTTGTTCGG CCTCTAGTTCGCTCTCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAATCTGGAACAAGTCCCAAGCGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCATCTGGAGTGCCTGCCCACTCCGAGGCAGCGGCTCTGGGACAAGTTATTCACTGACT ATTTCTGGCATGGAGCCGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGCTCCCAACCCATTACCTTTG GATGTGGCACAAAGTGGAGATCAAT |
| 58. | 6689 | VH | CAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAACTGGCTAGACCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGGCCA GCGGCTACACATTCACCTCGGTATACCAATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCAGGACAGTGTCTGGAGTGGATCGG CTACATTAATCCAGCAGGGGGTACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCAACCCCTGACCACCGAT AAGTCTAGTTCAACAGCTTATATGCAGCTGAGCTCCCTGACTTCAGAAGACAGCGCTGTGTACTATTGCCGAC GCTACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTTGGGGCAGGGAACCTACCCTGACCGTGTCTAGT |
| 59. | 6689 | CH2 | CGCCAGAAGTGCAGGCGGACCAAGCGTTCCTGTTTCCACCAACCTAAGGATACCTGATGATTAGCC GAACTCCTGAGGTCACTGCGTGGTCTGAGCGTGTCCACGAGGACCCAGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGGGTCAAGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGAGGAAACAGTACAACCTCACTTATCCGCTGCTG TCTGCTGACCGTGTGTCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAATGTAAGGTCTCAATAAAGGCTC TGCCCGCCCTATCGAAAAAACTATCTCAAAGGCAAAA |
| 60. | 6689 | CH3 | GGCCAGCCTCGCGAACCCAGGCTACGTGCTGCCCTTAGCCGCGACGAACTGACTAAAAATCAGGTCTCTC |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | <p>TGCTGTGTCTGGTCAAAGGATTCTACCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCCGAGAA CAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGCAT AAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAGCTGCTCCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTC AGAAGTCCCTGTCCCTGTCACTGGC</p> |
| 61. | 6690 | 完全 | <p>CAGATCGTCCTGACTCAGAGCCCCGCTATTATGTCCGCAAGCCCTGGAGAGAAAGTGACTATGACCTGTTCCG CATCTAGTTCCTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAATCTGGAACAAGTCCCAAGCGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCATCTGGAGTGCCTGCCCACTTCCGAGGCAGCGGCTCTGGGACAAGTTATTCACTGACT ATTAGCCGGCATGGAGCCGAAGATGCCCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGCTCCAACCCATTACCTTTG GATGTGGCACAAGCTGGAGATCAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGTCA GGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCAGAAGTGGCTAGACCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGGCCAGC GGCTACACATTCACTCGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCAGGACAGTGTCTGGAGTGGATCCGCT ACATTAATCCCAGCAGGGGTACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCAACCCTGACCACCGATAA GTCTAGTTCAACAGCTTATATGCAGCTGAGTCCCTGACTTCCAGAGACAGCGCTGTGACTATTGCGCACGC TACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTATTGGGGCAGGGAACCTCCCTGACCGTGTCTAGTGTGAGCCGAGC CTAAATCAAGGCAGAACCCATACATGCCCCCTTGTCCGGCCAGAAAGTGCAGGCGGACCAAGTGTGTT CCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGATACCTGATGATTTCTCGAAGTCCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGAGC GTGTCCACAGGAGCCAGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGGGTCAAGTGCATAATGCCAAAACCA AGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCAACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTCTGGAGTGGATCCGCT GAATGGCAAGGAGTACAATGTAAGGTCTCAATAAGGCTCTGCCCGCCCTATCGAAAAAACTATCTCTAAG GCAAAAGGACAGCCTCGCAACCACAGGCTACGTGCTGCCCTTAGCCGCGACGAAGTACTGATAAAATCAGG TCTCTGTGCTGTCTGGTCAAAGGATTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAAACGGCCAGCC CGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACA GTCGATAAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTACGCTGCTCCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATT ACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCACTGGC</p> |
| 62. | 6690 | VL | <p>CAGATCGTCCCTGACTCAGAGCCCCGCTATTATGTCCGCAAGCCCTGGAGAGAAAGTGACTATGACCTGTTCCG CATCTAGTTCCTGTCTTACATGAACTGGTATCAGCAGAAATCTGGAACAAGTCCCAAGCGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCATCTGGAGTGCCTGCCCACTTCCGAGGCAGCGGCTCTGGGACAAGTTATTCACTGACT ATTAGCCGGCATGGAGCCGAAGATGCCCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGCTCCAACCCATTACCTTTG GATGTGGCACAAGCTGGAGATCAAT</p> |
| 63. | 6690 | VH | <p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCAGAAGTGGCTAGACCAGGAGCCAGTGTGAAAATGTCATGCAAGGCCA GCGGCTACACATCACTCGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCAGGACAGTGTCTGGATGGATCCGG CTACATTAATCCCAGCAGGGGTACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCAACCCTGACCACCGAT AAGTCTAGTTCAACAGCTTATATGCAGCTGAGCTCCCTGACTTCCAGAGACAGCGCTGTGTACTATTGCGCAC GCTACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTATTGGGGCAGGGAACCTCCCTGACCGTGTCTAGT</p> |
| 64. | 6690 | CH2 | <p>GCGCCAGAAGCTGCAGGCGGACCAAGTGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGATACTCTGATGATTTCTC GAACCTCTGAGGTCACTGCGTGGTCTGAGCGGTGTCACAGGAGCCAGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGGGTCAAGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAAACAGTACAACCTCAACTTATCCGGTCTGT TCTGTCTGACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAATGTAAGGTCTCAAATAAGGCTC TGCCCGCCCTATCGAAAAAACTATCTCTAAGGCAAAA</p> |
| 65. | 6690 | CH3 | <p>GGACAGCTCCGCAACCACAGGCTACGTGCTGCCCTTAGCCGACGAACTGACTAAAAATCAGGTCTCTC TGCTGTCTGGTCAAAGGATTCTACCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAAACGGCCAGCCCGAGAA CAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGCAT AAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTACGCTGCTCCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTC AGAAGTCCCTGTCCCTGTCACTGGC</p> |
| 66. | 6691 | 完全 | <p>GATATTCAGCTGACACAGAGCCCCGCTATCCCTGGCCGTGAGCCTGGGACAGAGAGCAACTATTTCTGCAAAAG CCTCACAGAGCGTGGACTATGATGGAGACAGCTATCTGAACTGGTACCAGCAGATCCCAAGCCAGCCCCCTAA ACTGCTGATCTACGACGCCAGCAATCTGGTGTCCGGCATCCACCCAGGTTCACTGGATCAGGCAGCGGGACC GATTTTACACTGAACATTCACCCCTGTGAGAAAGGTGGACGCCGCTACCTACCATTGCCAGCAGTCCACAGAGG ACCCCTGGACTTTCCGATGTGGCACCACAACTGGAATCAAGGGCCGGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGGAGCGG AGGAGGAGGAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCCGAGCAGAAGTGGTCCGACTGGAAAGCTCCGTGAAAAAT TCTGTCAAGGCCAGTGGCTATGCTTTTCTAGTTACTGGATGAATTTGGTGAAGCAGCGACCAGGACAGTGTCT TGGAGTGGATCCGGCAGATTTGGCTGGGGATGGAGACACCAACTATAATGGAAGTTCAAAGGCCAAGGCAAC ACTGACCGCCGACGAATCAAGCTCCACAGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCTAGTGGAGTGCAGAGT TACTTTTGGCCCGGAGAGAAACCAACTGTGGCAGATACTATTACGCAATGGACTACTGGGCGCAGGGGA CCACAGTCCACCGTGTCAAGCGCAGCCGAGCCAAAATCCCTCTGATAAGACACACACTTGCCTCCATGTCCGGC GCCAGAAGCTGCAGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCCTTAAACCAAGGACACTCTGATGATCTCTCGC ACTCCAGAGGTCACTGCGTGGTGTGCTGCTCCAGGAGCCCGAAGTCAAATTTCAACTGGTATGTGG ACGGGGTCAAGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCTAGGGAGGAAACAGTATAACTCTACATACCGCTCGTGAG TGCTCTGACTGTGCTGCATCAGGATTTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAATGTAAGGTCTCAAATAAGGCTCTG CCGCCCCCTATCGAAAAAACTATCTCTAAAGCTAAAGGCCAGCCCTCGCGAACACAGGTCTACGTGTGCC CTAGCCGCGACGAAGTACTAAAAATCAGGTCTCTCTGCTGTGCTGGTCAAAGGATTTACCCCTCCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAAAGTAAAGCCAGCCCGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGAT GGGAGTTTCTTTCTGATTTCAAAGCTGACAGTGCATAAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTACGCTGCT CCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCACTGGC</p> |
| 67. | 6691 | VL | <p>GATATTCAGCTGACACAGAGCCCCGCTATCCCTGGCCGTGAGCCTGGGACAGAGAGCAACTATTTCTGCAAAAG CCTCACAGAGCGTGGACTATGATGGAGACAGCTATCTGAACTGGTACCAGCAGATCCCAAGCCAGCCCCCTAA ACTGCTGATCTACGACGCCAGCAATCTGGTGTCCGGCATCCACCCAGGTTCACTGGATCAGGCAGCGGGACC GATTTTACACTGAACATTCACCCCTGTGAGAAAGGTGGACGCCGCTACCTACCATTGCCAGCAGTCCACAGAGG ACCCCTGGACTTTCCGATGTGGCACCACAACTGGAATCAAG</p> |
| 68. | 6691 | VH | <p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCCGAGCAGAAGTGGTCCGACTGGAAGCTCCGTGAAAATTTCTTGCAGGGCCA GTGGCTATGCTTTTCTAGTTACTGGATGAATTTGGTGAAGCAGGACAGGACAGTGTCTGGAGTGGATCGG GCAGATTTGGCTGGGGATGGAGACACCAACTATAATGGAAGTTCAAAGGCCAAGGCAACTCTGACCGCCGAC GAATCAAGCTCCACAGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCTAGTGGAGATTGAGCAGTGTACTTTTGGCCCC GGAGAGAAACCAACTGTGGCAGATACTATTACGCAATGGACTACTGGGCGCAGGGGACACAGTCAACCGT GTCAAGC</p> |
| 69. | 6691 | CH2 | <p>GCGCCAGAAGCTGCAGGCGGACCTCCGTTGTTCCCTGTTTCCCCCTAAACCAAGGACACTCTGATGATCTCTC</p> |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | CTTCTAGTTCAGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAATCAGGCACTAGCCCCAAGAGATGGATCTACGACACACCTCCAAGGTCGCATCTGGGGTGCCTTATAGGTTTCAGTGGGTCAGGAAGCGGGACCTCCTACTCTCTGACAAATTAGTCCATGGAGGCAGAAAGTCCGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGTCTAGTAATCCACTGACTTTTG GGGCCGGAACCAAACCTGGAGCTGAAG |
| 79. | 1065 | CH2 | GCACCCGAACCTGGTGGGGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCACCCAAACCAAAGGATACACTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTCACCTTGGCTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTTGGACCGCGTCGAAGTGCATAATGTAAAACCTAAGCCTAGGGAGGAACAGTACAATAGTACATAATAGATCGGTCTCAGTGTGACCCGCTCCTGCATCAGGATTTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACAATTTCTAAAGCCAAAG |
| 80. | 1065 | CH3 | GGCCAGCCCCGGAACCTCAGGTGTATACACTGCCTCCATCCCGGGACGAGCTGACTAAAAACCAGGTCTCTCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGTTCTACCCATCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAAAGTAATGGACAGCCCCGAGAACCAATTTATATGACCTGGCCCCCTGTCCCTGGACTCCGATGGATCTTTCTTTCTGTACAGCAAACTGACAGTGGACAAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGCTTTAGTTGTTTCAGTGTGACAGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGG |
| 81. | 1067 | 完全 | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTAGCCAGCCCCGGCGAGAAAAGTCACAATGACTTGTCTCAGCAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGACACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGACGCGGCTCTGGGACCAGTTATTCACCTGACAATTTCCGGCATGGAGGTGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTTGATCTGGCACCAGCTGGAAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGTTCTGGAGGAGGAGGAAGTCAAGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCTGAGCTGGCACGACCAGGAGCAAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGGCCAGCGCTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTTGGGTGAAAACAGAGACCCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGGTACATTAATCTAGCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCACAGATAAGAGCTCCTTACCAGCATATATGCAGCTGAGTTCACCTGACATCTGAGGACAGTGGCCTGTACTATTGGCGTAGGTACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTTGGGGCCAGGGGACTACCTGACCGTGAAGTCCCGCAGCCGAACTAAATCTAGTGAACAGACTCATACCTGCCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGTTCTGTCTCCACCCAAACCAAAGGATACTCTGATGATCTCCCGGACACCTGAAGTCACTTGGCTGGTCTGGCAGGTGTCTCAGGAGCCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCCCAGGGAAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGTGTCTGTCTGACTGTGCTGCACAGGATTTGGCTGAAACGGCAAGGATACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACAATTAGCAAAAGCCAAAGGGGACGCCCCGAGAACCTCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAAACCCAGGTCAGTCTGCTGTGTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGATATGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGGACGCCCGAAAACAATTACATGACATGGCCCCCTGTCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTGTATAGTAAACTGACTGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGCAAG |
| 82. | 1067 | VL | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTAGCCAGCCCCGGCGAGAAAAGTCACAATGACTTGTCTCAGCAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGACACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGACGCGGCTCTGGGACCAGTTATTCACCTGACAATTTCCGGCATGGAGGTGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTTGATCTGGCACCAGCTGGAAATTAAT |
| 83. | 1067 | VH | CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCTGAGCTGGCACGACCAGGAGCAAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGGCCAGCGGTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTTGGGTGAAAACAGAGACCCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGTACATTAATCTAGCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCAAGATAAAGAGTCTCTACCCGATATATGCAGCTGAGTTCACCTGACATCTGAGGACAGTGGCCTGTACTATTGGCCTAGTACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTTGGGGCCAGGGGACTACCTGACCGTGAAGTCC |
| 84. | 1067 | CH2 | GCACCCAGAGCTGTGGGAGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAACCAAAGGATACTCTGATGATCTCCGGACACCTGAAGTCACTTCCGTGGTCTGAGCTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTAACTGGTACGTTGGACGGCGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAATCCACATATCCGCTGGTGTCTGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACAATTAGCAAAAGCCAAAG |
| 85. | 1067 | CH3 | GGGCAGCCCCGGAACCTCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAAACCCAGGTGAGCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCCCCGAAAAAATTTACATGACATGGCCCCCTGTCCCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACTGTGGACAAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGC |
| 86. | 1842 | 完全 | GATATTCAGTGCACACAGAGTCTGTCTCACTGGCAGTGAAGCTGGGACAGCGAGCAACTATCTCTGCAAAAGCTAGTCACTCAGTGGACTATGATGGCGACTCTATCTGAAGTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAAAGCTGTGATCTACGACGCTCAAATCTGGTGGAGCGGCATCCCACCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACTGATTTTACCCTGAACATTCACCCAGTGCAGAAAGTGGAGCGCCGCTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACCGAGGACCCCTGGACATTCGGCGGGGAACTAACTGGAATCAAGGGAGGAGGAGGAGGAGTGGCGGAGGAGGGTCCAGGAGGAGGAAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGTCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAATTTCTGTAAAGGCATCTGGCTATGCCTTTCTAGTTACTGGATGAATTTGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCGGAAATGGATCGGGCAGATTTGGCCCCGGGATGGAGACCAACTATAATGGAAAAGTTCAAAGGCAAGGCTACTGACTGCAGACGAGTCAAGCTCCACAGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCCAGCGAGGATTCGGCTGTGTACTTTTGGCAGCGAGAGAAAACCAACTGTGGGCAGGTAATTAACGCAATGGACTACTGGGGCCAGGGGACACAGTCAACCGTGTCAAGCGCAGCCGAACCCAAATCTCTGATAAGACCCACACATGCCCTCCATGTCCAGCACCTGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCACCTAAACCTAAGGACACACTGATGATCTCTCGGACACCCGAAGTCACTTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCTGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTTGGCTCGAGGTCATAATGCCAAAACCTAAGCCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACTTACCGGCTCGTGTCTGTCTGACCGTGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCAGCTCCATCGAGAAGACAATTTCCAAAGCTAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTATGTGTACCCACCCAGCCGGGACGAGCTGACCAAAACCCAGGTCTCCCTGCATGTCTGGTGAAGGGATTTTATCCTTCTGATATTCGGTGGAGTGGGAAAAGTAAATGGCCAGCCAGAAAACAATTACAAGACTACCCCTCCAGTGTGGATCTCTGACGGAGTTTCCACTGGTCACTGACTGTGGATAAGTACGGTGGCAGGGAACGCTTTAGTTGTTCACTGATGCACAGGCCCCGTCACCAATCATTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG |
| 87. | 1842 | VL | GATATTCAGTGCACACAGAGTCTGTCTCACTGGCAGTGAAGCTGGGACAGCGAGCAACTATCTCTGCAAAAGCTAGTCACTCAGTGGACTATGATGGCGACTCCTATCTGAAGTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAA |

10

20

30

40

| | | | |
|-----|------|-----|--|
| | | | GCTGCTGATCTACGACGCCTCAAATCTGCTGAGCGGCATCCCACCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCTGGGACT GATTTTACCCTGAACATTACCAGTTCGAGAAGGTGGACGCCGTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACCGAGG ACCCCTGGACATTCCGGCGGGGAACTAACTGGAATCAAG |
| 88. | 1842 | VH | CAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGTCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAATTTCTGTAAGGCAT CTGGCTATGCCTTTTCTAGTTACTGGATGAATTGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCCGGGATGGAGACCAACTATAATGGAAAGTTCAAAGGCAAGGCTACACTGACTGCAGAC GAGTCAAGCTCCACAGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCCAGCGAGGATTCCCGTGTACTTTTGGCAC GGAGAGAAACCACAATGTGGCAGGTAATATTACGCAATGGACTACTGGGGCCAGGGGACCACAGTCCCGT GTCAAGC |
| 89. | 1842 | CH2 | GCACCTGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTCCACCTAAACCTAAGGACACACTGATGATCTCTC GGACACCCGAAGTCACTTGTGTGGTCTGGATGTGAGCCACAGGACCCCTGAAGTCAAATTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCTAAGCCTAGGGAGAACAGTATAACTCCACTTACCGCGTCTGT TCTGTCTGACCGTGTCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCC TGCCAGCTCCCATCGAGAAGACAATTTCAAAGCTAAG |
| 90. | 1842 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTCTATGTGTACCACCCAGCCGGGACGAGTGACCAAAAACAGGTTCTCCC TGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTATCCTTCTGATATTGCCGTGGAGTGGGAAAAGTAAATGGCCAGCCAGAAAA CAATTAACAAGACTACCCCTCCAGTGTGGATTTCTGACGGGAGTTTCCGACTGGTCAGTAAACTGACTGTGGAT AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTTAGTTGTTTCACTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGC |
| 91. | 1335 | 完全 | CAGATTGTCTGTCTCAGAGTCCCGCTATCTGTGTCAGCAAGCCCTGGGGAGAAGGTGACCATGACATGCCGAG CCAGCTCCTCTGTGAGTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCAGTTCACCTAAACCATGGATCTACGC CACATCTAACCTGGCTAGTGGAGTGCCTCGGTTTTCGGCTCTGGGAGTGGAAACATCATAACAGCCTGACT ATTTCCAGAGTGGAGGCCGAAGACCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGACCTCTAATCCCTTACATTCG GCGGGGGAACCTAAGTGGAGATCAAAGGACTGTGGCAGCCCTTCTGTCTTCAATTTTCCACCCAGTGCAG ACAGCTGAAAATCAGGAACCGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGTAACAACCTTACACCCCGCAGAAAGGTGCAG TGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAATTTCTCAGGAGAGTGTGACCAACAGGACTCAAAGGATAGCA CATATCCCTGAGCTCCACTCTGACCCCTGTCCAAAGCTGATTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGT CACCCACAGGGGCTGAGTAGTCCCTCACAAAGAGTTTCAATAGAGGAGAGTGT |
| 92. | 1335 | VL | CAGATTGTCTGTCTCAGAGTCCCGCTATCTGTGTCAGCAAGCCCTGGGGAGAAGGTGACCATGACATGCCGAG CCAGCTCCTCTGTGAGTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCAGTTCACCTAAACCATGGATCTACGC CACATCTAACCTGGCTAGTGGAGTGCCTCGGTTTTCGGCTCTGGGAGTGGAAACATCATAACAGCCTGACT ATTTCCAGAGTGGAGGCCGAAGACCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGACCTCTAATCCCTTACATTCG GCGGGGGAACCTAAGTGGAGATCAA |
| 93. | 1335 | CL | AGGACTGTGGCAGCCCTTCTGTCTTATTTTTCCACCCAGTGCAGAACAGCTGAAATCAGGAACCGCTTCCG TGGTCTGTCTGTGAACAACCTTACCCCGCGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGTC CGGCAATTTCTCAGGAGAGTGTGACCGAACAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGAGCTCCACTCGAC CTGTCCAAAGCTGATTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCAACCACAGGGGCTGAGTAGTCCCG TCACAAAAGAGTTTCAATAGAGGAGAGTGT |
| 94. | 1342 | 完全 | CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGCATCCGTGAAAATGTCTTGAAGGCTA GTGGCTACACATTCACTTCCATAAATGCAGTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGATCGG AGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGTTTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGAT AAGAGCTCCTCTACCGCTACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATTGCGCCA GAAGCCACTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGGGGGGCAGGAACACAGTCAACCGTGGCGCCG TTCCACAAAAGGACCAAGCGTGTTCCTACTGGCACAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAACAGCAGCCCTG GGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCTCACCCTGTCTTGGAAAGTGGCGCCCTGCACACCGGGG TCCATACTTTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTCAACCGCTTCCCTC TAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAACCTTCTAATACAAAGGTGCACAAGAAAGTG GAACCAAAAAGTTGTGATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACATCCG TGTTCCCTGTTTCCACCAAAAGGACACTCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACTGCTGGTGGTCTG GACTGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTTCAACTGGTACGTGGATGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAA ACAAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAACCTCAACATATAGAGTCTGTGAGCGTCTGACTGTCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAAGGCCCTGCCCGCACCTATCGAGAAGACTATTT TAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACACAGGTGTACGTGCTGCCCAAGCCGCGACGACTCACTAAAAAC CAGGTCTCCCTGTGTGTCTGGTGAAGGGTTCATCCAAGTGAATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCCCGAGAACAATTACCTGACTTGGCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTCCAAACT GACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGAAATGCTTTTTCTGTTCTGTGATGCACGAAGCAGTGCACAAT CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTACCCCGCAAA |
| 95. | 1342 | VH | CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGCATCCGTGAAAATGTCTTGAAGGCTA GTGGCTACACATTCACTTCCATAAATGCAGTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGATCGG AGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGTTTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGAT AAGAGCTCCTCTACCGCTACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATTGCGCCA GAAGCACTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGGGGGGCAGGAACACAGTCAACCGTGGCGCC |
| 96. | 1342 | CH1 | GCTTCCACAAAAGGACCAAGCGTGTTCCTACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAACAGCAGCC TGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCAACCGTCTTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCCG GGTCCATACCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTCAACCGTCCCTTCC TCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAACCTTCTAATACAAAGGTGCACAAGAAAG TG |
| 97. | 1342 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAAACCCAGGACACTCTGATGATTAGCC GGACTCCTGAAGTCACTTCCGTGGTCTGGAGCTGAGCCACAGGACCCCGAAGTCAAATTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAACCTCAACATATAGAGTCTGT AGCCTCTGACTGTGCTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAGGCC TGCCCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAAG |
| 98. | 1342 | CH3 | GGCCAGCCTAGGGAACACAGGTGTACGTGTGCTTCCAAAGCCCGCAGGAGTGAATAAAAACAGGTTCTCCC TGCTGTCTGGTGAAGGGTTCTTCAAGTGTATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGGAGAA CAATTAACCTGACTTGGCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTCCAAACTGACCGTGGAT AAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAATGTCTTTCTGTTCTGTGATGCACGAAGCAGTGCACAATCACTACACCC |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|---|
| | | | AGAAGTCCCTGAGCCTGTCACCCGGC |
| 99. | 5239 | 完全 | CAGGTCACAGCTGGTCCAGTCCGGAGGAGGAGTGGTCCAGCCAGGACGGTCACTGAGACTGAGCTGCAAGGCTT CCGGGTACACTTTCACCCGATATACCATGCCTGGGTCCGGCAGGCACCAGGAAAGGACTGGAATGGATCGG GTACATTAACCCCTAGCAGGGGATACACAAACTATAATCAGAAGGTGAAAGACAGGTTCACTATCTCTCCGGAT AACAGTAAGAATACCGCCTTTCGACAGATGGACAGCCTGCGCCCGAGGATACAGGCGTGTATTTCTGGCTC GATACATGACGATCAGTACTGTCTGGACTATTGGGGCCAGGGGACTCCAGTCCACCGTGAAGCTCCGCATCAAC TAAGGGACCCAGCCTGTTTCCACTGGCCCTCTAGTAATCCACATCTGGAGAACTGCAGCTTGGGATGC CTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCGTCACCGTGAAGTCCGGAGCCCTGACTTCCGGCTCCATA CCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCTCTGTCTCTGTGGTCACAGTGCCTAGTTCAGGCT GGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTAGCAATACTAAAGTGCACAAGAAAGTGGAAACCA AAGAGCTGTGATAAAAACCCATACATGCCCCCTTGTCTGCACCAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTTC TGTTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCCGGACCCCTGAAGTGCATGTGTGGTCTGTGAGTGT CTCACACGAGGACCCAGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAAA CCTAGAGAGGAACAGTACAATTCCACCTATAGGGTCTGTCTGTCTCTGACAGTGTGCACCAGGATTGGCTGA ACGGGAAAGAGTATAAGTCAAAGTGTCCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGC TAAAGGCCAGCCTAGGGAACACAGGTTCTACGTGTATCTCCATCTCGCGACGAGTGCACAAAGAACAGGTC AGTCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTTACCCAAGCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCCG AAAACAATTAAGACACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGCACTTCCGACTGGTCAAGTAAAGTGGCTGTG GGACAATCAAGATGGCAGCAGGGGAAGCTTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTAC ACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC |
| 100. | 5239 | VH | CAGGTCACAGCTGGTCCAGTCCGGAGGAGGAGTGGTCCAGCCAGGACGGTCACTGAGACTGAGCTGCAAGGCTT CCGGGTACACTTTCACCCGATATACCATGCCTGGGTCCGGCAGGCACCAGGAAAGGACTGGAATGGATCGG GTACATTAACCCCTAGCAGGGGATACACAAACTATAATCAGAAGGTGAAAGACAGGTTCACTATCTCTCCGGAT AACAGTAAGAATACCGCCTTTCGACAGATGGACAGCCTGCGCCCGAGGATACAGGCGTGTATTTCTGGCTC GATACATGACGATCAGTACTGTCTGGACTATTGGGGCCAGGGGACTCCAGTCCACCGTGAAGCTCCGCATCAAC TAAGGGACCCAGCCTGTTTCCACTGGCCCTCTAGTAATCCACATCTGGAGAACTGCAGCTTGGGATGC CTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCGTCACCGTGAAGTCCGGAGCCCTGACTTCCGGCTCCATA CCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCTCTGTCTCTGTGGTCACAGTGCCTAGTTCAGGCT GGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTAGCAATACTAAAGTGCACAAGAAAGTGGAAACCA AAGAGCTGTGATAAAAACCCATACATGCCCCCTTGTCTGCACCAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTTC TGTTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCCGGACCCCTGAAGTGCATGTGTGGTCTGTGAGTGT CTCACACGAGGACCCAGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAAA CCTAGAGAGGAACAGTACAATTCCACCTATAGGGTCTGTCTGTCTCTGACAGTGTGCACCAGGATTGGCTGA ACGGGAAAGAGTATAAGTCAAAGTGTCCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGGC TAAAGGCCAGCCTAGGGAACACAGGTTCTACGTGTATCTCCATCTCGCGACGAGTGCACAAAGAACAGGTC AGTCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTTACCCAAGCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCCG AAAACAATTAAGACACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGCACTTCCGACTGGTCAAGTAAAGTGGCTGTG GGACAATCAAGATGGCAGCAGGGGAAGCTTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTAC ACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC |
| 101. | 5239 | CH1 | GCATCAACTAAGGGACCCAGCGTGTTCCTGTTTCCACTGGCCCTCTAGTAATCCACATCTGGAGAACTGCAGCTC TGGATGTCCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCGTCACCGTGAAGTCCGGAATCCGAGCCCTGACTTCCGG CCTCCATACCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCTGTACTCTCTGTCTCTGTGGTCAAGTGGCTGAT TCAAGCCTGGAAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTAGCAATACTAAAGTGCACAAGAAAG TG |
| 102. | 5239 | CH2 | GCACCAGAGGCAGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTAGCC GGACCCCTGAAGTGCATGTGTGGTCTGTGAGTGTGTGCACACGAGGACCCAGAAGTCAAGTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCTAGAGAGGAACAGTACAATTCACCTATAGGGTCTGT TCTGTCTGACAGTGTGCACCAGGATTTGGTGAACGGGAAAGAGTATAAGTCAAAGTGTCCAATAAGGCTC TGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTTCTAAGCCTAAA |
| 103. | 5239 | CH3 | GGCCAGCCTAGGGAACACAGGTTCTAGCTGTATCCTCCATCTCGCGACGAGTGCACAAAGAACAGGTCAGTC TGACTTGTCTGGTGAAGGATTTACCCAAGCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCCGAAAA CAATTAAGACACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGCAGTTCGCACTGGTCAAGTAAAGTGAAGTGTGGAC AAATCAAGATGGCAGCAGGGGAACSTTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC |
| 104. | 3916 | 完全 | GAAGTCCAGCTGGTCCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGACGGTCCCTGAGACTGTCTTGGCCCGCTA TGGGTTTACCTTTAACGACTATGCCATGCCTGGTCCGACAGGCTCCAGGAAAGGACTGGAATGGGTGTC TACCATCAGTTGGAATAGTGGATCAATTGGCTATGCTGACTCCGTGAAAGGCAGGTTCACAATCTCACCGGAT AAGCGAAAGAAAAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACAGCTCTGTACTATTGGCCCA AGGATATTAGTACGGGAACACTATTACCGAATGGACGTGTGGGGGAGGGAACACAGTCACTGTGAGCTC CGCCGGGGAGGCTCAGG ACCCCTGAGCCTGTCCCAGGAGAGCGAGCTACACTGAGCTGTCCGGCATCTCAGAGTGTGTCTAGTTATCTGG CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACGATGCATCCAACAGAGCCACTGGCAT CCCCGCAAGGTTCTCAGGAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACTCTGACCATCTCAAGCCTGGAGCCCGAAGAT TTCGCTGTGTATTACTGCCAGCAGAGGTCTAATTGGCCTATCACATTTGGCCAGGGGACTCCGCTGGAGATTA AGGCAGCCGAACCAAGTCTCTGCACAAAACACACTTGGCCCTTGTCCAGCACCAGAAGTCTGGGAGG ACCAAGCGTGTCTGTTCACCCAAAGCCTAAAGATACCCCTGATGATTAGTAGGACCCCTGAGGTACATGT TGGTCTGTGGAGCTGAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTTAACTGGTACGTGGACGGCTCGAAGCTGATA ATGCCAAGACAAAACCCCGGAGGAACAGTATAATTCTACCTACCGAGTCTGTGAGTGTCTGACAGTGTGCA TCAGGATTTGGCTGAACGGAAGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAA ACTATTTCTAAGGCAAAAGGCGAGCCCGGGAACCTCAGGCTATATGTCTGCCTCCATCCAGAGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTTCTCTGTCTGTCTGGTGAAGGATTTCTACCCATCAGATATCGCTGTGGAGTGGGAAAG CAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATCTGACATGGCCCTGTGTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTAC TCTAAGCTGACTGTGGATAAAAGTCCGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTTTCTGTAGTGTGATGCATGAGGCC TGCACAATCATTACACCCAGAAGTCACTGAGCCTGTCCCTGGCAAA |
| 105. | 3916 | VH | GAAGTCCAGCTGGTCCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGACGGTCCCTGAGACTGTCTTGGCCCGCTA GTGGGTTTACCTTTAACGACTATGCCATGCCTGGTCCGACAGGCTCCAGGAAAGGACTGGAATGGGTGTC TACCATCAGTTGGAATAGTGGATCAATTGGCTATGCTGACTCCGTGAAAGGCAGGTTCACAATCTCACCGGAT AAGCGAAAGAAAAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACAGCTCTGTACTATTGGCCCA AGGATATTAGTACGGGAACACTATTACCGAATGGACGTGTGGGGGAGGGAACACAGTCACTGTGAGCTC C |
| 106. | 3916 | VL | GAAATCGTGTGACTCAGAGCCCTGCAACCTGAGCCTGTCCCAGGAGAGCGAGTACACTGAGCTGTCCGG CATCTCAGAGTGTGTCTAGTTATCTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCCCCAGACTGCTGATCTA CGATGCATCCAACAGAGCCACTGGCATCCCAGCAAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTTACTCTG ACCATCTCAAGCCTGGAGCCCGAAGATTTCCGCTGTGTATTACTGCCAGCAGAGGTTAATTGGCCATCAGAT TTGGCCAGGGACTCGCCTGGAGATTAAG |
| 107. | 3916 | CH2 | GCACCAGAAGTGTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAAGATACCCCTGATGATTAGTA GGACCCCTGAGGTACATGTGTGGTCTGTGGACTGAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTTCACCTGATGACT GGAGCGCTCGAAGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCCGAGGAACAGTATAATTCTACCTACCTAGGTCGTG AGTGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTTGGTGAACGGAAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCTC TGCTGCACCAATCGAGAAAACATTTCTAAGGCAAAA |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|---|
| 108. | 3916 | CH3 | GGGCAGCCCCGGAAACCTCAGGTCATATGTGCTGCCATCCAGAGACGAGCTGACCAAGAACAGGTCCTCTCTGCTGTGTCTGGTAAAGGATTCTACCCATCAGATATCGCTGTGGAGTGGGAAAGCAATGGCCAGCCCCGAGAA CAATTTACTGACATGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCTAAGCTGACTGTGGAT AAAAGTCGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTTTTCTGTAGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCACTGAGCCTGTCCCCGGC |
| 109. | 2185 | 完全 | GATATTCAGCTGACCCAGAGTCTGTCATCACTGGCTGTGAGCCTGGGACAGCGAGCAACAATCTCCTGCAAAAG CCAGTCAGTCAGTGGACTATGATGGCGACTCCTATCTGAAGTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAA GCTGCTGATCTACGACGCTTCAAATCTGCTGAGCGGCATCCCACCAGATTACAGCGGCAGCGCTCTGGAACC GATTTTACACTGAACATTCACCCAGTGCAGAAAGGTGGACGCCGTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACAGAGG ACCCTGGACTTTCGGCGGGGAACCAAACTGGAATCAAGGGAGGAGGAGGAGTGGCGGAGGAGGGTCCAGG AGGAGGAGGAAGCCAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGTCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAAAT TCCTGTAAGGCTTCTGGCTATGCATTTCTAGTTACTGGATGAATGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCC TGGAAATGGATCGGGCAGATTTGGCCCCGGATGGAGACAAAACTATAATGGAAAGTTCAAAGGCAAGGCCAC TCTGACCCGCTGACGAGTCAAGCTCCACTGCTTATATGTCAGCTGTCTAGTCTGGCAAGCAGGATTCGCCGCT TACTTTTGGCTCGGAGAGAAAACCAAACTGTGGCAGGTAATTACGCAATGGACTACTGGGGCCAGGGGA CCACAGTCACCGTGTCAAGCGCAGCCGAACCAAACTCTGTATAAGACACACACTTGCCTCCATGTCCAGC ACCTGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCTTAAACCTAAGGACTCTGTATGATCTCTCGG ACTCCCAGTCACTGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG ATGGCGTTCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACATACCGCTCGTGTG TGTCTGACTGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCACTG CCAGCCCCATCGAGAAGACCAATTTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTCATATGTGCTGCCAC CCAGCCGGGACGAGCTGACAAAAAACAGGTCCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGATTCTACCCTTCTGATAT TCGTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCCAGCCAGAAAAACAATTATCTGACTTGGCCTCCAGTGTGGATCTGAC GGGAGTTCTTTCTGTACAGTAACTGACCGTGGATAAGTACGGTGGCAGCAGGAAACGCTTTTAGTTGTT CAGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG |
| 110. | 2185 | VL | GATATTCAGCTGACCCAGAGTCTGTCATCACTGGCTGTGAGCCTGGGACAGCGAGCAACAATCTCCTGCAAAAG CCAGTCAGTCAGTGGACTATGATGGCGACTCCTATCTGAAGTGGTACCAGCAGATCCCAGGGCAGCCCCCTAA GCTGCTGATCTACGACGCTTCAAATCTGCTGAGCGGCATCCCACCAGATTACAGCGGCAGCGCTCTGTGAAACC GATTTTACACTGAACATTCACCCAGTGCAGAAAGGTGGACGCCGTACCTACCATTGCCAGCAGTCTACAGAGG ACCCTGGACTTTCGGCGGGGAACCAAACTGGAATCAAG |
| 111. | 2185 | VH | CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGTCAGACCAGGAAGCTCCGTGAAAAATTTCTGTAAGGCTT CTGGCTATGCATTTCTAGTTACTGGATGAATGGGTGAAGCAGAGGCCAGGACAGGGCCCTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCCCGGGATGGAGACAAAACTATAATGGAAAGTTCAAAGGCAAGGCCACTCTGACCGCTGAC GAGTCAAGCTCCACTGCTTATATGTCAGCTGTCTAGTCTGGCAAGCGAGGATTCGCCGCTCTACTTTTGGCCTC GGAGAGAAACCAAACTGTGGCAGGTAATTACGCAATGGACTACTGGGGCCAGGGGACCACAGTCACCGT GTCAAGC |
| 112. | 2185 | CH2 | GCACCTGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCCTTAAACCTAAGGACTCTGTATGATCTCTCT GGACTCCCAGTCACTGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGATGGCGCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACATACCGCTCGTG TCTGTCTGACTGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCACT TGCCAGCCCCATCGAGAAGACCAATTTCCAAAGCCAAAG |
| 113. | 2185 | CH3 | GGCCAGCCTCGAAGAACCAAGGTCATATGTGCTGCCACCCAGCCGGGACGAGCTGACAAAAAACAGGTCCTCCC TCTGTGTCTGGTGAAGGGATTCTACCCTTCTGATATTTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCCAGCCAGAAAA CAATTTACTGACTTGGCCTCCAGTGTGGATTTCTGACGGGAGTTTCTTTCTGTACAGTAAACTGACCGTGGAT AAGTCAAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGTTGTTTCACTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAAAAGCCTGTCCCTGTCTCCCGG |
| 114. | 5242 | 完全 | CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCCGAAGTGGTCAGACCCGGCAGCTCCGTGAAAAATCAGCTGCAAGGCCCT CCGGCTATGCTTTCTCTAGTTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCCCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACAAACTATAATGGAAAGTTCAAAGGAAAGGCAACACTGACTGCCGAC GAGTCAAGCTCCACTGCTTATATGTCAGCTGTCTAGTCTGGCTTCAGAGGATAGCCGAGTGTACTTTTGGCCCC GGAGAGAAACCAAACTGTGGCCGCTACTATTACGCAATGGACTATTGGGGACAGGGCACCACAGTCAAGT GTCAAGCGCCTCTACTAAAGGGCCTAGTGTGTTCCACTGGCTCCCTCCTCTAAGAGCACATCCGGAGGAAGT CCAGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATTTCCAGAGCCCGTACAGTGTCTGGAATCTGGCCTCTGA CTAGCGGGTCCACACCTTTCTGTCAGTGTGCAGAGTTCAGGCCTGTATAGCCTGAGCTCCGTGGTCAACCT GCCATCTAGTTCACTGGGGACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCAAAACCAAGCAATACAAAGTTCGAC AAGAAAGTGGAAACCAAAAGCTGTGATAAGACTCATACCTGCCCTTGTCTGTCAGGAGGCGAGCAGGAG GACCAAGCGTGTCTGTGTTCCACCAAACTAAGGACACACTGATGATTTCCCAAGCCAGAAAGTGCATG CTTGGTGGTGTCTGTGAGTCAAGGAGCCCGAAGTCAATTCAACTGGTACGTGGATGGGGTGGAGTGCAT AATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAATTCAACTTACCGCGTGTGAGCGTCTGACCGTGTCTGC ACCAGATTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAAACAAAGGCTCTGCCCGACCTATCGAGAA GACCATTTCTAAAGCTAAGGGCAGCCTCGAGAACCACAGGTCATGTGTACCCCTCCATCCGGGACGAGCTG ACCAAAACCAAGGCTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGGTTTTATCCAGTGTATTTGCCGTGGAGTGGGAAA GCAATGGACAGCCTGAAAACAATTAAGACTACCCCTGTGCTGGACAGTGTGATGATCATTCCGACTGGT CTCCAAACTGACTGTGGACAAGTCTAGGTGGCAGCAGGGCAACCTCTTTTCATGTAGCGTGTGATGATGAGGCC CTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCCGG |
| 115. | 5242 | VH | CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCCGAAGTGGTCAGACCCGGCAGCTCCGTGAAAAATCAGCTGCAAGGCCCT CCGGCTATGCTTTCTCTAGTTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCCCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACAAACTATAATGGAAAGTTCAAAGGAAAGGCAACACTGACTGCCGAC GAGTCAAGCTCCACTGCTTATATGTCAGCTGTCTAGTCTGGCTTCAGAGGATAGCCGAGTGTACTTTTGGCCCC GGAGAGAAACCAAACTGTGGCCGCTACTATTACGCAATGGACTATTGGGGACAGGGCACCACAGTCAAGT GTCAAGC |
| 116. | 5242 | CH1 | GCCTCTACTAAAGGGCTAGTGTGTTTCCACTGGCTCCCTCCTCTAAGAGCACATCCGGAGGAACTGCAGCTC TGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCGCTCAGTGTCTGGAAGTCTGGCCTCTGACTTGGAGCGG GTCCACACTTTCTCTGAGTGTGCAGAGTTCAGGCTGTATAGCCTGAGCTCCGTGGTCCCTGCTGCTGCTAGT AGTTCACTGGGGACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAACCAAGCAATACAAGGTTCGACAAGAAAG TG |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| 117. | 5242 | CH2 | GCACCAGAGGAGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGACACACTGATGATTTCCC GAACCCCGAAGTGACATGCGTGGTCTGTCTGTGAGTACAGGAGCCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGT GGATGGGGTCCGAGGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAAACAGTATAATCAACTTACCCGCTCGTG AGCGTCTGACCCGTGCTGCACAGGATGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCTC TGCCCGCACCTATCGAGAAGACCATTCTAAAGCTAAG |
| 118. | 5242 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTATGTGTACCCTCCATCCCGGGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCCTCTC TGACATGTCTGGTGAAGGGTTTTATCCAGTGATATGGCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGACAGCCTGAAAA CAATTACAAGACTACCCCCCTGTGCTGGACAGTATGGATCATTCGCACTGGTCTCCAAACTGACTGTGGAC AAGTCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTTCATGTAGCGTGTGATGATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCCGGC |
| 119. | 2171 | 完全 | CAGATCGTCCCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTGAGCCAGCCCGGGCAGAAAAGTCAACATGACATGCTCAG CCAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACATCCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACTAGTTATTCACTGACC ATTTCCGGCCTGGAGGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTACATTTG GATCTGGCACTAAGCTGGAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTGCGAGGAGGAGGAAGTCA GGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGCAAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGCCAGC GGCTACACTTTCACCCGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGGT ACATTAATCCTTCCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACCCTGACCACAGATAA GAGCTCCTCTACAGCATAATGACAGTGTGAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGT TACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTAATGGGGCCAGGGGACTACCCTGACCGTGGAGTCCCGAGCCGAA CTAAATCTAGTGACAAGACACATACTTCCACCTGTCCAGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACTAGCGTGTGTT CCTGTTTCCACCCAAACCAAGGATACACTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTCAACATGTGTGGTCTGGAC GTGTCTCAGCAGGACCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCTA AGCCAGGGAGGAAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTGCACCAGGATTTGGT GAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACATTAGCAAAA GCAAAGGGGCAGCCCGAGAACCTCAGGCTCAGCTGTATCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAAAACAGG TCAGTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCAGCGATATTTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCC CGAAAACAATTAAGACAACCTCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCCTGGTGCAGTAACTGACTGACT GTGGACAAGTCAAGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATT ACACCCAGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGCAAG |
| 120. | 2171 | VL | CAGATCGTCCCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTGAGCCAGCCCGGGCAGAAAAGTCAACATGACATGCTCAG CCAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACATCCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACTAGTTATTCACTGACC ATTTCCGGCCTGGAGGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTACATTTG GATCTGGCACTAAGCTGGAATTAAT |
| 121. | 2171 | VH | CAGGTCCAGTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGTGGCAGCAGCAGGAGCAAGTGTGAAAATGTCTGTAAGGCCA GGCGGTACACTTTTACCCGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG TGACATTAATCCTTCCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACCCTGACCACAGAT AAGAGTCTCCTCTACAGCATAATGACAGTGTGAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTC GGTACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTAATGGGGCCAGGGGACTACCCTGACCGTGGAGCTCC |
| 122. | 2171 | CH2 | GCACCAGAGTGTCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAACCAAGGATACACTGATGATCTCCC GGACCCCTGAAAGTCAATGTGTGGTCTGGAGTGTCTCAGCAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTCCGAGTGCATAATGCCAAAACTAAGCCCGAGGAGGAAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCTGT TCTGTCTGACCGTGTCTGCACAGGATTTGGTGAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCC TGCTGCTCCAATCGAGAAGACCATTAGCAAAGCAAAG |
| 123. | 2171 | CH3 | GGCAGCCCGGAGAACCTCAGGTCACGTGTATCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCAGTCT TGACATGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCAGCGATATTTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCAGCCCGAAAA CAATTAAGACAACCTCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCTGGTCAAGTAACTGACTGTGGAC AAGTCAAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACCC AGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGC |
| 124. | 2177 | 完全 | CAGATCGTCCCTGACACAGAGCCAGCTATCATGTGACGAAGCCCGGGCAGAAAAGTCAACATGACTTGTCTCAG CCAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACCAGTTATTCACTGACA ATTTCCGGCCTGGAGGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTACATTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTGCGAGGAGGAGGAAGTCA GGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGCTCGACCAGGAGCTAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGCAAGC GGCTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGGT ACATTAATCCTTCCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCCACTCTGACCACAGATAA GAGCTCCTCTACCCTTATATGACAGTGTGAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGT TACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTAATGGGGCCAGGGGACTACCCTGACAGTGTGAGTCCCGAGCCGAAC CTAAATCTAGTGACAAGACTCATACCTGCCCCCTGTCCAGCACCAGAGGCTGCAGGAGGACTAGCGTGTGTT CCTGTTTCCACCCAAACCAAGGATCTCTGATGATCTCCCGGACACCTGAAGTCACTTGTGTGGTCTGAGC GTGCTCAGCAGGACCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGGCTCGAGTGCATAATGCCAAAACCA AGCCAGGGAGGAAACAGTACAACCTCCACATATCGCGTCTGTCTGTGCTGCTGACTGTGCTGCACAGGATTTGGCT GAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCACTGCCTGCCCAATCGAGAAGACAAATAGCAAAA GCAAAGGGGCAGCCCGAGAACCTCAGGTCACGTGCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAACCCAGG TCAGTCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGATATTTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCC CGAAAACAATACCTGACTTGGCCCCCTGTCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAACTGACC GTGGACAAGTCAAGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATT ACACCCAGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGCAAG |
| 125. | 2177 | VL | CAGATCGTCCCTGACACAGAGCCAGCTATCATGTGACGAAGCCCGGGCAGAAAAGTCAACATGACTTGTCTCAG CCAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACTTCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACCAGTTATTCACTGACA ATTTCCGGCCTGGAGGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTACATTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTGCGAGGAGGAGGAAGTCA GGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGCTGGCTCGACCAGGAGCTAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGCAAGC GGCTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTTGGGTGAAACAGAGACCCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGGT ACATTAATCCTTCCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCCACTCTGACCACAGATAA GAGCTCCTCTACCCTTATATGACAGTGTGAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGT TACTATGACGATCACTACTCCCTGGATTAATGGGGCCAGGGGACTACCCTGACAGTGTGAGTCCCGAGCCGAAC CTAAATCTAGTGACAAGACTCATACCTGCCCCCTGTCCAGCACCAGAGGCTGCAGGAGGACTAGCGTGTGTT CCTGTTTCCACCCAAACCAAGGATCTCTGATGATCTCCCGGACACCTGAAGTCACTTGTGTGGTCTGAGC GTGCTCAGCAGGACCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGGCTCGAGTGCATAATGCCAAAACCA AGCCAGGGAGGAAACAGTACAACCTCCACATATCGCGTCTGTCTGTGCTGCTGACTGTGCTGCACAGGATTTGGCT GAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCACTGCCTGCCCAATCGAGAAGACAAATAGCAAAA GCAAAGGGGCAGCCCGAGAACCTCAGGTCACGTGCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAACCCAGG TCAGTCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGATATTTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCC CGAAAACAATACCTGACTTGGCCCCCTGTCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAACTGACC GTGGACAAGTCAAGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATT ACACCCAGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCCGGCAAG |
| 126. | 2177 | VH | CAGGTGCAGTGCAGCAGAGCGGAGCAGAGTGGTTCAGCAGGAGGAGTGTGAAAATGTCTGTAAGGCCA |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | GCGGCTACACCTTACACCGGTATACCATTGCATTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GTACATTAATCCTTCCCGAGGATACACAACTACAAACAGAAAGTTTAAAGACAAGGCCACTCTGACCCAGAT AAGAGCTCCTTACCCTTATATGCAGCTGAGTTCAGTACATCTGAGGACAGTGCAGTGTACTATTGCGCCA GGTACTATGACGATCACTACTCCTGGATTATTGGGGCCAGGGGACTACCTTGACAGTGAAGTCC |
| 127. | 2177 | CH2 | GCACCAGAGGCTGCAGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAACCAAAGGATCTCTGATGATCTCCC GGACACCTGAAGTCACTTGTGTGGTCTGAGCGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGT GACCGCGCTGAGGTGCATAAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGT TCTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGTGAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCAC TGCTGCCCAATCGAGAAGACAATTAGCAAAGCAAAG |
| 128. | 2177 | CH3 | GGGCAGCCCCGAGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAAACCAGGTCACTC TGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCCCCAAAA CAATTACCTGACTTGGCCCCCTGTCCGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACCGTGGAC AAGTCAAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCTGTATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAATCTCTGAGTCTGTCAACCGGC |
| 129. | 2305 | 完全 | CAGGTCCAGTGCAGCAGAGCGGAGCCGAAGTGGTCAGACCCGGCAGCTCCGTGAAAATCAGTTGCAAGGCTT CAGGCTATGATTTCTTAGTTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACTAATAATAATGGGAAGTTCAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGAC GAGTCAAAGCTCCACCGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCATCTGAGGATAGTCCGCTGACTTTTGGCGCTC GGAGAGAAACCACAAGTGTGGCCGCTACTATTACGCTATGGACTATTGGGGACAGGGCACACAGTCACTGT GTCAAGCGCTAGCACCAGGGGCTTCCGTGTTCCACTGGCACCTCCTCTAAGAGCACTTCCGGAGGAAC GCAGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTATGGAACAGCCGAGCACTGA CCAGCCGAGTCCACACATTTCTGCGGTGCTGCAGAGTTCAGGCTGTATTCCCTGAGCTCCGTTGGTCAAGT GCCATCTAGTTCACTGGGACACAGACTTACATCTGCAACGTGAATCAAAACCTCCAATACAAAGTTCGAC AAGAAAGTGGAAACCAATCTTTGTGATAAGACCCATACATGCCCCCCCTGTCTGCTCCAGAGCTGTGGGAG GACCAAGCGTGTCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGACACTCTGATGATTAGCCGAACACAGCAAGTCACTTG CGTGGTCTGGAGCTGAGCCAGGAGCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGGGTCGAGGTGCAT AATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAATTTACATACCCGCTGTGAGTGTCTGCTGAGTGTGCTG ACCAGACTGGTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAACAAAGCACTGCCCGCTATCCGAGAA GACCATTTCTAAAGCAAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTCTATGTGCTGCCTCCAAGTCCGGACGAGCTG ACAAAACCAAGGTCAAGCTGCTGTGTCTGTGTAAGGGGTTCTACCCCTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAAT CTAATGGACAGCCTGAAAACAATTTACTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCTTTCTGTA CTAAAACCTGACAGTGGATAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTTTCTGTAGTGTGATGCATGAGGCC CTGCACAATCATTACACCCAGAATCACTGAGCCTGTCCCCGGCAAAG |
| 130. | 2305 | VH | CAGGTCCAGTGCAGCAGAGCGGAGCCGAAGTGGTCAGACCCGGCAGCTCCGTGAAAATCAGTTGCAAGGCTT CAGGCTATGCATTTCTTAGTTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACTAATAATAATGGGAAGTTCAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGAC GAGTCAAAGCTCCACCGCTTATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCATCTGAGGATAGTCCGCTGACTTTTGGCGCTC GGAGAGAAACCACAAGTGTGGCCGCTACTATTACGCTATGGACTATTGGGGACAGGGCACACAGTCACTGT GTCAAGC |
| 131. | 2305 | CH1 | GCTAGCACCAAAGGGCTTCCGTGTTTCCACTGGCACCTCCTCTAAGAGCACTTCCGGAGGAACCCGAGCTC TGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGTCAAGTGTCTATGGAACAGCGGAGCACTGACCAAGCGG AGTCCACACATTTCTGCGGTGCTGCAGAGTTCAGGCTGTATTCCCTGAGTCCGTTGGTCAAGTGCACATCT AGTTCACTGGGGACACAGACTTACATCTGCAACGTGAATCAAAACCTCCAATACTAAGGTGCAGCAAGAAAG TG |
| 132. | 2305 | CH2 | GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGACACTCTGATGATTAGCC GAACACCAGAAGTCACTTGGCTGGTCTGGACGTGAGCCACAGGAGCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGGGTCGAGGTGCATAAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAAATCTACATACCCGCTCGT AGTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCAC TGCCCCCTTATCGAGAAGACATTTCTAAAGCAAAG |
| 133. | 2305 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTCTATGTGCTGCCTCCAGTCCGGACGAGCTGACAAAAAACAGGTCAAGCC TGCTGTGTCTGGTGAAGGGTTCTACCCCTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCTGAAAA CAATTAATCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCTTTCTGTACTCAAAACTGACAGTGGAT AAGAGAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAATCACTGAGCCTGTCCCCGGC |
| 134. | 5238 | 完全 | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTGACCCAGCCCGGCGAGAAAGTCAACATGACTTGTCTCAG CAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGACAGCGCTCTGGGACCAAGTATTCACTGACA ATTTCCGGCATGGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGTTGAGGAGGAGGAAAGTCA GGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGCAAGTGTGAAAAATGCTCTGTAAGGCCAGC GGCTACACCTTACACCGGTATACCATTGCATTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGGACTGGAATGGATCGGGT ACATTAATCCTAGCCGAGGATACACAACTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCACAGATAA GAGCTCCTTACCAGATATATGCAGCTGAGTTCAGTACATCTGAGGACAGTGGCGTGTACTATTGGCTAGG TACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGGACTACCTGACCGTGGAGTCCCGAGCCGAAC CTAAATCTAGTGACAAGACTCATACCTGCCCCCTGTCCAGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCCACCCAAACCAAAGGATACTCTGATGATCTCCCGGACACCTGAAGTCACTTGGTGGTCTGGAC GTGCTCACAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCCAGGTGCATAAATGCCAAAACCA AGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGTGTCTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGCT GAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACAATAGCAA GCCAAGGGGACAGCCCGAGAACCTCAGGCTTACGTGCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAAACAGG TCAGTCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATPCAAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCC CGAAAACAATTAACCTGACTTGGCCCCCTGTCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACC GTGGACAAGTCAAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATT ACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCAACCGGC |
| 135. | 5238 | VL | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTGACCCAGCCCGGCGAGAAAGTCAACATGACTTGTCTCAG CAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGA |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | CACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGACAGTATTCACTGACA ATTTCCGGCATGGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAAT |
| 136. | 5238 | VH | CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGAGCAAGTGTGAAAATGCCTGTAAGGCCA GCGGCTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGACTGGAATGGATCGG GTACATTAATCCTAGCCGAGGATACAAAACACCAAGGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCCACAGAT AAGAGCTCCTCTACCGCATATATGCAGCTGAGTTCCTGACATCTGAGGACAGTGGCCTGACTATTGCGCTA GGTACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTGGGGCCAGGGGACTACCCTGACCGTGGAGCTCC |
| 137. | 5238 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAAACCAAAGGATACTCTGATGATCTCCC GGACACCTGAAGTCACTTGGCTGGTTCGTTGGAGCTGTCTCACGAGGACCCGGAAGTCAAGTTCACCTGGTACGT GGACGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGTG TCTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCC TGCTGTCTCAATCGAGAAGACAAATAGCAAAAGCCAAG |
| 138. | 5238 | CH3 | GGGCAGCCCCGAGAACCCTCAGGTCTACGTGCTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAAACCAGGTCACTC TGCTGTGCTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCCCCAAAA CAATTACCTGACTTGGCCCCCTGTCCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACCGTGGAC AAGTCAACGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCCGC |
| 139. | 2167 | 完全 | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTACGCCAGCCCCGGCGAGAAAAGTCACAATGACTTGTCTCAG CAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGA ACATCCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACCAGTATTCACTGACA ATTTCCGGCATGGAGGCTGAAGATGCCCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAATGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGTCA GGTGCAGCTGCAGCAGAGCCGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGAGCAAGTGTGAAAATGTCTGTAAAGGCCAGC GGTACACCTTCACACCGGTATACCATATGGGTGAAAACAGAGACCCGGGCAGGGACTCCGCTGACCGGCTGGT ACATTAATCCTTCCCGAGGATACAAAACCTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCACAGATAA GAGCTCCTCTACCGCATATATGCAGCTGAGTTCACCTGACATCTGAGGACAGTCCCGTGTACTATTGGCCTAGG TACTATACGATCACTACTCCTGGATTATTGGGGCCAGGGGACTACCCTGACAGTGAAGTCCGCGCCGCAAC CTAAATCTAGTGACAAGACTCATACCTGCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGT CCTGTTTCCACCCAAAACCAAAGGATACCTGATGATCTCCCGGACACCTGAAGTCACTTGTGTGGTCTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCA AGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGTGTCTGCTGACTGTGCTGCACCAGGATTGGCT GAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAGACAATTAGCAAA GCCAAGGGGACCCCGAGAACCCTCAGGTCTACGTGCTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAAACCAGG TCAGTCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCC CGAAAACAATTACCTGACTTGGCCCCCTGCTCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACC GTGGACAAGTCAAGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATT ACACCAGAAATCTCTGAGTCTGTACCCCGCAAG |
| 140. | 2167 | VL | CAGATCGTCTGACACAGAGCCAGCAATCATGTACGCCAGCCCCGGCGAGAAAAGTCACAATGACTTGTCTCAG CAAGCTCCTCTGTGAGCTACATGAACCTGGTATCAGCAGAAAAGCCGGAACCTCCCCAAGAGATGGATCTACGA CACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTGCCTGCACACTTCAGGGGCAGCGGCTCTGGGACCAGTATTCACTGACA ATTTCCGGCATGGAGGCTGAAGATGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGTTCAAACCCATTCACTTTTG GATCTGGCACCAGCTGGAATTAAT |
| 141. | 2167 | VH | CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGCAGCAGCAGGAGCAAGTGTGAAAATGCCTGTAAGGCCA GCGGCTACACCTTCACACGGTATACCATGCATTGGGTGAAACAGAGACCCGGGCAGGACTGGAATGGATCGG GTACATTAATCCTTCCCGAGGATACAAAACCTACAACCAGAAGTTTAAAGACAAGGCTACTCTGACCCAGAT AAGAGCTCCTCTACCGCATATATGCAGCTGAGTTCCTGACATCTGAGGACAGTCCCGTGTACTATTGCGCTA GGTACTATGACGATCACTACTCCTGGATTATTGGGGCCAGGGGACTACCCTGACAGTGGAGTCC |
| 142. | 2167 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCACCCAAAACCAAAGGATCACTGATGATCTCCC GGACACCTGAAAGTCACTTGTGTGGTCTGGACGTGCTCACGAGGACCCGGAAGTCAAGTGTAACTGGTACGT GGACGGCTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCCGCTCGTG TCTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAATGCAAGGTGAGCAACAAGGCC TGCTGTCTCCAATCGAGAAGACAATTAGCAAAAGCCAAG |
| 143. | 2167 | CH3 | GGGCAGCCCCGAGAACCCTCAGGTCTACGTGCTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAAAACCAGGTCACTC TGCTGTGCTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGGCAGCCCCAAAA CAATTACCTGACTTGGCCCCCTGTCCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATAGTAAACTGACCGTGGAC AAGTCAACGGTGGCAGCAGGGAACGCTTTAGCTGTTCCTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAATCTCTGAGTCTGTACCCCGC |
| 144. | 3320 | 完全 | GAAGTCCAGCTGGTCCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTT CCGGCTTCACTTTTAAACAAGTATGCAATGAAATGGGTGCGGCAGGCACAGGGAAGGACTGGAATGGGTGGC CCGGATCAGATCTAAGTACAACAACCTACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGATAGGTTCACAATTTCT CCCGACGATAGTAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAATCTGAAGCAGAGGACACTGCAGTCTACTATT GCGTGCAGACCGGAACTTTGGCAATAGCTACATCTCCTATTGGCATACTGGGACAGGGAACCTGGTCAAC AGTGAAGCTCCGGAGGAGGAGGACGCGGAGGAGGAGCTCTGGGGAGGCGGGAGTCAAGTGTGGTCAACCCAG GAGCCCTCACTGACAGTCAAGCCCTGGAGGCACTGTGACCCCTGACATGTGGGTCTAGTACCGGAGCCGTGACAT CTGGCAACTATCCCAATTTGGGTGCAGCAGAAAACCTGGACAGGCTCCACGAGGACTGATTGGGGAACAAGTT CTGGCCCCCGGAACCTCCTGCTCGATTTCCTGGCTCTCTGCTGGGAGGAAAAGCAGCAGTCAACCTGAGCGGA GTGCAGCCTGAGGATGAAGCCGAGTACTATTGCGTGTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCCGAGGCGGGA CAAAGCTGACTGTGCTGGTGCAGAGCCAAAGTCAAGCGACAAAACCTCACACCTGCCACCTTGTCCAGCTCC AGAAGCTGGAGGACCACTCCGTGTTCTGTGTTCCACCCAAAGCCAAAGATACACTGATGATCTCTCGACT CCCGAGGTCACTGTGTGGTCTGAGTGTGTACACGAAGACCCGAGGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGATG GCGTCAAGTGCATAATGCCAAGACCAACCTCGAGAGGAACAGTATAATTCAACTTACCGGCTCGTGGAGCT CTGACCGTGTGCTGATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAAAGTGAAGCAATAAGGCACCTGCCT GCCCAATCGAAAAACCAATTAGCAAGGCTAAAGGGCAGCCAAAGAGCCAGGCCAGTCACTGATCTCCTCCAA GCAGGGACGAACTGACCAAGAACAGGCTCCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGTCTATCTTACTGATATTG AGTGGAAATGGGAGTCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGC |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|---|
| | | | AGTTTCGCACCTGGTCTCCAAGCTGACCGTGGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTTTAGCTGTTCGG TGATGATGAAGCCCTGCACAATCATACACACAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCCGGCAAA |
| 145. | 3320 | VH | GAAGTCCAGCTGGTCCGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGAAACTGAGCTGCCCGCCTT CCGGCTTCACTTTTAACAAAGTATGCAATGAAATGGGTGCGGCAGGCACCCAGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGC CCGGATCAGATCTAAGTACAACAACACTACGCTACCTACTATGTCAGACAGTGTGAAGGATAGGTTCCACAATTTCT CCGCAGGATAGTAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAATCTGAAGACAGAGGACACTGCAGTCTACTATT CGTGGACACCGGAAACTTTGGCAATAGCTACATCTCCTATTGGGCACTACTGGGGACAGGGAACCCCTGGTCCAC AGTGAGCTCC |
| 146. | 3320 | VL | CAGACTGTGGTCCACCAGGAGCCCTCACTGACAGTCAAGCCCTGGAGGCACTGTGACCCTGACATGTGGGTCTA GTACCCGGAGCCGTGACATCTGGCAACTATCCCAATPGGGTGCAGCAGAAACCTGGACAGGCTCCACGAGGACT GATTTGGAGGAACAAAAGTTCTTGGCCCCGGAACTCCTGCTCGATTTTCCGGCTCTCTGCTGGGAGGGAAAGCA GCACTGACCCCTGAGCGGAGTGCAGCCTGAGGATGAAGCCGAGTACTATTGGTGTCTGTGGTACAGCAACAGAT GGTGTTCGGAGGCGGGACAAGCTGACTGTGCTG |
| 147. | 3320 | CH2 | GCTCCAGAAGCAGCTGGAGGACATCCGTGTTTCCCTGTTTCCACCAAGCCCAAAGATACACTGATGATCTCTC GCACTCCCGAGGTCACCTGTGTGGTCTGTGTTGCACACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTTAACTGGTACGT GGATGGCGTCCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAACCTCGAGAGGAACAGTATAATCAACTTACCCGGTCTGTG AGCGTCTGACCGTGTGCTGATCAGGACTGGCTGACCGAAAGGAGTACAAGTCAAAAGTGAAGCAATAAGGCAC TGCTGCCCAATCGAAAAAACCTTAGCAAGGCTAAA |
| 148. | 3320 | CH3 | GGGCAGCCAAGAGAGCCCGAGGCTACGCTGTATCCCTCCAAGCAGGGACGAACTGACCAAGAACCAGGCTCTCC TGACATGTCTGGTGAAGGGTTCTATCTAGTGATATTGCAAGTGGAAATGGGAGTCAAATGGACAGCCAGAGAA CAATTACAAGACACACCCCTGTGCTGGACTGTGATGGCAGTTTCGCACTGGTCTCCAAGTGAAGGATGAT AAATCTAGGTGGCAGCAGGGAACTGTTAGCTGTTCCGTGATGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACAC AGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCCGGC |
| 149. | 5241 | 完全 | CAGGTCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAACCTGGTGCAGACCCCGGAGCTCCGTGAAAATCAGTTGCAAGGCTT CAGGCTATGCATTCCTAGTTACTGGATGAACTGGTGAAGCAGAGGCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACAACATAAATGGGAAGTCAAAGGAAAGGCCACACTGACTGCTGAC GAGTCAAGCTCCACTGCATATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCATCTGAGGATAGTGGCGTGTACTTTTGGCGCTC GGAGAGAACCAACAACCTGTGGCCGCTACTATTACGCCATGGACTATTGGGGACAGGGCACCACTGACAGT GTCAAGCGCTAGCACTAAAGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCACCCCTCTTAAGAGCACATCCGGAGGAAC GCAGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATPCCCAGAGCCGTCACAGTGTGATGGAACAGCGGCGCACTGA CTAGCCGGGTCCACACCTTCTTCCGTGCTGCAGAGTTCAGGCCTGTATTCCCTGAGCTCCGTGGTCAACCGT GCCATCTAGTTCAGTGGGACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAACCTTCCAATACAAGGTCGAC AAGAAAGTGGAAACCAAACTTTGTGATAAGACTCATACCTGCCCCCTTGTCTGCTCCAGAGTGTCTGGGAG GACCAAGCGTGTCTGTTTCCACCCAAACCTAAGGACACACTGATGATAGCCGAAACCCAGAAGTGCATG CTGGTCTGGTGGAGCTGAGCCAGGACCCGAAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGGCTGAGGTGAT AATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAAATCTACTTACCAGCGTGTGAGTGTCTGACCGTGTCTG ACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTGTCCAACAGGCACTGCCCGCCCTATCGAGAA GACCATTTCTAAAGCTAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTATGTGTACCCTCCAAGTCGGGACGAGCTG ACCAAAAACCCAGGTCAGCCTGACATGTCTGGTGAAGGGGTTTTATCCCTCCGATATTGGAGTGGAGT CTAATGGACAGCCTGAAAACAATTACAAGACTACCCCTCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCCGCTGGT CTCAAAACTGACTGTGGATAAAGAGCAGGTGGCAGGAGGCAACGCTCTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCT CTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCACTGAGCCTGTCCCCCGGC |
| 150. | 5241 | VH | CAGGTCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAACCTGGTGCAGACCCCGGAGCTCCGTGAAAATCAGTTGCAAGGCTT CAGGCTATGCATTCCTAGTTACTGGATGAACTGGTGAAGCAGAGGCTGGGCAGGGACTGGAATGGATCGG GCAGATTTGGCCAGGCGACGGGGATACAACATAAATGGGAAGTCAAAGGAAAGGCCACACTGACTGCTGAC GAGTCAAGCTCCACTGCATATATGCAGCTGTCTAGTCTGGCATCTGAGGATAGTGGCGTGTACTTTTGGCGCTC GGAGAGAAACCAACAACCTGTGGCCGCTACTATTACGCCATGGACTATTGGGGACAGGGCACCACTGACAGT GTCAAGC |
| 151. | 5241 | CH1 | GCTAGCACTAAAGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCACCCCTCCTCTAAGAGCACATCCGGAGGAACCTGCAGCTC TGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATTTCCAGAGCCCGTCCAGAGTGTATGGAACAGCGGGCAGTACTAGCGG GGTCCACACCTTCTTCCGTGCTGCAGAGTTCAGGCTGTATTCCCTGAGCTCCGTGGTCAACCTGCTGATCT AGTTCACTGGGGACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAACCTCCAATACAAGGTCGACAAGAAAG TG |
| 152. | 5241 | CH2 | GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAACCTAAGGACACACTGATGATTAGCC GAACCCCGAAGTGCATGCGTGGTCTGGAGCTGAGCCACGAGGACCCCAAGTCAAATTCAACTGGTACGT GGATGGGTCGAGGTGCATAAATGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTATAAATCTACTTACCAGCGTCTG AGTGTCTGACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAATGCAAGGTTCCAACAGGCGAC TGCCCGCCCTATCGAGAAGACCATTTCTAAAGCTAAG |
| 153. | 5241 | CH3 | GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGCTATGTGTACCCTCCAAGTCCGGAGGAGCTGACCAAAAACAGGTCAGCC TGACATGTCTGGTGAAGGGTTTTATCCCTCCGATATTGCAAGTGGAGTGGGAATCTAATGGACAGCCTGAAAA CAATTACAAGACTACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGATCTTTCCGCTGGTCTCAAACCTGACTGTGGAT AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCACTGAGCCTGTCCCCCGGC |
| 154. | 3322 | 完全 | GAAGTCCAGCTGGTCCGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGGAGTCTGAAACTGTGATGCGCCGCTA GCGGGTATACCTTCAAGACTACGTCAATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCAGGGAAGGGACTGGAATGGATCGG CTATATTAATCCCTACAAGCAGCGGACTAAGTATAATGAGAAATTTCAAGGCGAGGGTGCACATCAGCTCCGAT AAGTCTATTAGTACAGCCTACATGGAGCTGTCTAGTCTGCGCAGCGAAGACACAGCAATGTACTATTGCGCCA GGGGACATACTATTACGGAACCTCGGTGTTTCCGATTAAGTGGGGCCAGGGGACCCCTGGTCAAGTGTCAAGCGG AGCGGGGGAAAGTGGAGGAGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGAGCGACATCGTGTGATGACCCAGTCCCTGCTACA CTGTCACTGAGCCAGGCGAGCGGGCAACTCTGCTCTGTAGTCTCTAAGTCTCTGCAGAACGTTGAATGGAA ACACCTATCTGACTGGTTTCAAGCAGAAACAGGCCAGAGCCCGAGCTGCTGATCTATAGAATGCTCCAATCT GAACTCTGGCGTGCCTGATAGGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACCGAGTTCACCTGACCATTAAGTCACTG GAGCCAGAAGACTTCGCGGTGTATTACTGCATGCAAGCCTGGAGTACCCCATCACTTTTGGAGCTGGCACC AGCTGGAGATCAAGGCAGCCGAACCAAGAGCTCCGATAAAACACACTACTGCCACCTTTGTCACAGCCAGA AGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAGACACCCCTGATGATCTCCCGGACTCCC GAGGTCACTGTGTGGTCTGTCACTGAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTCAATTTGGTACGTGGATGGCG |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | GGGAACACAGACTTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACTAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCA AAGAGCTGTGATAAAACCCATACATGCCACCTTGTCCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCC TGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCGTGATGATTTCCAGGACCCCTGAAGTCACATGCGTGGTCTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAA CCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACCTACCGCGTCTGTCTGTCCCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCACTGCCCGCCCTATCGAGAAAAACCATTAGCAAGGC AAAAGGCCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACAAAAGAACAGGTC AGTCTGACTTGTCTGGTAAAAGGATTTTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCCG AAAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCCCTGGTCAGTAAGCTGACTGT GGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTAC ACCCAGAAGTCACTGAGCCTGTCCCCGGCAAA |
| 165. | 2303 | VH | CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCCGAGGAGGAGTGGTCCAGCCAGGACGGTCCCTGAGACTGTCTTTGCAAGGCTA GTGGGTATACTTTACCTCTTACACCATGCCTGGTGCGCCAGGCACCAGGGAAGGGACTGGAATGGATCGG GTATATTAACCCTAGCTCCGGATACACAAAGTACAACCAGAAGTTCAAAGACCCGGTTCACCATCTCCGCTGAT AAGAGTAAATCAACCGCATTCCTGCAGATGGACTCTCTGCGACCCGAGGATACAGGCGTGTACTTCTGGGCC GGTGGCAGGACTACGATGTGTATTTTACTACTGGGGCCAGGGGACTCCAGTCACCGTGTCTAGT |
| 166. | 2303 | CH1 | GCATCAACTAAGGGACCCAGCGTGTTCCTACTGGCCCCCTCAAGCAAAAGCACATCCGGAGGAACTGCAGCTC TGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATTTCCAGAGCCCGTCACCGTGTCTTGGAAACAGTGGAGCCCTGACTAGCGG CGTCCATACCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCTCTGGGCTGTATAGCCTGAGTTCAGTGGTCACAGTGCCTAGC TCTCTCTGGGAACACAGACTTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACTAAAGTCGACAAGAAAG TG |
| 167. | 2303 | CH2 | GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCGTGATGATTTCCA GGACCCCTGAAGTCACATGCGTGGTCTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCTAGGGAGGAACAGTATAACTCCACCTACCGCGTCTGT TCTGTCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAAGTAAATAAGGCAC TGCCCCCCCCATCGAGAAAAACCATTAGCAAGGCAAAA |
| 168. | 2303 | CH3 | GGCCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACAAAAGAACAGGTCAGTC TGACTTGTCTGGTAAAAGGATTTTATCCAAGCGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCCGAAAA CAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCCCTGGTCAGTAAGCTGACTGTGGAT AAATCACGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACC AGAAGTCACTGAGCCTGTCCCCGGC |

10

20

【 0 3 3 7 】

(表 Y Y 2) 表 Y Y に記載したクローンのポリペプチド配列

| 配列番号: | クローン | 記載 | ポリペプチド配列 |
|-------|------|-----|--|
| 169. | 6690 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS |
| 170. | 6690 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK |
| 171. | 6690 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 172. | 6691 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGT DFTLN IHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQCLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSLSLASEDSAV YFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI S R TPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSD GSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 173. | 6691 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGT DFTLN IHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIK |
| 174. | 6691 | VH | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQCLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSLSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTLTVSS |
| 175. | 6691 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK |
| 176. | 6691 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 177. | 1064 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGT DFTLN IHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWKQRPGGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSLSLASEDSAV YFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSPVFLFPPKPKDTLMI S R TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 178. | 1064 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGT DFTLN IHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIK |
| 179. | 1064 | VH | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQCLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSLSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTLTVSS |
| 180. | 1064 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK |
| 181. | 1064 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFALVSKLTV KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 182. | 1065 | 完全 | DIKLLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGGGSGGGGSGVDDIQLTQSPA IMSASPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTYSYSLTISMEAE DAATYCCQWSSNPLTFGAGTKLELKAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 183. | 1065 | VH | DIKLLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 184. | 1065 | VL | DIQLTQSPAIMSASPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTYSYSLT ISSMEAEADAATYCCQWSSNPLTFGAGTKLEL |
| 185. | 1065 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK |
| 186. | 1065 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 187. | 1067 | 完全 | QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTYSYSLT ISGMEAEADAATYCCQWSSNPLTFGSGTKLEINGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYC ARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 188. | 1067 | VL | QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTYSYSLT ISGMEAEADAATYCCQWSSNPLTFGSGTKLEIN |
| 189. | 1067 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 190. | 1067 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK |
| 191. | 1067 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 192. | 1842 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGT DFTLN IHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKI |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|---|
| | | | SCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 193. | 1842 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGTTKLEIK |
| 194. | 1842 | VH | QVQLQSSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSS |
| 195. | 1842 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 196. | 1842 | CH3 | GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 197. | 1335 | 完全 | QIVLSQSPAILASAPGKVTMTCRASSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVVPRFRSGSGSGTYSYLSISRVEAEDAATYCCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 198. | 1335 | VL | QIVLSQSPAILASAPGKVTMTCRASSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVVPRFRSGSGSGTYSYLSISRVEAEDAATYCCQWTSNPPTFGGGTKLEIK |
| 199. | 1335 | CL | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 200. | 1342 | 完全 | QVQLQSPGAELVLRPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWFYFNWVAGTITVTVSSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPEKSCDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 201. | 1342 | VH | QVQLQSPGAELVLRPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWFYFNWVAGTITVTVSS |
| 202. | 1342 | CH1 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE |
| 203. | 1342 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 204. | 1342 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 205. | 5239 | 完全 | QVQLVQSGGGVQPGSRSLRSLSCASGYFTFTRYTMHWVRQAPGKGLWIGYINPSRGYTYNQNQKVKDRFTISRDNKNTAFIQMDSLRLPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS |
| 206. | 5239 | VH | QVQLVQSGGGVQPGSRSLRSLSCASGYFTFTRYTMHWVRQAPGKGLWIGYINPSRGYTYNQNQKVKDRFTISRDNKNTAFIQMDSLRLPEDTGVYFCARYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS |
| 207. | 5239 | CH1 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE |
| 208. | 5239 | CH2 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 209. | 5239 | CH3 | GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 210. | 3916 | 完全 | EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSLSCAASGFTFNIDYAMHWVRQAPGKGLWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNTAFIQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPA TLSPGKERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGGTRLEIKAAEPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 211. | 3916 | VH | EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSLSCAASGFTFNIDYAMHWVRQAPGKGLWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNTAFIQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYGMDVWGQGTITVTVSS |
| 212. | 3916 | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGGTRLEIK |
| 213. | 3916 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 214. | 3916 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 215. | 2185 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGTTKLEIKGGGGGGGGGGGGGGVQLQSSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDMLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 216. | 2185 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGTTKLEIK |
| 217. | 2185 | VH | QVQLQSSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTAD |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMDYWGQTTVTVSS |
| 218. | 2185 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 219. | 2185 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 220. | 5242 | 完全 | QVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQLEWIGQIWPQGDGTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSTGQTYICNVNHKPSNTKVD KKVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKLSLSLSPG |
| 221. | 5242 | VH | QVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQLEWIGQIWPQGDGTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMDYWGQTTVTVSS |
| 222. | 5242 | CH1 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV |
| 223. | 5242 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 224. | 5242 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFALVSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 225. | 2171 | 完全 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEINSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR YYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFALVSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 226. | 2171 | VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEIN |
| 227. | 2171 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQTTTLTVSS |
| 228. | 2171 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 229. | 2171 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFALVSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 230. | 2177 | 完全 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEINSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR YYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 231. | 2177 | VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEIN |
| 232. | 2177 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQTTTLTVSS |
| 233. | 2177 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 234. | 2177 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 235. | 2305 | 完全 | QVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQLEWIGQIWPQGDGTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSTGQTYICNVNHKPSNTKVD KKVPEKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 236. | 2305 | VH | QVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQLEWIGQIWPQGDGTNYNGKFKGKATLTAD ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMDYWGQTTVTVSS |
| 237. | 2305 | CH1 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV |
| 238. | 2305 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 239. | 2305 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 240. | 5238 | 完全 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEINSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR YYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 241. | 5238 | VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLT ISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEIN |
| 242. | 5238 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTD |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | ESSSTAYMQLSSLSASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMYDYGQGTTVTVSS |
| 268. | 2175 | CH2 | APELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 269. | 2175 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 270. | 2303 | 完全 | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFSTYTMHWVRQAPGKGLWIGYINPSSGTYKYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLOMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVFYDYGQGTPTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPSKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 271. | 2303 | VH | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFSTYTMHWVRQAPGKGLWIGYINPSSGTYKYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLOMDSLRLPEDTGVYFCARWQDYDVFYDYGQGTPTVTVSS |
| 272. | 2303 | CH1 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEV |
| 273. | 2303 | CH2 | APELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 274. | 2303 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 275. | 6690 | VH | QVQLVQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWKQRPQGQCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 276. | 6690 | CH2 | APEAAGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 277. | 6690 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 278. | 6691 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDGSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFPGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQCLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLSASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMYDYGQGTTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 279. | 6691 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDGSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFPGCGTKLEIK |
| 280. | 6691 | VH | QVQLVQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQCLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLSASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMYDYGQGTTVTVSS |
| 281. | 6691 | CH2 | APEAAGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 282. | 6691 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 283. | 1064 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDGSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFPGGTTKLEIKGGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQCLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLSASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMYDYGQGTTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 284. | 1064 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDGSDYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFPGGTTKLEIK |
| 285. | 1064 | VH | QVQLVQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGQCLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLSASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYYAMYDYGQGTTVTVSS |
| 286. | 1064 | CH2 | APELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 287. | 1064 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 288. | 1065 | 完全 | DIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWKQRPQGQCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGVDIQLTQSPAIMSPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTYSLTISSMEADAATYCCQWSSNPLTFGAGTKLELKAAPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK |
| 289. | 1065 | VH | DIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWKQRPQGQCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 290. | 1065 | VL | DIQLTQSPAIMSPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTYSLTISSMEADAATYCCQWSSNPLTFGAGTKLEL |
| 291. | 1065 | CH2 | APELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 292. | 1065 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG |
| 293. | 1067 | 完全 | QIVLTQSPAIMSPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVAHFRSGSGSGTYSLTISSMEADAATYCCQWSSNPLTFGSGTKLEINGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWKQRPQGQCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDMLISRTPEVTCVVVD |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|--|
| | | | VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK |
| 294. | 1067 | VL | QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVPAPFRGSGSGTSYSLTISGMFEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEIN |
| 295. | 1067 | VH | QVQLQDQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWWKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 296. | 1067 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 297. | 1067 | CH3 | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG |
| 298. | 1842 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDVDYDGDYSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFETLNHHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGGSGGGVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYAMDYWGQGTTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK |
| 299. | 1842 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDVDYDGDYSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLSVGIIPRFRSGSGSGTDFETLNHHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK |
| 300. | 1842 | VH | QVQLQDQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPQDGTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYAMDYWGQGTTVTVSS |
| 301. | 1842 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 302. | 1842 | CH3 | GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG |
| 303. | 1335 | 完全 | QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPVFRFSGSGSGTSYSLTISRVEADAATYYCQQWTSNPFTEGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 304. | 1335 | VL | QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPVFRFSGSGSGTSYSLTISRVEADAATYYCQQWTSNPFTEGSGTKLEIK |
| 305. | 1335 | CL | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 306. | 1342 | 完全 | QVQLQDQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFENVWAGTPTVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK |
| 307. | 1342 | VH | QVQLQDQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFENVWAGTPTVTVSA |
| 308. | 1342 | CH1 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE |
| 309. | 1342 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 310. | 1342 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG |
| 311. | 5239 | 完全 | QVQLVQSGGGVQPGRSRLRSLCKASGYTFTRYTMHWWKQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG |
| 312. | 5239 | VH | QVQLVQSGGGVQPGRSRLRSLCKASGYTFTRYTMHWWKQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS |
| 313. | 5239 | CH1 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE |
| 314. | 5239 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 315. | 5239 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG |
| 316. | 3916 | 完全 | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRSLCAASGFTFNDAAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRADTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGGQGTPTVTVSSGGGGSGGGGGGGSEIVLTQSPA TLSPGGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIKAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK |
| 317. | 3916 | VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRSLCAASGFTFNDAAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRADTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGGQGTPTVTVSS |
| 318. | 3916 | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIK |
| 319. | 3916 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |

10

20

30

40

| | | | |
|------|------|-----|---|
| | | | SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 320. | 3916 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 321. | 2185 | 完全 | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGDSDYLNWYQQIPGGPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIKGGGGGGGGGGGGGGVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQTTVTVSSAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 322. | 2185 | VL | DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGDSDYLNWYQQIPGGPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWFEGGKLEIK |
| 323. | 2185 | VH | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQTTVTVSS |
| 324. | 2185 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 325. | 2185 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 326. | 5242 | 完全 | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSTKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 327. | 5242 | VH | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADSSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQTTVTVSS |
| 328. | 5242 | CH1 | ASTKGPSVFLPAPSSTKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV |
| 329. | 5242 | CH2 | APEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 330. | 5242 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 331. | 2171 | 完全 | QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPFRGSGSGTSYSLTISGMEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEINGGGGGGGGGGGGGVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 332. | 2171 | VL | QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPFRGSGSGTSYSLTISGMEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEIN |
| 333. | 2171 | VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQTTTLTVSS |
| 334. | 2171 | CH2 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 335. | 2171 | CH3 | GQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 336. | 2177 | 完全 | QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAPFRGSGSGTSYSLTISGMEADAATYYCQQWSSNPFTEGSGTKLEINGGGGGGGGGGGGGVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARYDDHYSLDYWGQTTTLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

10

20

30

【 0 3 3 8 】

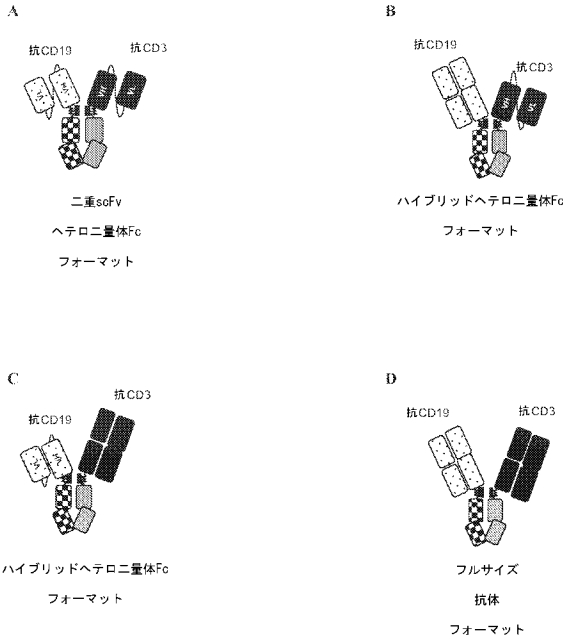
(表 Z Z) 抗原結合ポリペプチド構築物の例示的な C D R 配列

| CDR | 配列 |
|-----------------------------|--|
| 野生型 OKT3 (CD3 結合) | L1: SSVSY (配列番号: 337) L2: DTS (配列番号: 338) L3: QQWSSNP (配列番号: 339) H1: GYTFTRYT (配列番号: 340) H2: INPSRGYT (配列番号: 341) H3: ARYYDDHY C LDY (配列番号: 342) |
| 安定化した OKT3 の変異体 (CD3 結合) | L1: SSVSY (配列番号: 343) L2: DTS (配列番号: 344) L3: QQWSSNP (配列番号: 345) H1: GYTFTRYT (配列番号: 346) H2: INPSRGYT (配列番号: 347) H3: ARYYDDHY S LDY (配列番号: 348) |
| HD37 (CD19 結合) | L1: QSVDYDGDSYL (配列番号: 348) L2: DAS (配列番号: 349) L3: QQSTEDPWT (配列番号: 350) H1: GYAFSSYW (配列番号: 351) H2: IWPGDGDT (配列番号: 352) H3: ARRETTTVGRYYYAMDY (配列番号: 353) |

10

20

【 図 1 】

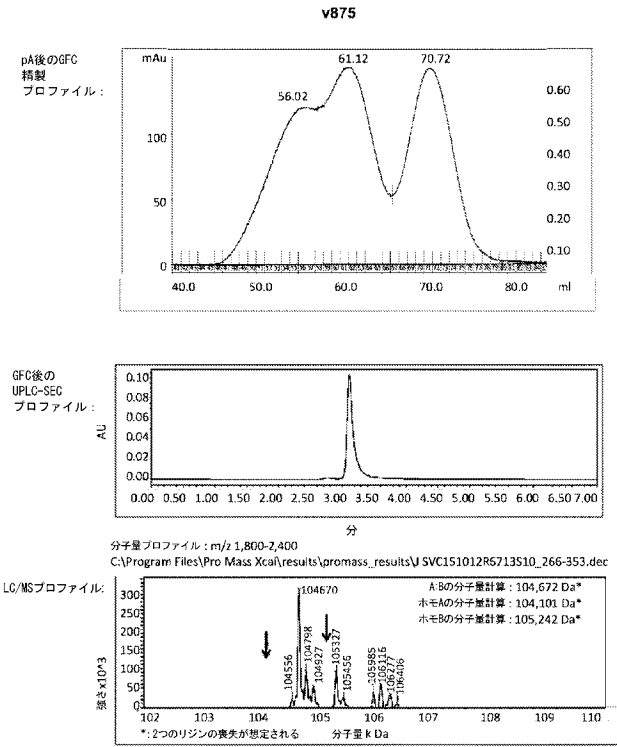


【 図 2 】

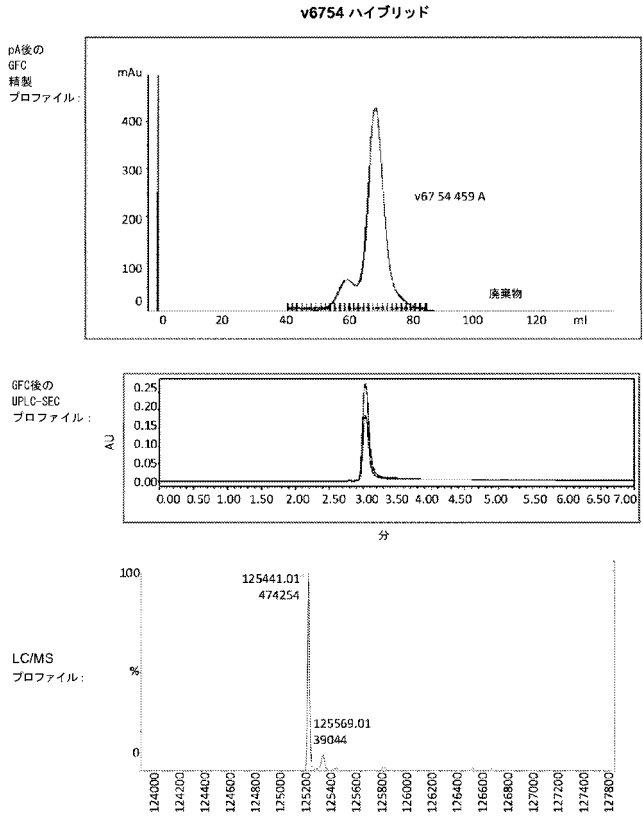
| 変異体及び組成物の一覧 | 変異体番号 | | 野生型Fc/FcRノックアウト* | |
|---------------------------|-------------|-------------------------------------|------------------|---------------------------|
| | 変異体番号 | 変異体名 | 変異体番号 | 変異体名 |
| 二重scFv ヘテロ二量体 Fc変異体 | 875 (1661) | αCD3_OKT3 scFv | 875 (1661) | αCD19_HD37 scFv |
| | 873 | αCD3_プリナツモマブ scFv | 873 | αCD19_HD37 scFv |
| | 1653 | αCD3_OKT3 scFv (CDR C->S) | 1653 | αCD19_HD37 scFv |
| ハイブリッド ヘテロ二量体 Fc変異体 | 1853 (6754) | αCD3_hOKT3 Fab | 1853 (6754) | αCD19_HD37 scFv (VHVL SS) |
| | N5 (10151) | αCD3_hOKT3 Fab | N5 (10151) | αCD19_HD37 Fab |
| | 6750 (6751) | αCD3_OKT3 scFv | 6750 (6751) | αCD19_HD37 Fab |
| フルサイズ 抗体 フォーマット | 6475 (6749) | αCD3_OKT3 scFv (CDR C->S) | 6475 (6749) | αCD19_HD37 Fab |
| | N7 (10152) | αCD3_OKT3 scFv (VLVH SS) | N7 (10152) | αCD19_HD37 Fab |
| | N11 (10153) | αCD3_OKT3 scFv (CDR C->S) (VLVH SS) | N11 (10153) | αCD19_HD37 Fab |
| | 6476 | αCD3_プリナツモマブ scFv | 6476 | αCD3_HD37 Fab |
| | 6518 (N12) | αCD3_hOKT3 Fab | 6518 (N12) | αCD19_HD37 Fab |

* 括弧内の変異体は、重鎖の両方に追加の変異D265E_L234M_L235Aを含む、同等のFc/FcRノックアウト変異体を指す。
これはFc/FcRへの結合をなくす。

【 図 3 A 】



【 図 3 B 】

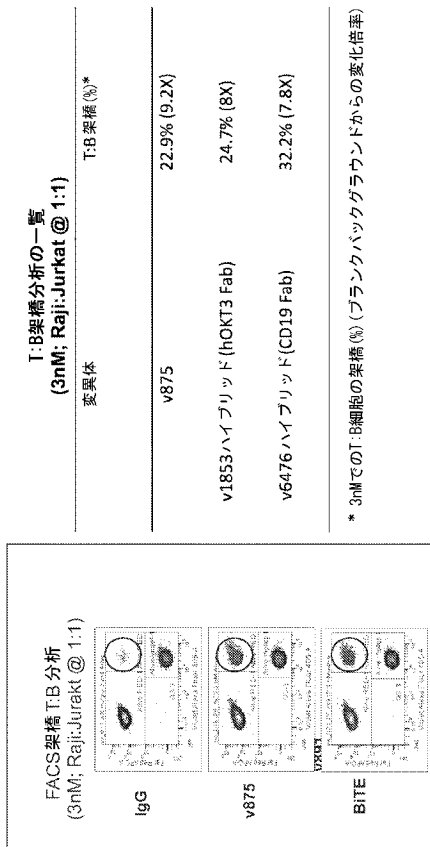


【 図 3 C 】

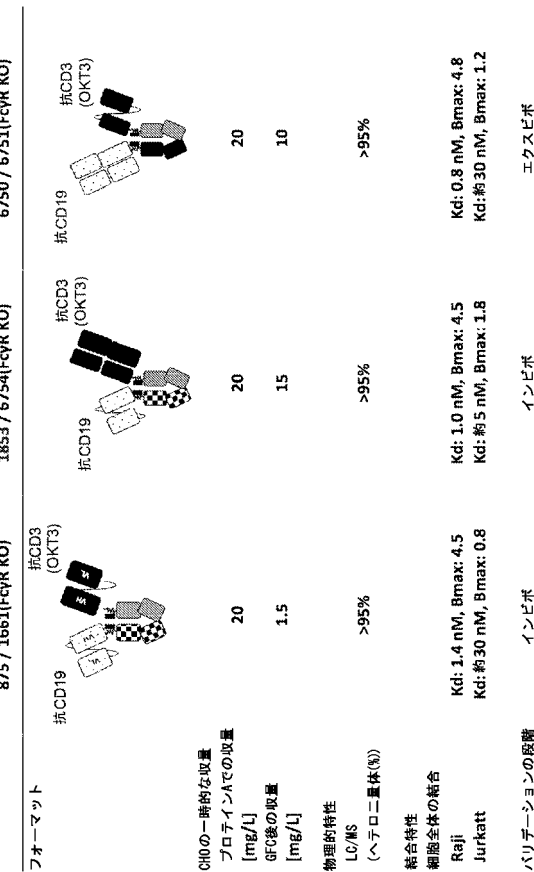
| 変異体** | 二重scFvヘテロ二量体Fc変異体 | | ハイブリッドヘテロ二量体Fc変異体 | |
|-----------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | 遺伝子-最初のリード | 遺伝子-リード最適化 | 遺伝子-2-ハイブリッド変異体* | 遺伝子-2-ハイブリッドFc変異体* |
| 第 A | v1653 αCD3_OKT3 scFv (C-S) scFv | v6747 αCD3_OKT3 scFv | v1853 αCD3_hOKT3 Fab | v6750 αCD3_OKT3 scFv (C->S) scFv |
| 第 B | v6476 αCD19_HD37 scFv | v6751 αCD19_HD37 scFv | v6755 αCD19_HD37 scFv | v6756 αCD19_HD37 Fab |
| 最適化ストラテジー | 初期リード | CDR 両方のscFvでの VH/Lジスルフィド | scFvをFabへ | scFvをFabへ |
| ヘテロ二量体純度 | >95% (高い変動性) | >95% (高い変動性) | >95% | >95% |
| 細胞全体の結合 | Raji: 1.4 nM Jurkat: 約30nM | Kd: 1.4 nM Kd: 約30nM | Kd: 1.0 nM Kd: 約5nM | Kd: 1.5 nM Kd: 約30nM |
| 収量 (mg/L) | 1.5 | 4 | >10 | >10 |

*HD37_O19 Fabは、元のHD37配列のキメラであり (Kari Ivanov1996)、Okt3 Fabは子ブリズマブFabを意味する。
**全ての変異体は、CH2 Fc配アクトアウト変異を含め、収量及び樹状に著しい影響を与えることなく作出することができる。

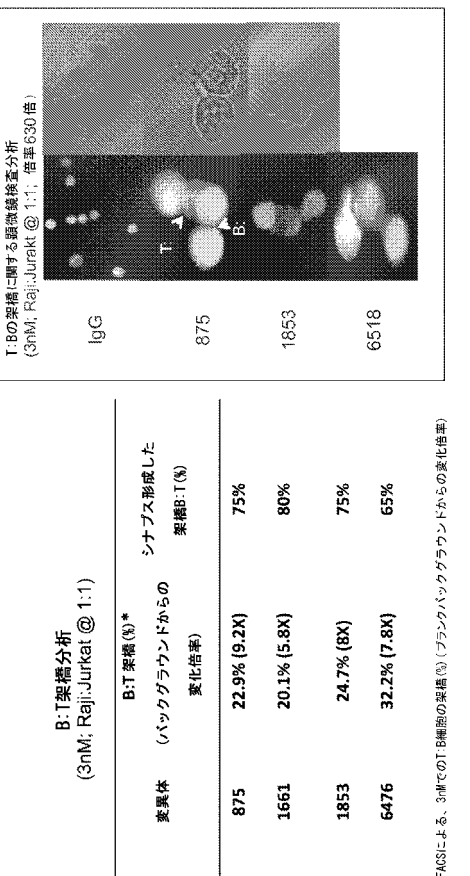
【 図 5 】



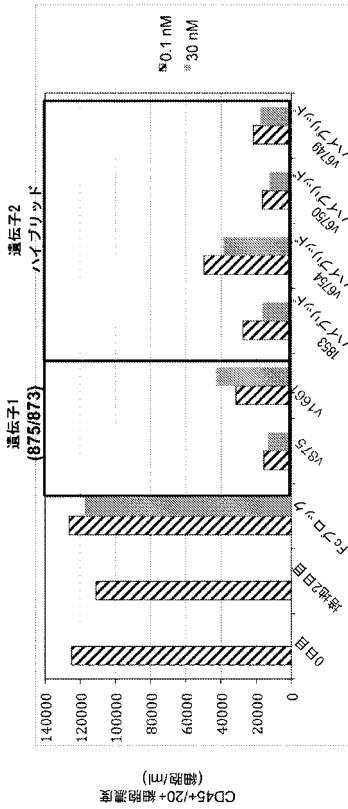
【 図 4 】



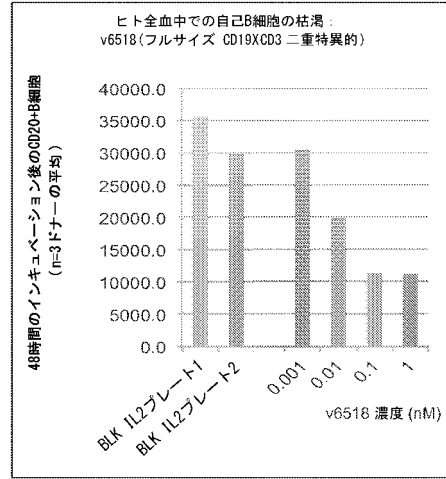
【 図 6 】



【 図 7 A 】

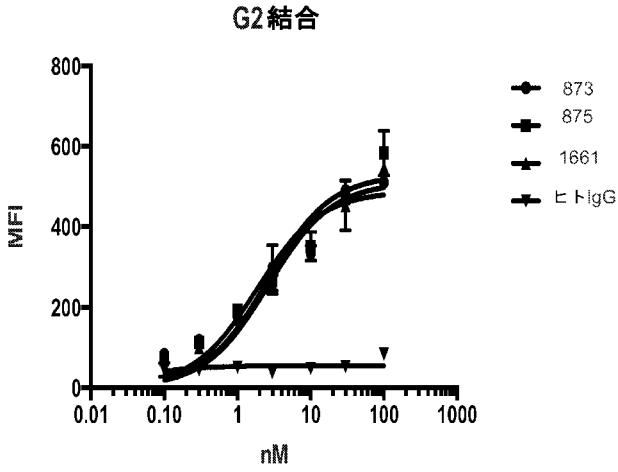


【 図 7 B 】

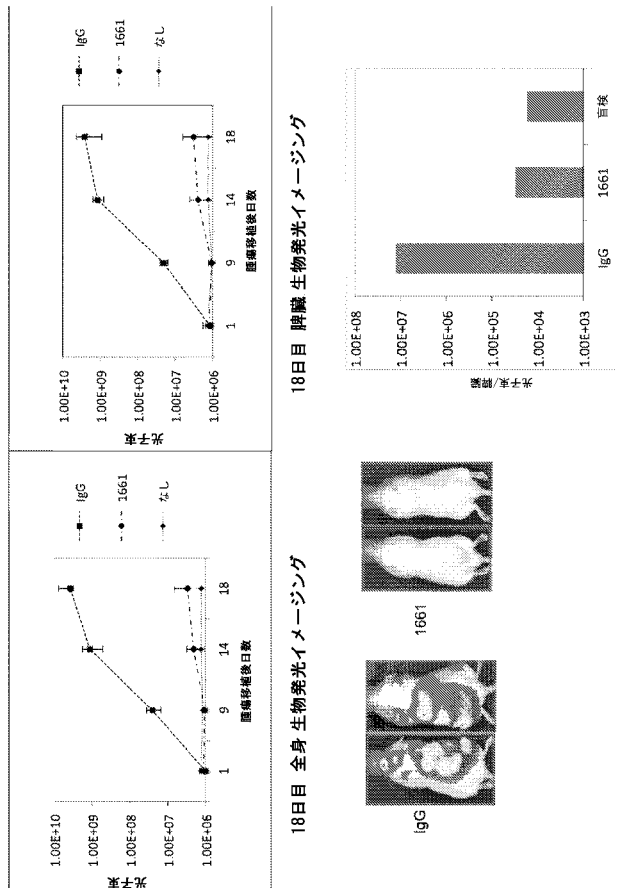


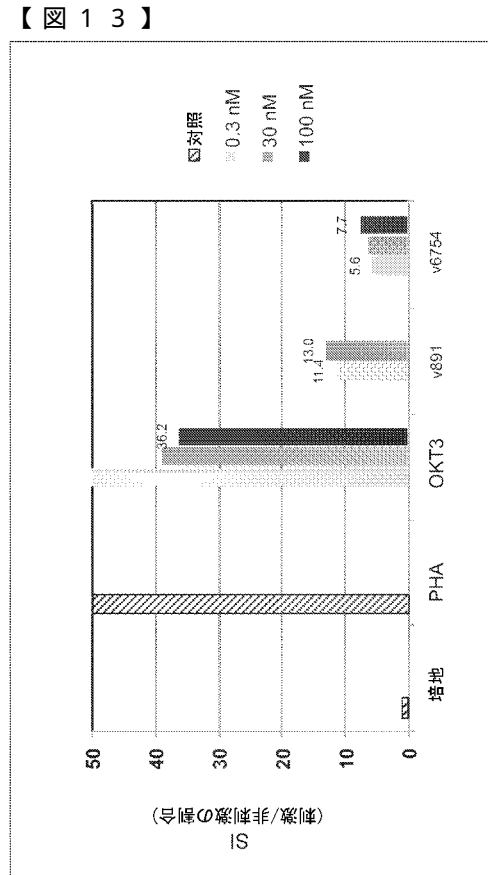
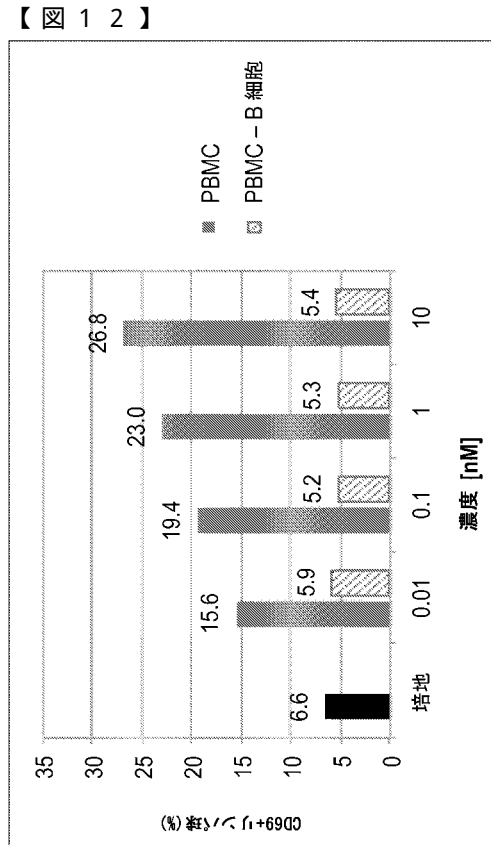
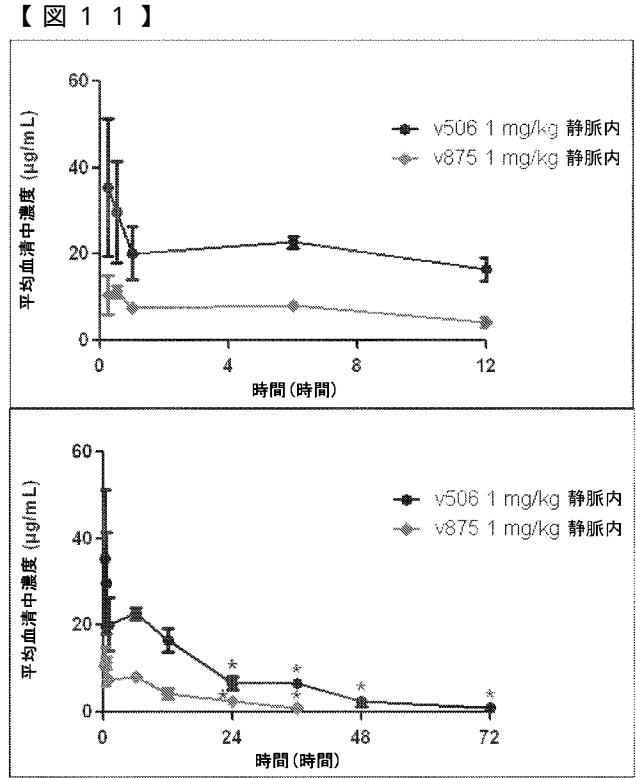
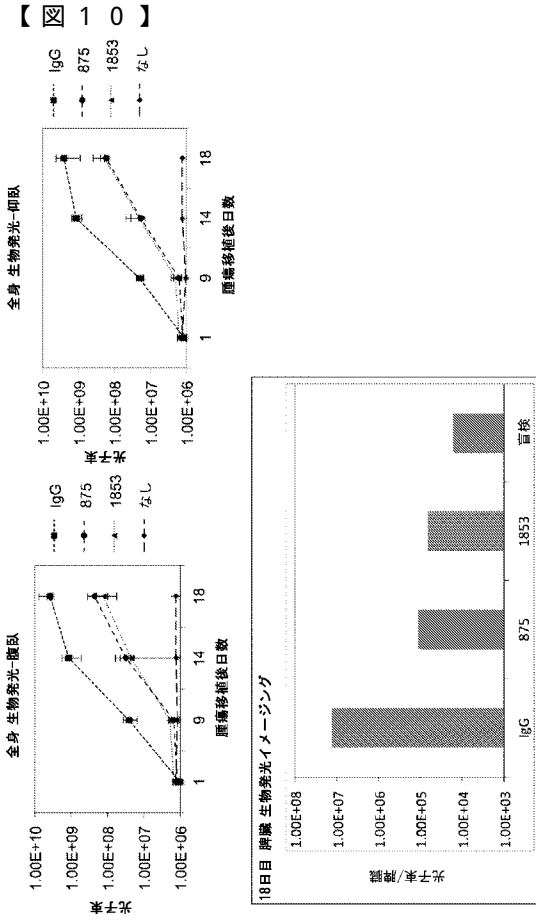
* BLK IL2は対照インキュベーションのみの培地を示す。

【 図 8 】

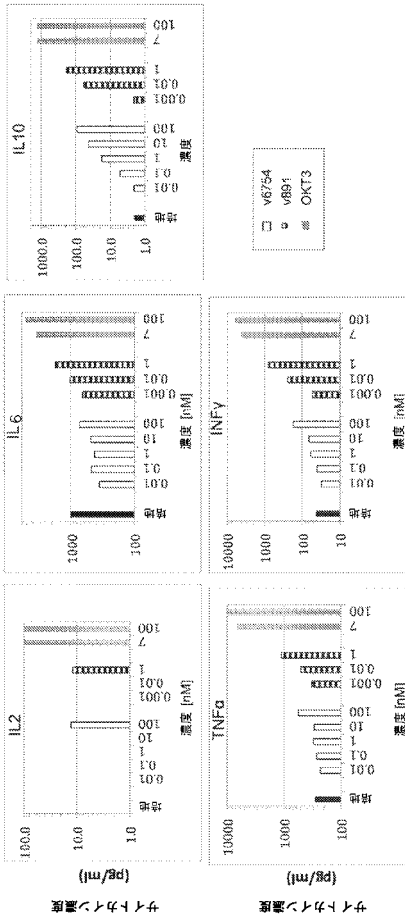


【 図 9 】

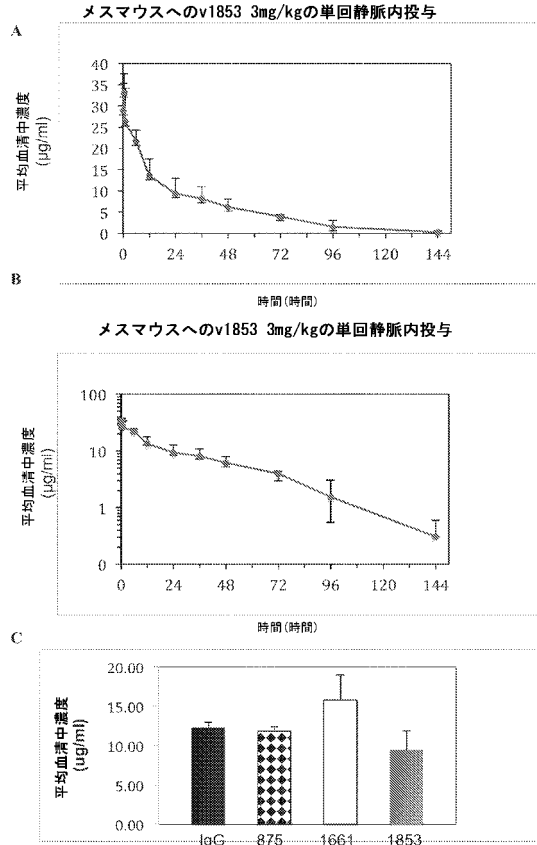




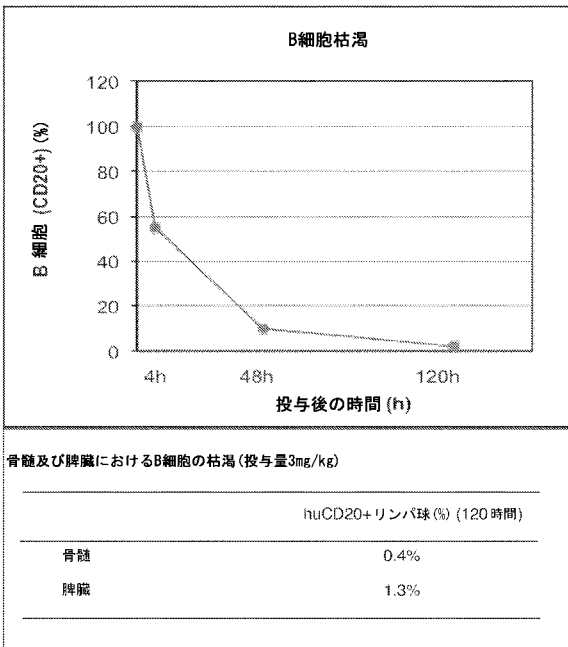
【 図 1 4 】



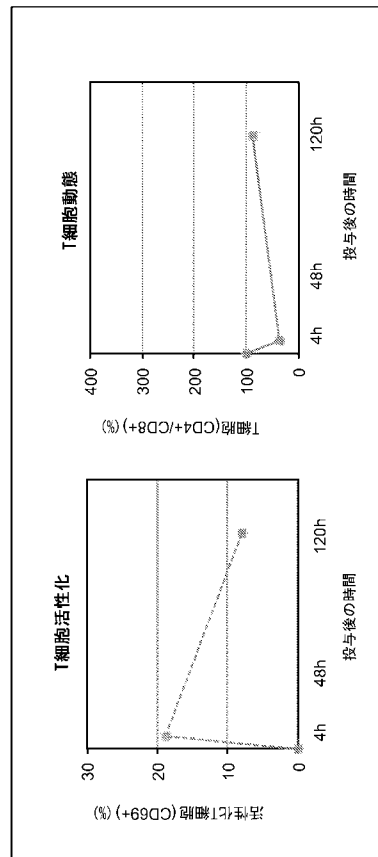
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

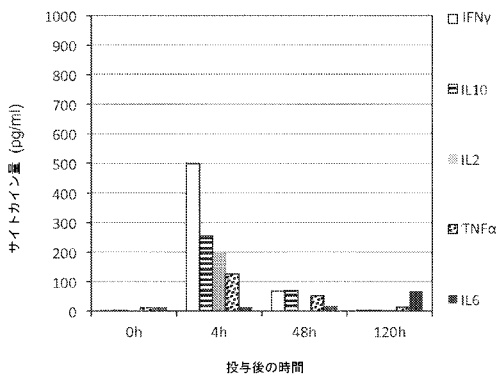


【 図 1 7 】

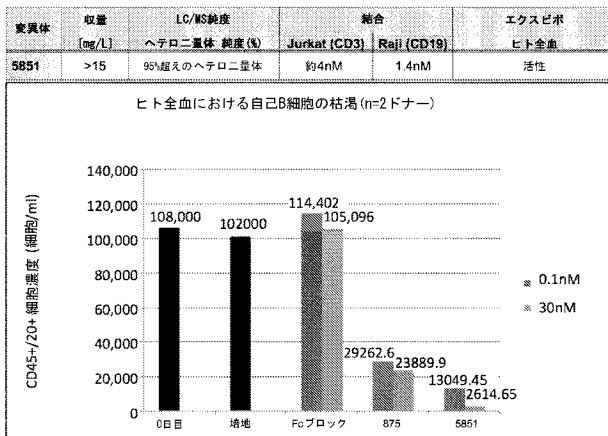


【 図 1 8 】

サイトカイン放出



【 図 1 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年3月15日 (2016.3.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 0 2

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 0 2 】

配列表

本願は、E F S - W e bを通して提出された配列表を含有し、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。2014年7月30日に作成された前記A S C I Iの写しは2 7 2 2 1 P C T _ C R F _ s e q u e n c e l i s t i n g . t x tという名前であり、4 8 7 , 0 4 6バイトのサイズである。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 0 7

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 0 7 】

C D 1 9 または C D 2 0 抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物；C D 3 抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物；それぞれ修飾 C H 3 ドメインを含む第 1 及び第 2 F c ポリペプチドを含むヘテロ二量体 F c を含む、単離された二重特異的抗原結合構築物を本明細書にて開示する。ここで各修飾 C H 3 ドメインは非対称なアミノ酸修飾を含み、これは約 6 8 以上の融解温度 (T m) を有するヘテロ二量体 F c 及び二量体 C H 3 ドメインの形成を促進する。また

ここで第1のFcポリペプチドは、第1のリンカーを含んでまたは含まずに第1の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、かつ第2のモノマーFcポリペプチドは、第2のリンカーを含んでまたは含まずに第2の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、並びに、第1の抗原結合ポリペプチド構築物はFabでありかつ第2の抗原結合ポリペプチド構築物はscFvであるか、または、第1の抗原結合ポリペプチド構築物はscFvでありかつ第2の抗原結合ポリペプチド構築物はFabである。

[本発明1001]

CD19抗原またはCD20抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第1の抗原結合ポリペプチド構築物；

CD3抗原に、一価でかつ特異的に結合する、第2の抗原結合ポリペプチド構築物；

それぞれ修飾CH3ドメインを含む第1及び第2Fcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fcであって、各修飾CH3ドメインが、約68以上の融解温度(Tm)を有するヘテロ二量体Fc及び二量体CH3ドメインの形成を促進する非対称なアミノ酸修飾を含み、前記第1のFcポリペプチドが、第1のリンカーを含んでまたは含まずに前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物に結合し、かつ前記第2のモノマーFcポリペプチドが、第2のリンカーを含んでまたは含まずに前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物に結合する、前記ヘテロ二量体Fc；

を含む、単離二重特異的抗原結合構築物であって、

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物がFabであり、かつ前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物がscFvであるか、または前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物がscFvであり、かつ前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物がFabである、前記単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1002]

変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、または6325からなる、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1003]

変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、または6325のうち少なくとも3個、少なくとも6個、または少なくとも12個のCDRを含む、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1004]

少なくとも1つのポリペプチドが、変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、または6325のうち少なくとも1つのポリペプチドに、少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1005]

a. 前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、4G7；B4；B43；BU12；CLB-CD19；Leu-12；SJ25-C1；J4.119、B43、SJ25C1、FMC63(IgG2a)、HD237(IgG2b)、Mor-208、MEDI-551、及びMDX-1342からなる群から選択される抗体に由来する、CD19に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

b. かつ、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、OKT3；テプリズマブ(商標)(MGA031, Eli Lilly)；Micromet、プリナツモマブ(商標)；UCHT1；NI0401；ピジリズマブ；X35-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、WT31、WT32、SPV-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2及びF101.01から選択される抗体に由来する、CD3に特異的な前記結合ポリペプチド構築物を含み、

c. かつ/または前記抗原結合構築物が、aもしくはbに記載した抗体と競合し、

d. かつ/またはこれらのヒト化版である、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1006]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、C D 19に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物に少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含み、かつ前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、C D 3に特異的な前記抗原結合ポリペプチド構築物に少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1005の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1007]

表 A の前記ヘテロ二量体 F c、または変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、もしくは6325を含む、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1008]

少なくとも1つの F c ポリペプチドが、表 A のヘテロ二量体 F c、または変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、もしくは6325のうち少なくとも1つの F c ポリペプチドに少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1009]

前記ヘテロ二量体 F c が
ヒト F c である；かつ/または
ヒト I g G1 F c もしくは I g G4 F c である；かつ/または
前記 C H 3 ドメインのうち少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含む；かつ/または
野生型ホモ二量体 F c に相当する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する、前記 C H 3 ドメインのうち少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含む；かつ/または
表 A に記載した前記 C H 3 ドメインのうち少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含み
；
少なくとも1つの C H 2 ドメインを更に含む；かつ/または
1つ以上の修飾を含む少なくとも1つの C H 2 ドメインを更に含む；かつ/または
表 B に記載した前記 C H 2 ドメインのうち少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含む、
少なくとも1つの C H 2 ドメインを更に含む；かつ/または
F c 受容体及び/もしくは補体の選択的結合を促進する1つ以上の修飾を含む、上記
本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1010]

前記二量体化 C H 3 ドメインが、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 (T m) を有する、上記本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1011]

各ヘテロ二量体 F c ポリペプチドが、リンカーにより各抗原結合ポリペプチド構築物に融合した、上記本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1012]

前記リンカーがポリペプチドリinkerである、本発明1011の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1013]

前記リンカーが I g G1 ヒンジ領域を含む、本発明1011の単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1014]

低下した F c 受容体結合を示し、かつ関係する免疫細胞が仲立ちするエフェクター活性を示さない、上記本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1015]

前記二重特異的抗原結合構築物が、
F A C S 及び/もしくは顕微鏡検査法によりアッセイしたように、C D 19 + R a j i B

細胞及びJurkat T細胞間でのシナプス形成並びに結合が可能である；かつ/またはヒト全血において、T細胞が導くCD20+ B細胞の死滅の仲立ちをする；かつ/またはv875と比較して向上した生物物理学的特性を示す；かつ/またはv875と比較して、例えばSEC（サイズ排除クロマトグラフィー）後に10mg/Lを超えて発現する、向上した収量を示す；かつ/または同等の発現条件下で、所望の均一種の10倍良好な収量を示す、かつ/または例えば95%を超えるヘテロ二量体純度を示す、上記本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1016]

前記抗原結合構築物が薬剤に結合している、上記本発明のいずれかの単離二重特異的抗原結合構築物。

[本発明1017]

上記本発明のいずれかの前記単離二重特異的抗原結合構築物、及び医薬担体を含む医薬組成物。

[本発明1018]

前記担体が、緩衝液、酸化防止剤、低分子量分子、薬剤、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または賦形剤を含む、本発明1017の医薬組成物。

[本発明1019]

上記本発明のいずれかの前記二重特異的抗原結合構築物を含む、薬で使用するための医薬組成物。

[本発明1020]

上記本発明のいずれかの前記二重特異的抗原結合構築物を含む、がん治療に使用するための医薬組成物。

[本発明1021]

対象におけるがん治療方法であって、有効量の上記本発明のいずれかの単離抗原結合構築物を前記対象に投与する段階を含む、前記がん治療方法。

[本発明1022]

前記対象がヒトである、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記がんが、血球系がん、白血病、リンパ腫、血液がん、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、CD19溶解抗体、CD20溶解抗体、及びプリナツモマブのうち少なくとも1種に非応答性のがん、プリナツモマブでの治療後に退行性となるがん細胞、ALL、CLL、NHL、外套細胞リンパ腫、播種性B細胞病、並びに脳、肺、肝臓及び/または骨の転位である、本発明1021の方法。

[本発明1024]

対象における状態の治療方法であって、有効量の上記本発明のいずれかの前記抗原結合構築物を前記対象に投与する段階を含み、前記状態が、炎症性状態、増殖性疾患、最小残存がん、腫瘍性疾患、炎症性疾患、免疫不全、自己免疫疾患、感染症、ウイルス性疾患、アレルギー反応、寄生虫反応、移植片対宿主病もしくは宿主対移植片病、または細胞悪性疾患、B細胞に関する疾患、抗CD19抗体及び抗CD20抗体のうち少なくとも1つによる治療に非応答性の疾患である、前記治療方法。

[本発明1025]

前記自己免疫状態が、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬性関節炎、乾癬、血管炎、ぶどう膜炎、クローン病、及び1型糖尿病の1つ以上である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記二重特異的抗原結合構築物の発現に好適な条件下で宿主細胞を培養する段階であって、前記宿主細胞が、上記本発明のいずれかの前記単離二重特異的抗原結合構築物をコードするポリヌクレオチドを含む、段階、及び

前記二重特異的抗原結合構築物を精製する段階

を含む、上記本発明のいずれかの前記二重特異的抗原結合構築物の作製方法。

[本発明1027]

サンプルにおけるC D 3及び/またはC D 19の検出または測定方法であって、前記サンプルを、上記本発明のいずれかの前記二重特異的抗原結合構築物と接触させる段階、及び結合複合体を検出または測定する段階を含む、前記検出または測定方法。

[本発明1028]

有効量の上記本発明のいずれかの前記二重特異的抗原結合構築物を前記細胞に投与する段階、及び所望により、低分子または第2の抗体を投与する段階を含む、細胞におけるC D 3及び/またはC D 19シグナル伝達の阻害、低下またはブロック方法。

[本発明1029]

上記本発明のいずれかの前記単離二重特異的抗原結合構築物のうち少なくとも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1030]

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1029の単離ポリヌクレオチド。

[本発明1031]

変異体6754、6751、1853、10151、6475、6749、10152、10153、6476、5850、5851、5852、または6325のうち少なくとも1つのポリペプチドをコードする、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1032]

本発明1029の1つ以上のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含む、ベクターまたはベクターのセット。

[本発明1033]

プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、及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1029の1つ以上のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクターまたはベクターのセット。

[本発明1034]

本発明1029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1032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1035]

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1034の単離細胞。

[本発明1036]

v 1813またはv 1812またはv 1823からなる単離二重特異的抗原結合構築物。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

可変領域は直接、または典型的には、機能性抗原結合部位の形成を可能にするリンカーペプチドを介して接続されてよい。典型的なペプチドリンカーは約2~20個のアミノ酸を含み、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において既知である。好適な非免疫原性のペプチド類としては例えば、(G4S)_n(配列番号:357)、(SG4)_n(配列番号:358)、(G4S)_n(配列番号:357)、G4(SG4)_n(配列番号:359)またはG2(SG2)_n(配列番号:366)リンカーペプチドが挙げられ、式中nは通常1~10の数字、典型的には2~4の数字である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

哺乳類細胞中で分泌を行うために、抗原結合構築物タンパク質に融合したシグナルペプチドの例としては、MPIF-1シグナル配列（例えばGenBankアクセッション番号AAB51134のアミノ酸1-21）、スタニオカルシンシグナル配列（MLQNSAVLLLVISASA）（配列番号：355）、コンセンサスシグナル配列（MPTWAWWLFLVLLALWAPARG）（配列番号：356）が挙げられるが、これらに限定されない。パキユロウイルス発現系とともに使用してよい、好適なシグナル配列としてはgp67シグナル配列（例えばGenBankアクセッション番号AAA72759のアミノ酸1-19）がある。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0215

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0215】

変異体v873及びv875の抗CD19 scFv（HD37 scFv）配列は、既知の抗CD19 scFv（VL-VH）HD37（Kipriyanov et al., 1998, Int. J. Cancer: 77, 763-772）から作製した。変異体v875の抗CD3 scFv（OKT3 scFv）は、軽鎖と重鎖の間の（GGGS）3（配列番号：380）リンカーにより、公表されたOKT3（Orthoclone OKT3、ムロモナブ）可変軽鎖配列を可変重鎖配列に融合することで作製した。変異体v873の抗CD3 scFv（ブリナツモマブ scFv）は、既知のブリナツモマブ（Amgen）抗CD3 scFv（VH-VL）配列から作製した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0338

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0338】

（表ZZ）抗原結合ポリペプチド構築物の例示的なCDR配列

| CDR | 配列 |
|-----------------------------|---|
| 野生型 OKT3 (CD3 結合) | L1: SSVSY (配列番号: 337) L2: DTS (配列番号: 338) L3: QQWSSNP (配列番号: 339) H1: GYTFTRYT (配列番号: 340) H2: INPSRGYT (配列番号: 341) H3: ARYYDDHY C LDY (配列番号: 342) |
| 安定化した OKT3 の変異体 (CD3 結合) | L1: SSVSY (配列番号: 343) L2: DTS (配列番号: 344) L3: QQWSSNP (配列番号: 345) H1: GYTFTRYT (配列番号: 346) H2: INPSRGYT (配列番号: 347) H3: ARYYDDHY S LDY (配列番号: 348) |
| HD37 (CD19 結合) | L1: QSVDYDGDSYL (配列番号: <u>354</u>) L2: DAS (配列番号: 349) L3: QQSTEDPWT (配列番号: 350) H1: GYAFSSYW (配列番号: 351) H2: IWPGDGDT (配列番号: 352) H3: ARRETTTVGRYYYYAMDY (配列番号: 353) |

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2016531100000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/46436

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|---|--|--|
| IPC(8) - C12P 21/08 (2014.01) | | |
| CPC - C07K 2319/00, 2317/24 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC(8): C12P 21/08 (2014.01) | | |
| CPC: C07K 2319/00, 2317/24; USPC: 530/387.3, 387.1, 388, 380, 350 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; Dialog ProQuest; Entrez Pubmed; 'bispecific antibody,' 'heterodimeric Fc,' 'CH3 domain,' 'variant 6754,' 'CD19,' 'CD3,' 'CD20,' 'OKT3,' 'HD37,' 'monovalent specificity,' construct | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 2012/0149876 A1 (VON KREUDENSTEIN, TS, et al.) June 14, 2012; abstract; figure 14; paragraphs [0003], [0021], [0023], [0025], [0027], [0074]-[0076], [0079], [0080], [0083], [0088], [0153], [0188], [0196], [0202], [0205], [0207], [0208], [0228] | 1-8, 31 |
| Y | COCHLOVIUS, B et al. Treatment Of Human B Cell Lymphoma Xenografts With A CD3 x CD19 Diabody And T Cells. Journal of Immunology. 2000, Vol. 165; pages 888-895; abstract; page 888, second column, second paragraph; page 889, first column, first to second paragraph; page 889, first column, fourth paragraphs; page 890, first paragraph, fourth paragraph; page 893, first column, first paragraph; figure 4. | 1-8, 31 |
| A | STANGLMAIER, M et al. B120 (FBTA05). A Novel Trifunctional Bispecific Antibody (anti-CD20 3 anti-CD3), Mediates Efficient Killing Of B-cell Lymphoma Cells Even With Very Low CD20 Expression Levels. International Journal of Cancer. 2008, Vol. 123; pages 1181-1189; abstract. | 1-8, 31 |
| A | US 2013/0078249 A1 (AST, O et al.) March 28, 2013; abstract | 1-8, 31 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" |
| "E" | earlier application or patent but published on or after the international filing date | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "Y" |
| | | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| | | "&" |
| | | document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 17 December 2014 (17.12.2014) | 02 JAN 2015 | |
| Name and mailing address of the ISA/US | Authorized officer: | |
| Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 | Shane Thomas | |
| Facsimile No. 571-273-3201 | PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

014/046436-02-01-2015

International application No.

PCT/US14/46436

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1014/046436 02.01.2016
International application No.

PCT/US14/46436

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

- 3. Claims Nos.: 9-30, 32-35
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-Please See Supplemental Page-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Groups I+: Claims 1, 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5, 6, 7 (in-part), 8 (in-part), 31 (in-part), an isolated bispecific antigen binding polypeptide construct consisting of variant 6754

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US14/46436

***-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-8, 31 and 36 are directed toward a bispecific antigen binding construct comprising a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD19 antigen or a CD20 antigen; a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen; and a heterodimeric Fc comprising first and second Fc polypeptides each comprising a modified CH3 domain, wherein each modified CH3 domain comprises asymmetric amino acid modifications that promote the formation of a heterodimeric Fc and the dimerized CH3 domains having a melting temperature (T_m) of about 68 degrees C or higher; and an isolated polynucleotide encoding said bispecific antigen binding construct.

The bispecific antigen binding construct will be searched to extent that the construct encompasses variant 6754. It is believed that Claims 1, 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5, 6, 7 (in-part), 8 (in-part) and 31 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass an isolated bispecific antigen binding polypeptide construct consisting of variant 6754. Additional antigen binding construct(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antigen binding construct(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: an isolated bispecific antigen binding polypeptide construct consisting of variant 6751.

Groups I+ share the technical features including: an isolated bispecific antigen binding construct comprising a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD19 antigen or a CD20 antigen; a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen; a heterodimeric Fc comprising first and second Fc polypeptides each comprising a modified CH3 domain, wherein each modified CH3 domain comprises asymmetric amino acid modifications that promote the formation of a heterodimeric Fc and the dimerized CH3 domains having a melting temperature (T_m) of about 68 degrees C or higher, wherein the first Fc polypeptide is linked to the first antigen-binding polypeptide construct, with or without a first linker, and the second monomeric Fc polypeptide is linked to the second antigen-binding polypeptide construct with or without a second linker; and wherein the first antigen binding polypeptide construct is a Fab and the second antigen binding polypeptide construct is an scFv or the first antigen binding polypeptide construct is an scFv and the second antigen binding polypeptide construct is a Fab; an isolated polynucleotide or set of isolated polynucleotides encoding at least one polypeptide of variant 6754, 6751, 1853, 10151, 6475, 6749, 10152, 10153, 6476, 5850, 5851, 5852 or 6325; and an isolated bispecific antigen binding construct consisting of V1813 or V1823.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2012/0149876 A1 to Von Kreudenstein, et al. (hereinafter "Von Kreudenstein") and further in view of the publication entitled "B120 (FBTA05), A Novel Trifunctional Bispecific Antibody (anti-CD20 X anti-CD3), Mediates Efficient Killing Of B-Cell Lymphoma Cells Even With Very Low CD20 Expression Levels" by Stanglmaier, et al. (hereinafter "Stanglmaier") and the publication entitled "Treatment Of Human B Cell Lymphoma Xenografts With A CD3 X CD19 Diabody And T Cells" by Cochlovius, et al. (hereinafter "Cochlovius").

Von Kreudenstein discloses an isolated bispecific antigen binding construct (a bispecific antibody; paragraphs [0003], [0025]) comprising a first antigen-binding polypeptide construct (comprising an Fab or single chain antibody in a bispecific antibody; paragraphs [0003], [0188]) which monovalently and specifically binds a first antigen (fab or single-chain antibody; paragraphs [0003], [0188]); a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a second antigen (a second single-chain antibody or Fab in a bispecific antibody; paragraphs [0003], [0188]); a heterodimeric Fc (a heterodimeric Fc; paragraph [0003]) comprising first and second Fc polypeptides (comprising a heterodimer Fc region; paragraphs [0013], [0080]) each comprising a modified CH3 domain (paragraph [0080]), wherein each modified CH3 domain comprises asymmetric amino acid modifications that promote the formation of a heterodimeric Fc (paragraph [0080]) and the dimerized CH3 domains having a melting temperature (T_m) of about 68 degrees C or higher (the dimerized CH3 domains having a melting temperature (T_m) of about 70 degrees C or higher; paragraph [0079]), wherein the first Fc polypeptide is linked to the first antigen-binding polypeptide construct (wherein the Fc heterodimer is fused to a variable light or heavy chain domain; figure 14, paragraph [0188]), with or without a first linker (with a hinge region; figure 14), and the second monomeric Fc polypeptide is linked to the second antigen-binding polypeptide construct (wherein the Fc heterodimer is fused to a variable light or heavy chain domain; figure 14, paragraph [0188]) with or without a second linker (with a hinge region; figure 14); and wherein the first antigen binding polypeptide construct is a Fab (paragraphs [0188]) and the second antigen binding polypeptide construct is an scFv (and the second antigen binding polypeptide is a single chain antibody; paragraphs [0188], [0196]) or the first antigen binding polypeptide construct is an scFv (the first antigen binding polypeptide is a single chain antibody; paragraphs [0188], [0196]) and the second antigen binding polypeptide construct is a Fab (the second antigen binding protein is an Fab; paragraph [0188]); and an isolated polynucleotide or set of isolated polynucleotides encoding at least one polypeptide (a nucleic acid encoding a heterodimer; paragraph [0027]); wherein the bispecific antigen may bind targets including CD19, CD20 and CD3 (wherein the bispecific antigen may bind targets including CD19, CD20 and CD3; paragraph [0207]), and wherein the modifications include T350V (T350V; Claims 1, 91, and 94), L351Y, F405A, Y407V, T366L, K392L, and T394W (L351Y, F405A, Y407V, T366L, K392L, and T394W; paragraph [0020]) to produce heterodimers with increased stability (to produce heterodimers with increased stability; paragraph [0011]).

-Continued Within the Next Supplemental Box.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2014/046436 02.01.2015

International application No.

PCT/US14/46436

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Von Kreudenstein does not disclose a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD19 antigen or a CD20 antigen; a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen; an isolated polynucleotide or set of isolated polynucleotides encoding at least one polypeptide of variant 6754, 6751, 1853, 10151, 6475, 6749, 10152, 10153, 6476, 5850, 5851, 5852 or 6325; and an isolated bispecific antigen binding construct consisting of V1813 or V1812 or V1823.

Stanglmaier discloses a bispecific antigen-binding construct (a bispecific antibody; abstract) comprising a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD20 antigen (comprising a CD20-specific monoclonal IgG2 antibody; page 1181, column 2, paragraph 5) and a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen (and an anti-CD3 monoclonal antibody; page 1182, column 1, paragraph 1), wherein the molecule is useful for the treatment of B-cell lymphoma (abstract).

Cochlovius discloses a bispecific antigen-binding construct (a bispecific antibody; abstract) comprising a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD19 antigen (comprising ScFv fragment from HD37 (comprising a first antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD19 antigen; page 890, column 1, paragraph 4), and a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen (and an OKT3 ScFv (a second antigen-binding polypeptide construct which monovalently and specifically binds a CD3 antigen); page 890, column 1, paragraph 4), wherein the CD-3 binding antigen comprises an OKT3 scFv (page 890, column 1, paragraph 4), and nucleic acids encoding said polypeptides (optimized expression vector encoding the bispecific construct; page 890, column 1, paragraph 4); wherein the bispecific antigen binding construct is useful for the treatment of B-cell leukemias and lymphomas (abstract).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Von Kreudenstein, for producing variants including the specific combination of mutations required to produce any of variants 6754, 6751, 1853, 10151, 6475, 6749, 10152, 10153, 6476, 5850, 5851, 5852, 6325, V1813, V1812 or V1823, including a bispecific construct comprising said Fc mutations in chains including an anti-CD3 OKT3 scFv and anti-CD19 HD37 Fab, provided the previous disclosure of Cochlovius, for producing a bispecific construct, such as a variant of 6754 with increased stability, useful for the treatment of B-cell lymphomas. Furthermore, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the previous disclosure of Von Kreudenstein, for producing Fc variants, including the specific combination of Fc mutations required to produce any of variants V1813, V1812 or V1823, or a nucleic acid encoding at least one polypeptide of the variants, which binds to the same targets, provided the previous disclosure of Stanglmaier. Moreover, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention, to have modified the previous disclosure of Von Kreudenstein, for implementing the use of a known therapeutic antibody, such as anti-CD3 and anti-CD20 antibodies or binding proteins, as previously disclosed by Stanglmaier, with utilizing known therapeutic antibodies, particularly Foralumab, and Fatumumab (anti-CD3 and anti-CD20 antibodies or binding proteins Foralumab, and Fatumumab; paragraph [00248], Table 1 of the instant PCT application), for producing therapeutic bispecific antibodies such as V1813 (Table 1 of the instant PCT application), with increased stability, as previously disclosed by Von Kreudenstein, and having usefulness in the treatment of B-cell lymphomas, as previously disclosed by Stanglmaier, for achieving more rapid clearance of the antibodies for therapeutic use, due to their similarity with accepted therapeutics.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Von Kreudenstein, Stanglmaier and Cochlovius references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|------------------|---------|--------|------------|
| C 1 2 N | 5/18 (2006.01) | C 1 2 N | 5/18 | |
| C 1 2 N | 5/22 (2006.01) | C 1 2 N | 5/22 | |
| A 6 1 K | 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | N |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 35/02 (2006.01) | A 6 1 P | 35/02 | |
| A 6 1 P | 35/04 (2006.01) | A 6 1 P | 35/04 | |
| A 6 1 P | 37/06 (2006.01) | A 6 1 P | 37/06 | |
| A 6 1 P | 29/00 (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 | |
| A 6 1 P | 37/02 (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 37/08 (2006.01) | A 6 1 P | 37/08 | |
| A 6 1 P | 31/00 (2006.01) | A 6 1 P | 31/00 | |
| A 6 1 P | 31/12 (2006.01) | A 6 1 P | 31/12 | |
| A 6 1 P | 33/00 (2006.01) | A 6 1 P | 33/00 | |
| A 6 1 P | 19/02 (2006.01) | A 6 1 P | 19/02 | |
| A 6 1 P | 17/00 (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 17/06 (2006.01) | A 6 1 P | 17/00 | |
| A 6 1 P | 9/00 (2006.01) | A 6 1 P | 17/06 | |
| A 6 1 P | 1/04 (2006.01) | A 6 1 P | 9/00 | |
| A 6 1 P | 3/10 (2006.01) | A 6 1 P | 1/04 | |
| A 6 1 P | 27/02 (2006.01) | A 6 1 P | 3/10 | |
| G 0 1 N | 33/53 (2006.01) | A 6 1 P | 27/02 | |
| C 1 2 N | 5/0783 (2010.01) | G 0 1 N | 33/53 | D |
| C 1 2 N | 5/0781 (2010.01) | C 1 2 N | 5/0783 | |
| | | C 1 2 N | 5/0781 | |

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

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ディキシット スールジット ビーマラオ
 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 エイス アベニュー 540 -
 1385 ザイムワークス インコーポレイテッド内

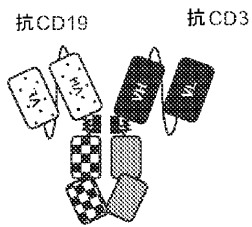
(72)発明者 スプレッター フォン クロイデンシュタイン トマス
 カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540 -
 1385 ザイムワークス インコーポレイテッド内

(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 エイス アベニュー 540 -
 1385 ザイムワークス インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CC24 CE10 CE12 DA01
 4B065 AA90X AB05 AB06 AC14 BA21 BD14
 4C085 AA14 AA16 BB36 BB41 BB50 CC23 EE01
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 EA22 EA29
 FA74 GA22 GA26

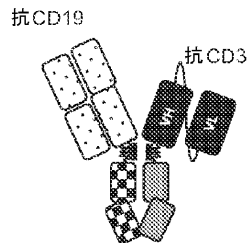
【要約の続き】

A



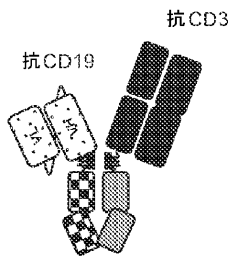
二重scFv
 ヘテロ二量体Fc
 フォーマット

B



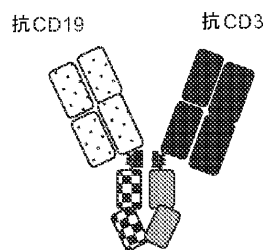
ハイブリッドヘテロ二量体Fc
 フォーマット

C



ハイブリッドヘテロ二量体Fc
 フォーマット

D



フルサイズ
 抗体
 フォーマット

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 双特异性CD3和CD19抗原结合构建体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2016531100A | 公开(公告)日 | 2016-10-06 |
| 申请号 | JP2016525831 | 申请日 | 2014-07-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 酵活有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | ZYME工程有限公司 | | |
| [标]发明人 | ディキシットスールジットビーマラオ スプレッターフォンクロイデンシュタイントマス エンゴードンイウコン | | |
| 发明人 | ディキシット スールジット ビーマラオ スプレッター フォン クロイデンシュタイン トマス エンゴードン イウ コン | | |
| IPC分类号 | C07K16/46 C12N15/09 C12P21/08 C12N5/10 C12N5/09 C12N5/18 C12N5/22 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/06 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P31/00 A61P31/12 A61P33 /00 A61P19/02 A61P17/00 A61P17/06 A61P9/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P27/02 G01N33/53 C12N5 /0783 C12N5/0781 | | |
| CPC分类号 | A61K2039/505 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29 /00 A61P31/00 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61K47/6849 C07K16/2803 C07K16/2809 C07K16/2887 C07K16/468 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/526 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317 /64 C07K2317/76 C07K2317/90 C07K16/30 C07K2317/24 G01N33/6872 G01N2333/70503 G01N2333 /7051 | | |
| FI分类号 | C07K16/46.ZNA C12N15/00.A C12P21/08 C12N5/10 C12N5/09 C12N5/18 C12N5/22 A61K39/395.N A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/06 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P31/00 A61P31 /12 A61P33/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P17/00 A61P17/06 A61P9/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P27/02 G01N33/53.D C12N5/0783 C12N5/0781 | | |
| F-TERM分类号 | 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065 /AB05 4B065/AB06 4B065/AC14 4B065/BA21 4B065/BD14 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘 | | |
| 优先权 | 61/978719 2014-04-11 US 61/845948 2013-07-12 US 61/927877 2014-01-15 US | | |
| 其他公开文献 | JP2016531100A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |
| 摘要(译) | | | |

描述了与CD3和CD19或CD20结合的双特异性抗原结合构建设。

